THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE DE METZ

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

Spécialité : **ECOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITE, ECOSYSTEMES**

Par

Marion GUST

DEVELOPPEMENT ET FAISABILITE DE MARQUEURS DE LA PERTURBATION ENDOCRINIENNE CHEZ DES GASTEROPODES D'EAU DOUCE : *POTAMOPYRGUS ANTIPODARUM* ET *VALVATA PISCINALIS* APPLICATION AU LABORATOIRE ET AU TERRAIN

Soutenue publiquement le 15 décembre 2010 devant la commission d'examen suivante :

Directrices de Thèse :	Jeanne GARRIC	Directrice de Recherche, Cemagref
	Laure GIAMBERINI	Professeur, Université Metz
Rapporteurs :	Cinta PORTE	Directrice de Recherche, IDAEA, Barcelone
	Christophe MINIER	Professeur, Université du Havre
Examinateurs :	Magalie BAUDRIMONT	Maître de Conférence, Université Bordeaux
	Claudia GERARD	Maître de Conférence, Université Rennes
	Olivier PERCEVAL	Docteur, ONEMA

« -En médecine, vous savez comment on appelle le dernier de promo ?

-Docteur, comme les autres »

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu ma directrice de thèse, Jeanne GARRIC, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et appris à croire en mon sujet pour deux (et aussi pour son excellent fondant au chocolat et nos discussions passionnantes !).
Un grand merci à Laure GIAMBERINI, ma seconde directrice de thèse, pour avoir toujours été présente lorsque je l'ai sollicitée.
Je remercie également les « encadrants de l'ombre », dont j'ai pu solliciter les compétences au cours de ce travail, et qui ont répondu de bonne grâce à mes appels.

Al Dr Cinta PORTE quien fue para mi una gran fuente de inspiración y quien nunca dejara de ser un modelo por sus publicaciones científicas que hubiera querido poder escribir. Que encuentre aquí el testimonio de mi admiración así como mis sinceros agradecimientos por haber aceptado encargarse de mi tesis de doctorado.
Je suis très honorée que Christophe MINIER, Professeur à l'Université du Havre, ait accepté de juger ce travail.
Je suis très reconnaissante envers Magalie BAUDRIMONT, Maître de Conférence à l'Université de Bordeaux, Claudia GERARD, Maître de Conférence à l'Université de Rennes, et Olivier PERCEVAL, de la direction scientifique de l'ONEMA, d'avoir accepté de siéger dans le jury de cette thèse.

Je remercie aussi l'ENGREF, qui m'a permis de réaliser cette FCPR.

Que les membres de mon comité de pilotage, Thierry BURONFOSSE, Annette DE VAUFLEURY, Cyril KAO et Jacques MOUTHON trouvent ici l'expression de ma gratitude.

A Thierry BURONFOSSE, pour avoir fait du « parfait petit biochimiste en herbe » mon livre de chevet, et pour sa grande patience.
Un grand merci à Jacques MOUTHON, pour m'avoir appris un peu plus sur les mollusques que mes sujets de colle en prépa (« la moule, un animal fixé »…).

A François GARNIER pour m'avoir permis d'utiliser avec succès ses installations, et aux « filles » pour les avoir faites fonctionner pour moi… Merci Claire pour ces tonnes de dosages !

Au membres du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref :
A Ralph, le génialissime inventeur de mes manips… entre autre pour ses phrases cultes (« J'aime les vaches, pas vous les filles ? » ; « Toutes les deux vous êtes bonnes » ; il y en a d'autres , mais elles n'ont pas leur place dans mes remerciements…).
A Emilie, parce qu'elle rit de mes blagues (et qu'elle est un peu la seule), qu'elle ne m'a pas tuée de lui voler (à répétition) ses épingles à cheveux, et qu'elle ronfle pas la nuit.
A Cyrielle, qui est très pénible quand elle est pas motivée pour bosser !
Au reste du labo, qu'ils y soient encore ou non : Claire et sa bonne humeur, Manuela (dite « Emmanuelle »), qui râle comme personne, Rébecca la mauvaise perdante, Jean-Phi qui m'a (enfin) rendu mes DVD de Clint Eastwood, Renaud dit « n'a qu'un œil » (« mais il a eu une kératite, alors n'en a plus », bon, il faut connaître Oumpah Pah le peau rouge…), Benoît qui a la frite, Patrice mon « Taxi-driver » pour son calme et sa gentillesse extraordinaires, Khédidja, qui a eu pitié de mon incompétence pour faire les coupes histo, Christelle et son rire (discret), Olivier et ses chemises (je n'en dirais pas plus), Hervé « le Boulet »…
A Pif qui râlait parce que je l'avais oublié…

Merci aux chimistes du Cemagref, pour m'avoir beaucoup accueillie sous leurs hottes, et m'avoir appris à utiliser cet engin bizarre et d'un autre temps qu'est l'HPLC diode array.
Merci aux chimistes du CNRS de Solaize, et plus particulièrement Cécile CREN, pour avoir été d'une réactivité époustouflante.

A Lina et Gabriel, mes deux plus belles réussites et occupations au cours de cette thèse.
A Thierry, pour tout ce qui a déjà été surmonté et partagé et qu'il nous reste encore à vivre.
A ma famille.
A Andrée et Gilbert, qui ont la gentillesse de me faire croire que c'est moi le chef.
A Claire et Tata Lulu, les idoles de ma fille.
Au Grand Robert, pour les week-ends et les vacances passés, et surtout, les cures de remise en forme.

TABLE DES MATIERES

Introduction ***1***

Chapitre 1: Etat de l'art ***7***

A / Perturbateurs Endocriniens **9**

1. Définition *9*

2. Historique des effets perturbateurs endocriniens *9*

3. Modalités de perturbation de la fonction endocrinienne *15*

4. Exemples de perturbateurs endocriniens *17*

5. Présence de toxiques dans l'environnement *21*

6. Problématiques soulevées par les EDCs *21*

B / Intérêt des Mollusques Gastéropodes dits « Prosobranches » **27**

1. Caractéristiques biologiques d'intérêt *27*

2. Cas des Mollusques et du TBT *29*

C / Caractéristiques des organismes de travail **41**

1. Classification *41*

2. Morphologie *44*

3. Données biologiques *50*

4. Données écotoxicologiques *59*

D / Contrôle de la reproduction chez les mollusques **73**

1. Neuropeptides *75*

2. Hormones stéroïdiennes *78*

E / Objectifs des travaux **103**

Chapitre 2: Méthodologie de suivi de la reproduction à plusieurs niveaux d'organisation biologique ***107***

A / Choix des marqueurs et justification **113**

1. Individu *113*

2. Sub-individu 114

B / Méthodologie de mesure 117

1. Suivi de reproduction 117

2. Histologie et immunohistologie 119

3. Réserves énergétiques 120

4. Vitelline et « vitelline-like » 124

5. Récepteur aux œstrogènes 126

C / Méthodologies d'exposition 127

1. Exposition en laboratoire 127

2. Exposition sur d'organismes encagés in situ 129

D / Variabilité des marqueurs 131

1. Suivi annuel dans une population de naturelle 132

2. Effet de la température 152

Chapitre 3: Les stéroïdes sexuels de type vertébré : un marqueur de perturbation de la reproduction chez P. antipodarum ? 165

A / Mise au point d'une méthodologie de dosage 169

B / Inhibition de l'action des stéroides au laboratoire en lien avec la reproduction 181

1. Inhibition de la synthèse du 17β-œstradiol 182

2. Antagonisation de la liaison avec les récepteurs nucléaires 192

C / Variations physiologiques des steroides 199

Chapitre 4: Application des marqueurs au laboratoire a une molécule reprotoxique : la Fluoxetine 203

A / Le choix de la fluoxétine 207

1. Sérotonine et reproduction 207

2. Pharmacocinétique de la fluoxétine chez l'homme 208

3. Présence dans l'environnement 208

4. Effets sur les organismes non cibles 209

B / Sensibilité relative de P. antipodarum et V. piscinalis à la fluoxetine 213

C / Bioaccumulation de la fluoxétine et norfluoxétine chez P. antipodarum et V. piscinalis.....247

Chapitre 5: Evaluation de stress reprotoxique in situ 275

A / Mise au point de la méthodologie d'exposition in situ 279

1. Les expositions in situ chez les mollusques 279

2. Exposition in situ de P. antipodarum 282

B / Exposition à une Contamination métallique 297

C / Exposition à des Effluents de Station d'Epuration.....309

Chapitre 6: Discussion générale 321

A / Signification et interpretation des marqueurs 325

1. Pertinence des marqueurs dans le cadre de la perturbation endocrinienne.....325

2. Capacité d'interprétation 330

3. Facilité de mesure 332

B / Intérêt comparé des modèles biologiques.....335

1. Sensibilité interspécifique.....335

2. Facilité de manipulation.....337

C / P. antipodarum un modèle animal adapté pour l'évaluation d'effets reprotoxiques ?.....339

Conclusion et perspectives 345

Références bibliographiques 347

Annexes 375

Supplementary data de la Publication 4 377

Supplementary data de la Publication 7 378

Supplementary data de la Publication 9 386

Supplementary data de la Publication 10 390

LISTE DES ABBREVIATIONS

3-BC : 3-benzylidene-camphor

3β-HSD : 3β/Δ^5-Δ^4-hydroxystéroïde déhydrogénase

5-HT : 5-Hydroxytryptamine, sérotonine

9-cis RA : 9-cis acide rétinoïque

17β-HSD : 17β- hydroxystéroïde déhydrogénase

4-MBC : 3-(4o-methylbenzylidene)-camphor

Ache : Acétyl-cholineestérase

ALL : Lipides labiles en conditions alcalines

ALP : Protéines labiles en conditions alcalines

AR : Récepteur aux androgènes

ATAT : Activité testostérone acyltransférase Palmitoyl-CoA

BPA : Bisphénol A

BSA : Bovine Serum Albumin

Cd : Cadmium

CH_2Cl_2 : Dichlorométhane

CL_{50} : Concentration léthale 50

CDC : Centro caudal cells

CV : Coefficient de variation

DAB : Diaminobenzidine

DB : Dorsal body

DBCP : 1,2-dibromo-3-chloropropane

DBT : Dibutylétain

DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DES : DiEthylSilbœstrol

DHA : 5α-andostenedione

DHEA : Dihydo-androstenedione

DHT : Dihydro-testostérone

E2 : 17β-œstradiol

ECOD : Ethoxycoumarin-O-deethylase

EC_{50} : Concentration effective

EDC : Endocrine-Disrupting Chemical

EE2 : 17α-ethinyl-œstradiol

ER : Récepteur aux œstrogènes

EST : Expressed Sequence Tags

EtOH : Ethanol

GC : Chromatographie gazeuse

GRd : Gluthation réductase

GSH : Gluthation réduit

GSI : Index gonadosomatique

GSSG : Gluthation oxydé

GST : Glutathion-S-transférase

HHCB :1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[γ]-2-benzopyrane

KOH : Potasse

LC : Chromatographie liquide

LOEC : Lowest Observed Effect Concentration

LPO : Péroxydation des lipides
LySFF : Storage feedback factor
MeOH : Méthanol
MS : Spectrométrie de masse
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
MT : Métalothionéine
NOEC : No Observed Effect Concentration
non Se-GPX : glutathione peroxidase non Se-dépendante
NP : Nonylphénol
NPE : Nonylphénol éthoxylates
NPY :neuropeptide Y homologue
OCDE : Organisation de Coopération et de Développements Economiques
OP : Octylphénol
P : Progestérone
P450 scc : *$C_{20,22}$-desmolase*
PBS : Phosphate buffer saline
PCB : PolyChloroBiphényl
PCDD : PolyChloro DibenzoDioxines
PET : Polyethylène terephtalate
PMF : Penis Morphogenic Factor
RIA : RadioImmunoAssay
Rdt : Rendement
RXR : Récepteur X rétinoïde
Se-GPX : Glutathione peroxidase Se-dépendante
SOD : Superoxyde dismutase
STEP : Station d'épuration
T : Testostérone
TBT : Tributylétain
TCDD : 2,3,7,8-tétrachloro-dibenzop-dioxine
TG : Triglycéride
TPT : Triphénylétain
Vn : Vitelline
Vtg : Vitellogénine
Zn : Zinc

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure I-1 : Schéma théorique du mécanisme d'action du TBT d'après Oberdorster et McClellan-Green (2002).....36

Figure I-2 : Mécanisme d'action proposé pour l'induction d'imposex par la TBT (dans Sternberg *et al*., 2010).....38

Figure I-3 : Phylogénie simplifiée des gastéropodes d'après Ponder et Lindberg (1997) et Dinapoli et Klussmann-Kolb (2010). En italique, principaux gastéropodes d'intérêt écotoxicologique.....42

Figure I- 4 : *Potamopyrgus antipodarum* adulte.....43

Figure I- 5 : *Valvata piscinalis* adulte.....44

Figure I-6 : *P. antipodarum* femelle modifié d'après Fretter et Graham (1994).....46

Figure I-7 : Embryons sans coquille.....46

Figure I-8 : Embryons avec coquille.....46

Figure I-9 : Morphologie de *V. piscinalis* d'après Fretter et Graham (1994). A, animal sorti de sa coquille, B, animal rampant.....47

Figure I-10 : Anatomie de *V. piscinalis* d'après Fretter et Graham (1994).....49

Figure I-11 : Masse de *V. piscinalis*. A droite, schéma d'après Fretter et Graham (1994).....50

Figure I-12 : Juvénile de *V. piscinalis*.....50

Figure I-13 : Schéma théorique du contrôle hormonal de la reproduction chez les gastéropodes prosobranches d'après Joose (1988). DB : dorsal body, CDC : centro caudal cells.....74

Figure I-14 : Métabolisme des stéroïdes chez les Mollusques, d'après [1] Gottfried et Dorfman, 1970 ; [2] De Longcamp *et al*., 1974 ; [3] Lupo di Prisco et Dessi'Fulgheri, 1975 ; [4] Le Guellec *et al*., 1987 ; [5] Ronis et Mason, 1996 ; [6] Oberdörster *et al*., 1998b; [7] Morcillo *et al*., 1998a ; [8] Morcillo *et al*., 1999 ; [9] Le Curieux-Belfond *et al*., 2001 ; [10] Labadie *et al*., 2007.....82

FigurGe **I-15 :** Routes métaboliques de l'androstenedione et de la testostérone chez *M. cornuarietis* . L'épaisseur des flèches indique le taux de conversion de chaque métabolite, d'après Janer *et al*., 2005b, c, 2006a 84

Figure I-16 : Schéma de régulation endocrine théorique chez *E. peliompha* (Takeda, 1983) 93

Chapitre 2

Figure II-1 : Schéma théorique de l'organisation des différents marqueurs et de leurs liens avec la reprotoxicité 111

Figure II-2 : Niveaux de TG et protéines (moyenne et écart-type) lors d'une mise à jeun d'individus issus du laboratoire 124

Figure II-3 : Exposition de laboratoire typique 127

Figure II-4 : Système de dilution typique 127

Figure II-5 : Systèmes terrain 129

Figure II-6 : Installation de systèmes terrain 129

Publication n°1:

Figure 1: *Temperature (mean values and standard deviation) of the Rhone River over the year.* ***(p. 148)***
Figure 2: *Fecundity (as the number of embryos in the brood pouch, mean value and standard deviation) and embryo composition in P. antipodarum over the year.* ***(p. 149)***
Figure 3: *17β-œstradiol (E2, 10pg/snail) and testosterone (T, pg/snail) levels (mean values and standard deviation) in P. antipodarum jointly with fecundity of snails of the same length over the year (a<b<c<d; P<0.001, LSD test).* ***(p. 150)***
Figure 4: *Energy status (mean values and standard deviation) in P. antipodarum jointly with fecundity of snails of the same length over the year (a<b<c<d; P<0.001, LSD test). A: Triglycerides (TG, nmol/snail) levels; B: Cholesterol levels (nmol/snail), C: Protein levels (µg/snail).* ***(p. 151)***

Publication n°2:

Figure 1: *Chronology of embryonic development in P. antipodarum under control conditions and during fluoxetine exposure. At the beginning of the exposure (T0), snails were exposed to fluoxetine, which blocked early embryonic development, but late development continues. During the exposure in the fluoxetine-exposed snails, compared to controls, a decrease in unshelled embryo was observed first (T1: duration of development from oocyte to unshelled embryo), then both shelled and unshelled embryos (T2: duration of development from oocyte to shelled embryo), and finally neonates (T3: duration of development from oocyte to neonate).* ***(p. 155)***
Figure 2*: Effect of temperature on P. antipodarum reproduction (mean value and standard deviation. A. Cumulate number of neonates per snails in clean and fluoxetine-spiked water as a function of time of exposure. N=6 pools of 10 snails. B. Number of embryos in the brood pouch per adult in clean water as a function of time and temperature of exposure (a<b<c; P<0.05, Mann-Witney U-tests or LSD test; characters represent significant effects of temperature on embryos for a specific time, D14, 28, 42 or 56; italic characters stand for shelled embryos, bold characters for total embryos and simple characters for unshelled embryos). N=4 pools of 12 snails. C. Number of embryos in the brood pouch per adults in fluoxetine-spiked water in percentage of control as a function of temperature and time of exposure (* indicates a significant difference compared to control at the corresponding temperature, P<0.05, Mann-Witney U-tests or LSD test). N=4 pools of 8 snails.* ***(p. 156-157)***
Figure 3: *Effects of temperature on P. antipodarum energy status (mean value and standard deviation) as a function of temperature and time of exposure (a<b<c; P<0.05, LSD-tests, bold characters represent significant effects of time on TG, protein and cholesterol levels, non bold characters represent significant effects of temperature on TG levels for a specific time, D14, 28, 42 or 56). N=10 pools of 2 snails.* ***(p. 158)***

Figure 4*: Effects of temperature on P. antipodarum vitelline-like parameters (mean value and standard deviation) as a function of exposure time. A. Mean PBL levels (mg) per snail; B. Mean ALP levels (mg) per snail; C. ALP/PBL ratio (a<b; P<0.05, Mann-Whitney U-tests; bold, significant effects of time). N=three pools of ten snails.* ***(p. 176)***
Figure 5: *Effect of temperature of exposure on Testosterone (T in pg per snails) and 17β-œstradiol (E2 in 10xpg per snails) levels in snails (mean value and standard deviation) as a function of time and temperature of exposure (a<b; P<0.05, LSD-tests, italic characters represent significant effects on T levels for a specific time, D28 or 56, and non italic parameters are for E2 levels). N=10 pools of 2 snails* ***(p. 17)***

Chapitre 3

Figure III-1 : Structure du Fadrozole 183

Publication n°3:

Figure 1: *Chromatograms of standard mixtures of T-d2 and P-d9 and their corresponding mass spectra without saponification (1a) and after the saponification step (1b).* ***(p. 177)***
Figure 2: *MRM chromatograms of spiked (0.14 ng T and 0.17 ng P) samples from extraction of 20 snails upstream a WWTP.* ***(p. 177)***
Figure 3: *Linearity of the RIA method in 2, 4, 6 and 8 snails for T (slope=1.845), P (slope=0.62) and E2 (slope=7.281).* ***(p. 178)***

Publication n°4:

Figure 1: *Reproductive effects of fadrozole on P. antipodarum (mean value and standard deviation) as a function of fadrozole measured concentrations (2nd experiment).* indicates a significant difference from the control (* if P<0.05, ** if P<0.01 and *** if P<0.001, Mann-Witney U-tests or Dunnett-t test). A. Cumulated number of newborns per adult P. antipodarum expressed as the percentage of controls on day 42 B. Neonates expressed as the percentage of controls born during the last week of the experiment. C. Embryos in the brood pouch expressed as the percentage of controls per adult P. antipodarum on day 28. D. Embryos in the brood pouch expressed as the percentage of controls per adult P. antipodarum on day 42* ***(p. 187)***
Figure 2: *Histological results in fadrozole exposed snails and immunohistochemical localization of P450 aromatase in P. antipodarum gonadal (thickness 4 µm). AB. Typical cross sections of P. antipodarum controls showing the numerous ovarian follicles. CD. Typical cross section of 175.6 µg fadrozole/L exposed P. antipodarum. E. Typical immunostained longitudinal section of P. antipodarum controls follicles. Thick arrows indicate follicular cells (immunoreactive cells). F. Typical immunostained longitudinal section of 6.2 µg fadrozole/L exposed P. antipodarum.. G. Typical immunostrained longitudinal section of 175.6 µg fadrozole/L exposed P. antipodarum showing no aromatase reactivity. IT: interstitial tissue; Dig digestive tube; Ov: ovarian follicle; Alb: albumen gland; FC: follicular cells; Oo I: primary oocytes; Atr Fcl: Atretic follicle* ***(p. 189)***
Figure 3: *E2/T ratio in P. antipodarum on day 42 (mean value and standard deviation) as a function of fadrozole measured concentrations.* ***(p. 190)***

Figure III-2 : Nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum* après 28 jours d'exposition au fulvestrant 193

Figure III-3 : Pourcentage d'embryons par adultes *P. antipodarum* par rapport au témoin solvant après 28 jours d'exposition au fulvestrant 193

Figure III-4 : Nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum* après 42 jours d'exposition à la vinclozoline 196

Figure III-5 : Nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum* après 42 jours d'exposition à la vinclozoline 196

Figure III-6 : Nombre cumulé d'œufs par adultes *V. piscinalis* après 42 jours d'exposition à la vinclozoline 197

Chapitre 4

Figure IV-1 : Structure chimique de la fluoxétine 207

Publication n°5:

Figure 1: *Cumulated number of newborns per adult P. antipodarum and eggs per adult V.piscinalis at day 42 (mean value and standard deviation) as a function of fluoxetine nominal concentrations (corresponding to measured concentration of 1, 4.2, 13 and 69µg/L). *** indicates significant difference from the control (P<0.01, Dunnett-t test).* ***(p. 218)***
Figure 2: *Number of embryos in the brood pouch per adult P. antipodarum at day 42 (mean value and standard deviation) as a function of fluoxetine nominal concentrations (corresponding to measured concentration of 1, 4.2, 13 and 69µg/L). * indicates significant difference from the control (*P<0.05, Dunnett-t test, *** P<0.01, Dunnett-t test).* ***(p. 218)***
Figure 3: *A cross section of the P. antipodarum control (thickness 5µm). 1: embryos; 2: brood pouch; 3: muscle. B cross section of a 100 µg/L P. antipodarum (thickness 5µm). 1: muscle; 2: opercula.* ***(p. 219)***

Publication n°6:

Figure 1: *Length of the young H. azteca as a function of time and nominal concentration (control: black diamonds, 1.2 µg/L; black squares, 3.7 µg/L; black triangles, 11 µg/L; white squares, 33 µg/L; white triangles, 100 µg/L; white diamonds). Asterisk accounts for significant difference with the control (p < 0.05, Dunnet-t test).* ***(p. 226)***
Figure 2: *Length of Daphnia newborns from the third brood as a function of fluoxetine nominal exposure concentration. Asterisk indicates significant difference from the control (p < 0.05, Dunnet-t test).* ***(p. 226)***
Figure 3: *Number of newborns per P. antipodarum adult (mean value and standard deviation) as a function of fluoxetine nominal exposure concentration. Asterisk indicates significant difference from the control (p < 0.05, Dunnet-t test).* ***(p. 2226)***

Publication n°7:

Figure 1 : *Measured environmental concentrations (MECs, µg L^{-1}) of the sum of fluoxetine and norfluoxetine (if the latter was detected) in surface water samples collected from Canada and the UK with ranked biological no and low observed effect concentration thresholds (NOECs and LOECs, respectively). MEC, NOEC, and LOEC values were obtained from published literature data. The predicted no effect concentration for surface water ($PNEC_{SW}$) is indicated by the dashed line.* ***(p. 241)***

Publication n°8:

Figure 1 : *Levels of triglycerides (TG) in snails in µmol/g (mean value and standard deviation, n=10).* ***(p. 271)***

Chapitre 5

Publication n°9:

Figure 1*: Site localisation (the star represents the WWTP effluent discharge localisation).* ***(p. 286)***
Figure 2: *Number of embryos in the brood pouch per adult P. antipodarum at the end of the exposures (mean value and standard deviation). * indicates significant differences from the upstream site (*** P<0.01, Dunnett-t test). A. Saone river. B. Ardiere river. C. Bourbre river.* ***(p. 288)***
Figure 3: *17β̃estradiol levels (mean value and standard deviation) in the snails exposed upstream and downstream of WWTP effluent discharge at day 0, 7, 21 and 28 (a<b<c<d; P<0.05, Mann-Withney U-tests). A. Saone river. B. Ardiere river. C. Bourbre river.* ***(p. 289)***
Figure 4: *Testosterone levels (mean value and standard deviation) in the snails exposed upstream and downstream of WWTP effluent discharge at day 0, 7, 21 and 28 (a<b<c<d; P<0.05, Mann-Withney U-tests). A. Saone river. B. Ardiere river. C. Bourbre river.* ***(p. 290)***

Figure 5: *Progesterone levels (mean value and standard deviation) in the snails exposed upstream and downstream of WWTP effluent discharge at day 0, 7, 21 and 28 (a<b<c<d; P<0.05, Mann-Withney U-tests). A. Saone river. B. Ardiere river. C. Bourbre river.* ***(p. 291)***

Publication n°10 :

Figure 1*: Site localization. The diamond represents the 5 sites.* ***(p. 300)***
Figure 2: *Number of embryos in the brood pouch of P. antipodarum (mean value and standard deviation) as a function of exposure sites (a<b<c<d; P<0.005, Mann-Witney U-tests). N=30 snails. A. Embryos in the brood pouch per adult P. antipodarum on day 21. B. Embryos in the brood pouch per adult P. antipodarum on day 28* ***(p. 302)***
Figure 3: *Testosterone (T) and 17b-œstradiol (E2) levels in snails on day 0 and 28 (a<b<c; P<0.005, Mann-Witney U-tests). N=10 pools of 2 snails.* ***(p. 302)***
Figure 4: *Light microscopic view of typical cross section of P. antipodarum after 28 days exposure in different sites. A. Lot upstream, 1. Digestive gland and gonad, 2. Digestive tubule; B. Lot downstream, 1. Digestive gland and gonad, 2. Digestive tubule; C. Decazeville, 1. Digestive gland and gonad, 2. Digestive tubule; D. Moulin, 1,2. Gonad and digestive gland at different developing stages, 3,4. Digestive tubules; E. Joanis 1. Digestive gland and gonad, 2. Digestive tubule, 3. Hemocyte diapedesis. BC: basophilic cell, CC: calcium cell, DC: digestive cell, DG: digestive gland, He: hemocytes, Ov: ovocytes, Tub: digestive tubule.* ***(p. 304-305)***

Figure V-1 : Carte des sites d'exposition de la Bourbre 310

Figure V-2 : Débit de la Bourbre lors de l'exposition et pourcentage d'effluent de STEP dans la rivière.....312

Figure V-3 : Effets de l'exposition in situ à des effluents de station d'épuration sur le nombre d'embryons de *P. antipodarum* après 28 (B) et 42 jours (A). (a<b; P<0.01, LSD-test, les caractères soulignés représentent les différences d'embryons non coquillés entre sites à un temps donné, les caractères gras représentent les embryons coquillés et les caractères italiques les embryons totaux). 313

Figure V-4 : Effets de l'exposition in situ à des effluents de station d'épuration sur les niveaux d' E2 (A) et T(B) de *P. antipodarum*. (a<b<c<d; P<0.01, LSD-test, les caractères gras représentent l'effet du temps, et italique les différences entre sites à un temps donné).....317

Figure V-5 : Valeur des équivalents œstrogènes (EEQ) en ng/L des eaux des sites d'exposition de la STEP de Bourgoin 318

Annexes

Supplementary data Publication 4 :
Figure S1: *Reproductive effects of fadrozole on P. antipodarum (mean value and standard deviation) as a function of fadrozole measured concentrations on day 28 of the first experiment.* indicates a significant difference from the control (* if P<0.05, ** if P<0.01 and *** if P<0.001, Mann-Withney U-tests or Dunnett-t test).* ***(p. 377)***

Supplementary data Publication 7 :
Figure 1*: Chromatograms and retention times of fluoxetine and the fluoxetine-d5 standard (100 ng mL-1).* ***(p. 381)***
Figure 2: *Concentration-effect curve showing the influence of fluoxetine on the biomass integral of D. subspicatus as observed after 72 h.* ***(p. 384)***

Supplementary data Publication 9 :

Figure S1: *River and effluent flows during the exposure* ***(p. 387)***

Supplementary data Publication 10 :
Figure S1: *River flows during the exposure.* ***(p. 391)***
Figure S2: *Temperature at the exposure sites*. ***(p. 392)***

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I-1 : Effets de toxiques sur *P. antipodarum* au laboratoire 69

Tableau I-2 : Synthèse des éléments en faveur et en défaveur du rôle des stéroïdes chez les mollusques. -: en défaveur, ++: très en faveur, +/-: résultats mitigés.....88

Chapitre 2

Tableau II-1 : Niveaux de TG et de protéines (moyenne et écart-type) chez des individus du laboratoire et d'une population naturelle 124

Tableau II-2 : Conditions d'exposition générales lors d'expérimentations de laboratoire 128

Publication n°1:

Table 1: *Fecundity in control P. antipodarum depending on the experimentation conditions.* ***(p. 147)***

Publication n°2:

Table 1: *Fluoxetine concentrations (µg/L) in water during the exposure (Nd: not detected).* ***(p. 156)***

Chapitre 3

Tableau III-1 : Méthodes d'extraction publiées des stéroïdes en RIA 171

Tableau III-2 : Concentrations mesurées de vinclozoline ± écart-type (ND: non déterminé)...195

Publication n°3:

Table 1: *Precursor and product ions, cone voltage (Vcone), collision energy (Ecol), limits of detection (LOD) of the LC–MS/MS method, and intra-assay precision (CV) for T and P.* ***(p. 176)***
Table 2*: Performances of the RIA technique.* ***(p. 178)***
Table 3: *Levels of T, P, and E2 using LC–MS/MS (organisms collected in a river) and RIA technique (laboratory animals).* ***(p. 178)***
Table 4: *Steroids levels (in ng/g) in snails exposed to a WWTP effluent discharge using RIA and LC-MS/MS techniques.* ***(p. 178)***

Publication n°4:

Table 1: *Relative percentage of embryos with and without shells in the fadrozole exposure. .* indicates a significant difference from the control (P<0.01 Dunnett-t test).* ***(p. 188)***

Chapitre 4

Tableau IV-1 : Effet de la fluoxétine sur la survie des espèces non cible (ND: non déterminée) 210

Tableau IV-2 : Effet de la fluoxétine sur la croissance des espèces non cible.....210

Tableau IV-3 : Effet de la fluoxétine sur la reproduction des espèces non cibles 212

Publication n°5:

Table 1: *Effects of fluoxetine on the different endpoints for P. antipodarum, mean value (standard deviation). * indicates significant difference from the control (*P<0.05, Mann-Withney U-tests). The percentage of unshelled embryos were calculated based on the mean number of embryos without shells per adult compared to total embryos.* ***(p. 217)***
Table 2: *Effects of fluoxetine on the different endpoints for V. piscinalis, mean value (standard deviation), ND: non determined. * indicates significant difference from the control (*P<0.05, Mann-Withney U-tests)* ***(p. 219)***

Publication n°7:

Table 1: *Physical-chemical properties of fluoxetine relevant for fate assessment in Phase II Tier A* ***(p. 232-233)***
Table 2: *Standard long-term fluoxetine toxicity test datasets for effects assessment in Phase II Tier A and for use in deriving PNECSW. All reported concentrations are nominal unless otherwise indicated.* ***(p. 234)***
Table 3: *Physical-chemical properties of the metabolite norfluoxetine.* ***(p. 236)***
Table 4: *PECSURFACEWATER Refinement Phase II Tier B* ***(p. 237)***
Table 5*: Summary of estimated PEC values and PECs reported in literature.* ***(p. 238)***
Table 6: *Additional effect data of fluoxetine (nominal concentrations) on other species, non-standard endpoints or higher-tier systems.* ***(p. 239-240)***
Table 7: *Effects of fluoxetine (nominal concentrations) on sediment organisms* ***(p. 242)***

Chapitre 5

Tableau V-1 : Récapitulatif des expositions in situ réalisées chez les mollusques. 281

Publication n°9:

Table 1: *Effects of in situ exposures upstream and downstream of WWTP effluent discharges on P. antipodarum life traits (mean values and standard deviation). Bold characters indicate significant difference (P<0.05, Dunnett-t test or Mann-Withney U-test) from the upstream site.* ***(p. 287)***

Publication n°10 :

Table 1: *Metal concentrations in sites and whole P. antipodarum (µg/g dw) and survival, size of juveniles and energy reserve levels in P. antipodarum (a<b<c<d; P<0.005, Mann-Witney U-tests or LSD test). [a]Andres et al. (1999), [b]Grousset et al. (1999), [c]Morin et al. (2008); nd: not detected.* ***(p. 301)***

Tableau V-2 : Conditions physico-chimiques lors de l'exposition Bourbre 2009.....311

Tableau V-3 : Effets de l'expositions à un rejet de STEP sur la survie, croissance, les réserves énergétiques et les protéines Vn-like *chez P. antipodarum*.....315

Tableau V-4 : Effets de l'expositions à un rejet de STEP sur la survie, les niveaux de stéroïdes, les réserves énergétiques et les protéines Vn-like chez *V. piscinalis* 316

Chapitre 6

Tableau VI-1 : Principales caractéristiques des marqueurs développés (- correspond à une caractéristique peu marquée, et +++ très marquée).....333

Tableau VI-2 : Nombres d'embryons par P. antipodarum décrits dans la littérature suivant le type et les conditions d'experimentations.....343

Annexes

Supplementary data Publication 7 :

Table 1: *MS specific parameters of all analytes including limit of quantification (LOQ) and internal standard used for the quantification (IS)* ***(p. 380)***
Table 2: *Mean measured concentrations within the OECD 201.* ***(p. 382)***
Table 3: *Mean measured concentrations within the OECD 211.* ***(p. 382)***
Table 4: *Statistical characteristics of the biomass integral obtained from the algal growth inhibition test after 72 h exposure.* ***(p. 383)***
Table 5: *Statistical characteristics of mean cumulative offspring per survivor at day 21 obtained from the daphnia reproduction test.* ***(p. 385)***

Supplementary data Publication 9 :
Table S1: *Rivers and WWTP main characteristics.* ***(p. 388)***
Table S2: *Temperature and conductivity characteristics of the exposure sites during the exposure.* ***(p. 389)***

Supplementary data Publication 10 :
Table S1: *Conductivity and pH at the exposure sites*. ***(p. 393)***

VALORISATION SCIENTIFIQUE

LISTE DES PUBLICATIONS

Publication n°1:

Natural variability and response interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroids levels and energy status in a natural population of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Soumise à *General and Comparative Endocrinology.*
M. Gust, J. Mouthon, H. Queau, T. Buronfosse, J. Garric

Publication n°2 :

Is temperature of exposure a confounding factor for assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)? *Aquatic Toxicology*. 101, 396-404.
M. Gust , T. Buronfosse, C. André, R. Mons, F. Gagné, J. Garric

Publication n°3 :

Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like sex-steroids in prosobranch molluscs. 2010. *Journal of chromatography B*. 878, 1487-1492.
Gust M., Vuillet E., Garnier F., Giroud S., Couturier S., Garric J., Buronfosse T.

Publication n°4:

Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* to specific aromatase inhibitor. 2010. *Chemosphere*. 79, 1, 47-53.
Gust M., Garric J., Giamberini L., Mons R., Abbaci K., Garnier F., Buronfosse T

Publication n°5:

Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch molluscs, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. 2009. *Environmental Pollution*. 157, 2, 423-429.
Gust M., Buronfosse T., Giamberini L., Ramil M., Mons R., Garric J.

Publication n°6:

Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. 2008. *Chemosphere*. 73, 300-304.
Pery AAA., Gust M., Vollat B., Mons R., Ramil M., Fink G., Ternes T., Garric J.

Publication n°7:

An Environmental Risk Assessment for the Serotonin Re-uptake Inhibitor Fluoxetine - A Case Study Utilizing the European Risk Assessment Framework. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 6, 524-539.
Oakes K., Coors A., Escher B., Fenner K., Garric J., Gust M**.**, Knacker T., Küster A., Kussatz C., Metcalfe C., Monteiro S., Moon T., Parrott J., Pery A., Ramil M., Tarazona J.V., Sánchez Argüello P., Ternes T., Trudeau V., Van Der Kraak G., Servos M.

Publication n°8:

Bioaccumulation and metabolisation of fluoxetine in freshwater snails, *P. antipodarum* and *V. piscinalis.* Soumise à *Chemosphere*
Gust M., Cren-Olivé C. Bulete A., Buronfosse T., Garric J,.

Publication n°9:

***In situ* biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray): example of WWTP effluent discharges.** *Water Research*. 44, 4517-4528.
Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Quéau H., Mouthon J., Garric J.

Publication n°10:

Comprehensive effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the physiology of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*. 101, 100-108
Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Coquery M., Mons R., Abbaci K., Giamberini L., Garric J.

PARTICIPATION A DES CONGRES INTERNATIONAUX:

Is *Potamopyrgus antipodarum* reproduction monitoring an useful tool *in situ*? **Communication orale**. SETAC Europe 2010, Seville, Espagne.
Gust M., Buronfosse T., Gagné F., Geffard O., Garric J.

Potential use of *Potamopyrgus antipodarum* to assess endocrine disruption in laboratory and field studies. C**ommunication orale**. ISTA 14, 2009, Metz, France.
Gust M., Buronfosse T., Garric J.

In situ biomonitoring of freshwater quality using the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*. **Poster**. Modelkey final conference, 2009, Leipzig, Allemagne.
Gust M., Buronfosse T., Mons R., Quéau H., Geffard O., Garric J.

Development validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like steroids in prosobranch mollusc. **Poster**. EMEC10, 2009, Limoges, France.
Gust M, Vuillet E., Giroud B., Garric J., Buronfosse T.

Development validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like steroids in prosobranch mollusc. **Poster**. ISTA 14, 2009, Metz, France.
Gust M, Vuillet E., Giroud B., Garric J., Buronfosse T.

Impact of WWTP effluents using field exposure of gastropod *P. antipodarum*. **Poster**. Congrès SETAC Europe, 2009, Goteborg, Suède.
Gust M, Buronfosse T., Mons R., Quéau H., Geffard O., Garric J.

Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch molluscs, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. **Poster**. International conference on pharmaceuticals in the environment, 2007, York, UK
Gust M., Buronfosse T., Giamberini L., Ramil M., Mons R., Garric J.

PARTICIPATION A DES CONGRES NATIONAUX:

Potamopyrgus antipodarum : un outil de bioévaluation de la qualité des eaux de rivière ? **Poster**. SEFA 2010, Versailles, France.
Gust M., Buronfosse T., Mons R., Quéau H., Geffard O., Garric J.

Utilisation *in situ* d'un gastéropode prosobranche d'eau douce *Potamopyrgus antipodarum* pour évaluer l'impact d'une pollution metallique. **Communication orale**. Journées cluster environnement, 2010, Lyon, France.
Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Coquery M., Giamberini L., Garric J.

Development validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like steroids in prosobranch mollusc. **Poster**. Adebiotech, 2009, Romainville, France.
Gust M, Vuillet E., Giroud B., Garric J., Buronfosse T.

Impact of WWTP effluents using field exposure of gastropod *P. antipodarum*. **Poster**. Adebiotech, 2009, Romainville, France.
Gust M, Buronfosse T., Mons R., Quéau H., Geffard O., Garric J.

INTRODUCTION

Le milieu naturel subit depuis de très nombreuses années une anthropisation forte, associée à de nombreux rejets de substances chimiques aux effets inconnus, mais suspectés d'être à l'origine de problèmes de santé publique (augmentation de l'incidence des problèmes respiratoires en zone urbaine ou des cancers par exemple). Cela justifie une grande inquiétude des pouvoirs publics, d'autant plus que le coût de ces pathologies se chiffre en centaines de millions d'euros, en France seulement (données AFSSET). En parallèle de ces pathologies humaines imputables à la pollution environnementale, des effets sur la **reproduction** de l'homme et de la faune sauvage ont été observés, depuis quelques années. Chez l'être humain, il semblerait que l'incidence des cancers des testicules et du sein, la qualité du sperme ou encore des malformations génitales, soient liées à la présence de composés chimiques dans l'environnement. L'apparition de caractères sexuels femelles chez des poissons mâles et des diminutions de leurs populations ont pu être mises en relation avec des mimétiques œstrogènes. Ceci est dû à des molécules, dites **perturbateurs endocriniens** (Colborn *et al*., 1993; Kidd *et al*., 2007).

Les perturbateurs endocriniens sont des substances qui provoquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou sa descendance, secondairement à des changements de la **fonction endocrine** (OECD 1997).

Face aux risques avérés, mais encore insuffisamment connus, sur la santé humaine et des écosystèmes aquatiques, notamment, que représentent les perturbateurs endocriniens, l'Union Européenne a établi dans le cadre de la directive REACH (directive sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des produits chimiques), une liste prioritaire de 555 substances artificielles et 9 hormones de synthèse afin de concentrer et de coordonner les efforts de recherche au sein des différents pays de l'Union. En France, un programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens (PNRPE) a été lancé en 2005, afin d'identifier les principales questions urgentes et de les résoudre.

Ainsi, beaucoup d'efforts ont été fournis pour caractériser les effets des perturbateurs endocriniens sur les Vertébrés, mais peu sur les Invertébrés, alors qu'ils représentent 95% des espèces connues de la planète. Pourtant, les conséquences du TBT (tributylétain) chez les

gastéropodes, dits **prosobranches**, sont un des exemples les plus documentés des effets d'un perturbateur endocrinien sur les invertébrés aquatiques à un niveau populationnel du fait de la détérioration de leur fonction de reproduction (Matthiessen et Gibbs 1998). Ce phylum est donc sensible aux perturbateurs endocriniens. De plus les prosobranches ont une grande importance fonctionnelle dans les écosystèmes d'eau douce, et de multiples modes de reproduction, nutrition et habitats. En outre, des éléments sont en faveur du rôle potentiel des stéroïdes sexuels de type vertébrés dans leur reproduction. Cette dernière caractéristique, si elle est avérée, pourrait permettre la substitution des biotests sur poissons par des biotests sur mollusques (OECD, 2010). Les gastéropodes d'eau douce représentent donc un phylum intéressant pour répondre aux besoins d'indicateur de reprotoxicité et de perturbation endocrinienne, notamment en situation de terrain.

Cependant, les outils actuellement disponibles chez les gastéropodes prosobranches d'eau douce, sont essentiellement limités à la mesure individuelle de la fécondité. La mesure d'effets sur la reproduction au niveau de l'individu permet de tirer des conclusions sur l'altération potentielle de la dynamique de population. En revanche, une modification de cette mesure physiologique ne permet pas de différencier un effet reprotoxique seul, d'une perturbation de la fonction endocrinienne, qui provoquerait secondairement des effets sur la fécondité ou fertilité. Il est nécessaire d'aller au delà de cette mesure physiologique, trop intégrative, en approfondissant les connaissances sur les mécanismes de contrôle de la reproduction, et en mettant en place des marqueurs potentiels de perturbation endocrinienne. Cette démarche de laboratoire vise à faire le lien entre une modification de trait de vie et des marqueurs au niveau sub-individuel afin de mieux appréhender les modes d'actions sous jacents à l'apparition des effets toxiques. Ces connaissances peuvent, par la suite, être transférées dans des situations de terrain, afin d'évaluer leur pertinence lors d'expositions plus réalistes. Dans ce cadre, il s'avère nécessaire de calibrer les réponses et d'en connaître la variabilité naturelle.

Ce travail doctoral aborde ces problématiques en se centrant sur l'étude de deux espèces de gastéropodes d'eau douce, ***Potamopyrgus antipodarum*** et ***Valvata piscinalis***. Reposant sur une double approche laboratoire-terrain, il a pour objectif de mettre en place une démarche d'évaluation de **l'impact reprotoxique** de composés chimiques d'origine anthropique dans le

milieu naturel, en développant des **mesures d'effet au niveau sub-individuel et individuel** (modifications des traits de vie). Notre démarche consiste à (i) développer et valider des marqueurs à différentes échelles ; (ii) les appliquer lors d'expositions à des perturbateurs endocriniens potentiels en laboratoire et lors de tests *in situ* et d'évaluer leur pertinence ; (iii) et de comparer les sensibilités interspécifiques.

Le premier chapitre présente une **synthèse bibliographique** sur les connaissances relatives aux perturbateurs endocriniens et développe l'intérêt des mollusques pour l'évaluation de leurs effets Il aborde la biologie des espèces étudiées, et présente plus particulièrement des informations disponibles sur le contrôle de leur reproduction. Le deuxième chapitre est essentiellement méthodologique. Il présente le choix des **marqueurs suivis**, le développement et la validation de leur mesure ainsi que leur variabilité naturelle. Les différentes méthodologies d'exposition en laboratoire et sur le terrain sont décrites. Le troisième chapitre est dédié à l'exploration du rôle des **stéroïdes sexuels de type vertébrés** sur lesquels nous avons plus particulièrement travaillé afin d'améliorer les connaissances concernant le contrôle de la reproduction. Le quatrième chapitre expose l'application des marqueurs lors d'**expérimentations de laboratoire** à un perturbateur endocrinien potentiel, la fluoxétine, et le cinquième présente l'évaluation du stress reprotoxique engendré par des pollutions diverses ***in situ***.

Afin de faciliter la lecture de ce document, des encadrés de synthèse sont proposés à la fin de chaque chapitre. L'objectif est de résumer les principaux résultats et idées développées. En ce qui concerne l'état de l'art, une synthèse est réalisée à la fin de chaque thématique.

CHAPITRE 1 :

ETAT DE L'ART

A / PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1. Définition

L'éventuelle **perturbation des systèmes hormonaux** par des produits chimiques présents dans l'environnement, et les changements de **succès reproducteurs** et de la **fécondité** chez l'**homme** et la **faune sauvage**, qui pourraient être associés aux perturbateurs endocriniens, sont devenus un sujet majeur de préoccupation en toxicologie environnementale et en médecine depuis plus de vingt ans (Colborn *et al*., 1993).

Un perturbateur endocrinien est un **agent exogène capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles, qui sont responsables du maintien de l'homéostasie, et interviennent dans la reproduction et/ou le comportement**. Les perturbateurs endocriniens ne se limitent pas seulement aux œstrogènes environnementaux, mais correspondent à tous les agents qui ont des conséquences délétères sur le système endocrine (Crisp *et al*., 1998).

2. Historique des effets perturbateurs endocriniens

De nombreuses synthèses ont suggéré que des problèmes de santé publique chez l'homme et des effets adverses chez les animaux sauvages, pourraient être liés à des perturbateurs endocriniens (Colborn *et al*., 1993; Kavlock *et al*., 1996).

a. Effets observés chez l'homme

Les effets potentiels des perturbateurs endocriniens chez l'homme se traduisent par (Harrison *et al*., 1997) :

- L'augmentation de l'incidence des **cancers** du testicule, de la prostate et du sein (Colborn *et al*., 1993),
- Les diminutions temps dépendante de la qualité et quantité de **sperme** (Carlsen *et al*., 1992; Swan *et al*., 2000),
- L'augmentation de l'incidence du **cryptorchidisme** (non descente des testicules) et de **l'hypospadias** (malformation du pénis) (Carlsen *et al*., 1992),
- L'augmentation de l'incidence d'**ovaires polykystiques** chez la femme et,

- Les **développements** comportementaux et physiques anormaux des enfants.

Il est maintenant évident que certaines de ces tendances sont avérées. Chez la femme, l'incidence du cancer du sein a augmenté de manière constante et régulière ces dernières décades dans de nombreux pays industrialisés. De même, l'incidence des cancers testiculaires chez l'homme a dramatiquement augmenté dans les pays où le suivi est effectué. De nombreux auteurs font le même constat concernant le cancer de la prostate. Il est tout de même important de noter que des disparités spatiales fortes existent. Leur étude et leur compréhension permettraient sans doute de mieux comprendre l'étiologie de ces phénomènes inquiétants.

D'autres aspects de la santé reproductive des populations, tels que la cryptorchidie ou l'hypospadias, sont beaucoup plus difficiles à évaluer, du fait de la difficulté pour recruter des sujets d'étude et de l'enregistrement des anormalités à la naissance. Cependant, il est indéniable que la quantité de spermatozoïdes dans le sperme humain a diminué, ainsi que la qualité du sperme (physiologie et morphologie). Ces événements sont plus ou moins marqués suivant les pays, et il existe des inquiétudes considérables quant à la consistance et à la fiabilité des données de base et des méthodes de mesure. Les conséquences de ces phénomènes sur la fertilité mâle, de l'incidence de l'infertilité ou de la sub-fertilité dans une population ne sont pas connues. Il n'est pas prouvé non plus que la qualité du sperme soit un indicateur de la fertilité (Harrison *et al*., 1997).

Ainsi, bien qu'il y ait des tendances défavorables sur certains aspects de la santé de la reproduction humaine, les causes de ces tendances sont très méconnues. Tous ces changements sont apparus en une ou deux générations, et il est possible que les modifications de l'environnement dans lequel nous vivons (notamment le style de vie) puissent être, en partie, responsables. Une vaste gamme de facteurs possibles pouvant altérer la production de sperme a été suggérée, telle que, par exemple, la déficience alimentaire en sélénium. Cet élément est un composant fondamental des enzymes-sélénium-dépendantes, qui ont un rôle physiologique fondamental, dans la mobilité des spermatozoïdes, la morphologie testiculaire et le métabolisme de la testostérone plus particulièrement. La prise alimentaire de cet oligoélément a fortement diminué, ce qui pourrait induire une baisse de fertilité chez l'homme. Le fait de porter certains sous-vêtements a également été mis en cause dans la diminution de production spermatique. Les

changements de matériaux sont en question, ainsi que l'augmentation de température induite par le port de vêtements moulants (auteurs cités dans Harrison *et al*., 1997).

Il y a également la possibilité non négligeable que les **produits chimiques** que l'homme déverse dans l'environnement soient en cause. Les observations épidémiologiques, notamment concernant les tendances apparentes des différents cancers de l'appareil reproducteur, sont une source d'inquiétude, et devraient être suivies de près (Harrison *et al*., 1997). Les **pesticides** notamment sont souvent mis en cause (Swan *et al*., 2003).

Un exemple est le nématocide, 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP), pour lequel il a été mis en évidence une toxicité testiculaire des travailleurs suite à une exposition professionnelle. Les effets sont l'oligospermie et l'azoospermie, la diminution de fertilité et un sexe ratio significativement plus faible (plus de femelles que de mâles) dans la descendance des hommes exposés. Ils sont certainement dus à un déséquilibre hormonal (Tas *et al*., 1996).

Un autre exemple de médicament qui peut être néfaste pour le fœtus est celui du **DiEthylSilbœstrol** (DES), qui était prescrit aux femmes entre la fin des années 1940 et le début des années 1970, en prévention de la fausse-couche. Il a été à l'origine de problèmes de développement sévères du tractus génital femelle et mâle de la descendance. Les filles des femmes ayant pris ce traitement souffrent de dysfonctionnement des organes reproducteurs, de gestations anormales, de réduction de fertilité, de problèmes du système immunitaire, de dépression chronique. Elles présentent également des taux accrus d'adénocarcinomes du vagin à des âges anormalement jeunes. Cependant, aucune diminution de fertilité n'a été observée chez la descendance masculine des femmes traitées (Wilcox *et al*., 1995).

Il y a eu des soupçons de modification du sexe ratio après l'exposition environnementale accidentelle de Seveso en Italie en 1976. De 1977 à 1984, 74 naissances ont eu lieu dans la zone la plus fortement contaminée. Un excès de femelles a été noté (26 mâles pour 48 femelles). Les indices préliminaires suggèrent que cet élément soit associé à une forte exposition des deux parents aux dioxines. Sur une période plus récente (de 1985 à 1994), le ratio est descendu (60 mâles et 64 femelles) et n'a plus été significatif statistiquement (Mocarelli *et al*., 1996).

Bien que les connaissances sur l'endocrinologie humaine soient développées, il reste un nombre important de questions concernant les activités fonctionnelles des hormones et effets des déséquilibres hormonaux sur la fonction reproductive. Alors que les hypothèses basées sur

l'action des produits chimiques présents dans l'environnement sont actuellement très étudiées, d'autres éléments peuvent aussi avoir une influence, tels que le régime alimentaire, la température ou le climat et le style de vie en général (Harrison *et al*., 1997).

b. Effets observés chez la faune sauvage

Les changements observés dans le comportement et le système reproducteur de nombreuses espèces sauvages sont décrits depuis de nombreuses années. Les perturbateurs endocriniens ont été mis en cause ou supposés être la cause à de nombreuses reprises. Bien que les effets sur la faune sauvage soient importants en eux même, ils sont également à prendre en compte d'un point de vue prédictif pour la santé de l'homme. Cependant, il n'existe que très peu de cas dans lesquels, une relation de causalité irréfutable a été établie (Harrison *et al*., 1997).

α Mammifères

En Floride, une dégradation de la reproduction de la panthère de Floride a été suggérée comme étant due à l'exposition à des xéniobiotiques œstrogéniques. Les mâles présentaient une diminution du nombre de spermatozoïdes, un faible volume de l'éjaculat, une diminution de mobilité spermatique et un nombre important de malformations spermatiques. Comme ces panthères vivent dans un lieu où il y a beaucoup de **PCB**s, ils ont été suspectés (Facemire *et al*., 1995). Les PCBs ont aussi été incriminés lors de dégradations des performances reproductives des phoques (Brouwer *et al*., 1989; Tillitt *et al*., 1993).

β Oiseaux

Il existe de nombreuses études sur les problèmes reproductifs d'oiseaux sauvages, notamment ceux se nourrissant de poissons. Une forte mortalité embryonnaire et des juvéniles est associée à de l'œdème, des retards de croissance. Les coquilles des œufs de mouettes s'amincissent, les animaux ont des comportements reproductifs anormaux par exemple Les travaux se sont concentrés sur les lieux à forte contamination en perturbateurs endocriniens comme le **DDT** et ses métabolites, les **dioxines** et les **PCB**s. (Fry et Toone, 1981).

χ Reptiles

Un des cas les plus documentés de perturbation endocrinienne est celui des alligators du lac Apopka Floride. Ce lac a été très pollué par du **dicofol** et de l'acide sulfurique en 1980. Cette contamination a été suivie d'un déclin important de jeunes alligators, alors que les populations

augmentaient dans d'autres secteurs. Les femelles alligators du lac Apopka avaient une concentration plasmatique d'E2 deux fois plus importante que celles des femelles d'un lac non pollué. Elles avaient également une morphologie ovarienne anormale. Les mâles présentaient des testicules désorganisés et un pénis anormalement petit, et des concentrations plasmatiques de testostérone diminuées de trois-quarts par rapport à la norme. Ces désordres reproductifs, ainsi que le déclin de population associé ont été attribués au dicofol et ses métabolites (DDD, DDE, chloro-DDT). Cette étude a été la plus convaincante pour la mise en évidence de perturbateurs endocriniens dans le milieu (Guillette *et al*., 1994; Guillette *et al*., 1995). Plus récemment, des organochlorés ont été retrouvés dans les œufs de crocodiles au Canada (Wu *et al*., 2000).

δ Poissons

Les effets des rejets de STEP (**stations d'épuration**) sur les poissons sont bien documentés. Nous n'avons pas réalisé la bibliographie exhaustive sur le sujet, mais citons simplement quelques publications d'importance.

Dès 1980, l'apparition de caractères sexuels secondaires avait été observée chez des poissons moustiques (*Gambusia affinis holbrooki*) soumis à des effluents de papeterie. L'agent en cause n'était pas identifié, mais la masculinisation des poissons était claire (Howell *et al*., 1980). Il semblerait que ces phénomènes soient dus à des phytostérols (Tyler *et al*., 1998).

Au Royaume-Uni, l'apparition de poissons hermaphrodites (*Rutilus rutilus*) a été observée en aval de décharge d'effluents de STEP, présentant des substances œstrogéniques. Des études complémentaires ont ensuite été menées, qui ont démontré que ce phénomène était très étendu. La croissance testiculaire des poissons exposés était même réduite (Harries *et al*., 1996). Des résultats similaires ont été obtenus aux Etats-Unis (Folmar *et al*., 1996).

Harries *et al*. (1997) ont testé l'activité œstrogénique de cinq rivières du Royaume Uni dans lesquelles des effluents se déversaient à l'aide de la mesure de la vitellogénèse chez la truite *Oncorhynchus mykiss*. Cette étude a montré que des perturbateurs endocriniens présents dans les effluents de stations d'épuration pouvaient également exercer leurs effets dans les rivières dans lesquelles ils se déversent. Il est très possible que la présence de composés ayant ce type d'activité soit très fragmentée dans le milieu, sauf dans les cas de très forte pollution. La plupart des espèces de poissons d'eau douce migrent dans le gradient longitudinal au cours de leur vie. Il est donc fort probable qu'ils sont exposés à un moment ou à un autre à des substances

œstrogéniques. De plus, à certains moments de l'année, près de 80% du débit de certaines rivières sont constitués des effluents des stations d'épuration (Tyler *et al*., 1998).

Les concentrations en effluents des stations d'épuration dans la rivière représentent un agent causal majeur d'apparition d'intersex (présence simultanée des caractéristiques gonadiques mâles et femelles) chez les poissons (Jobling *et al*., 1998). Le même type d'étude a été réalisé dans les effluents de stations d'épuration dans le Michigan aux Etats-Unis. Les résultats n'ont pas montré d'effets significatifs sur *Pimephales promelas* (Nichols *et al*., 1999). Des stéroïdes sexuels ont été retrouvés dans les effluents domestiques. Ces composés d'origine naturelle sont certainement en cause dans les phénomènes de féminisation des poissons observés (Routledge *et al*., 1998).

Plus récemment, le lien entre ces effets au niveau de l'individu et les **conséquences sur la population** après quelques années d'exposition, a été fait (Kidd *et al*., 2007).

ε *Invertébrés*

Les effets du TBT (**tributylétain**) chez les escargots marins sont un des exemples les plus documentés des effets d'un perturbateur endocrinien sur les invertébrés aquatiques, avec un effet au niveau de la population (Matthiessen et Gibbs, 1998). Nous étudierons ce phénomène plus en avant dans la partie sur les mollusques et leur intérêt pour l'évaluation de l'effet des EDCs.

Bien que des données terrain et épidémiologiques montrent une association forte entre des détériorations de la fonction reproductive et l'exposition à des perturbateurs endocriniens, il est encore très difficile de lier directement un effet observé à une molécule précise (Tyler *et al*., 1998). L'impact relatif d'autres facteurs environnementaux sur la reproduction ne doit pas être oublié. Ainsi, les destructions d'habitats et les modifications de disponibilité de ressource alimentaire dues à la chasse, la pêche, ne doivent pas être occultés. Ces éléments rendent encore plus difficile l'évaluation des effets des perturbateurs endocriniens sur les populations (Harrison *et al*., 1997).

3. Modalités de perturbation de la fonction endocrinienne

Les hormones sont des produits sécrétoires naturels de glandes endocrines et voyagent par le sang, pour exercer leurs fonctions à distance auprès d'organes ou de tissus cibles. Leur nature chimique est variée : glycoprotéines, polypeptides, peptides, stéroïdes, acides aminés modifiés, catécholamines, prostaglandines et acide rétinoïque. Elles sont transportées dans le sang à de très faibles concentrations (ng ou pg/ml), sous forme libre ou liée à une protéine de transport. Elles se lient à des récepteurs nucléaires ou cellulaires spécifiques, et exercent des rôles majeurs de régulation, croissance et homéostasie. Les hormones stéroïdes et thyroïdiennes se lient à des récepteurs et régulent l'expression de gènes. Les hormones protéiques et peptidiques fonctionnent par transmission de signal (second messager cellulaire) pour réguler les canaux ioniques et les enzymes. En plus des hormones retrouvées chez les vertébrés supérieurs, il existe des hormones chez les invertébrés (l'ecdysone des crustacés) et les plantes (auxins). (Crisp *et al*., 1998)

L'intérêt récent pour les perturbateurs endocriniens provient d'études expérimentales et épidémiologiques chez l'homme et la faune sauvage, avec une mention particulière pour les expositions dans les **stades de vie précoces** (Harrison *et al*., 1997). Une des préoccupations majeures se porte sur les **effets permanents** et intenses que ces composés ont lorsque l'exposition a lieu pendant ces périodes critiques. Cependant, les effets d'une exposition chronique après la maturité sexuelle présente également un risque non négligeable (Colborn *et al*., 1993). Il faut noter que très souvent les effets ont lieu **longtemps après** l'exposition (Sonnenschein et Soto 1998).

Les effets des perturbateurs endocriniens peuvent se manifester de diverses manières. Ils peuvent s'exprimer d'une façon totalement différente, avec des conséquences permanentes, lors d'exposition pendant le développement embryonnaire. Les effets peuvent changer le cours du développement et le potentiel de la descendance, avec le résultat variant suivant les périodes de développement qui ont été exposées. Les effets sont également souvent différés, et donc ne sont pas toujours totalement ou clairement exprimés avant la maturité de la descendance (Colborn *et al*., 1993). Ainsi, la dose, la charge corporelle, le moment, la durée d'exposition pendant des périodes critiques sont des considérations importantes dans l'évaluation des effets

néfastes dus aux perturbateurs endocriniens. Ces effets peuvent aussi bien être réversibles ou irréversibles, immédiats ou retardés (Crisp *et al*., 1998).

Les effets sur la reproduction et sur le système hormonal des perturbateurs endocriniens sont dus à leur capacité de (d'après Crisp *et al*., 1998) :

1. **Mimer ou antagoniser les hormones endogènes** tels que les œstrogènes ou les androgènes,

L'altération des liaisons entre l'hormone naturelle et son récepteur peuvent être à l'origine d'actions agonistes (et antagonistes). Le méthoxychlore, le chlordécone, le DDT, certains PCBs et les alkylphénols sont des œstrogénomimétiques. La vinclozoline est un antiandrogène reconnu. Le métabolite du DDT, le *p,p'*-DDE présente également ces caractéristiques *in vitro*.

2. **Altérer les schémas de synthèse et de métabolisation** des hormones naturelles,
   a. Altération de la synthèse.

De nombreux composés sont capables d'inhiber la synthèse de nombreuses hormones. Certains agents inhibent une étape enzymatique clef de la stéroïdogénèse (aminoglutéthimide, cyanokétone, kétoconazole). La biosynthèse d'œstrogènes peut être inhibée par des inhibiteurs de l'aromatase, tels que le fénarimol. L'altération de la synthèse des hormones protéique peut être induite par les stéroïdes gonadiques. Des modifications de la glycosilation d'hormones glycoprotéiques sont à l'origine d'une perte d'activité.

   b. Altération du stockage et de l'excrétion

Les catécholamines sont stockées dans des granules intracellulaires, ce qui permet de les relâcher rapidement à la demande. Sans ce système de stockage, elles sont rapidement dégradées et inefficaces. L'amphétamine altère le stockage.

   c. Altération du transport et de la clearance

De nombreuses hormones sont liées à des transporteurs sanguins chez les mammifères. La régulation de la concentration de ces globulines de transport affecte la disponibilité des stéroïdes notamment. La clearance des hormones est modifiée par les composés ayant une action sur les enzymes du foie.

4. **Modifier les niveaux de récepteurs endogènes et les activations post-récepteur** (Sonnenschein et Soto 1998).

L'exposition à la TCDD est à l'origine de la diminution de la sensibilité des récepteurs des hormones stéroïdes à leur ligand. Suite à la liaison du récepteur à son ligand, une cascade d'événements cellulaires à lieu, pour assurer la transduction du signal. Le lindane diminue le turno-over du phosphatidylinositol et donc diminue l'activation de la protéine kinase C (protéine indispensable à la transduction du signal cellulaire). Le tamoxifène réduit également l'activité de cette protéine (Crisp *et al*., 1998).

Les systèmes endocriniens variés des Mollusques sont certainement sujets à des modulations par un nombre important et pas forcément prédictible de composés chimiques (Oehlmann et Schulte-Oehlmann 2003; Oetken *et al*., 2004).

4. Exemples de perturbateurs endocriniens

Aucune relation structure-activité n'est prédictible du potentiel perturbateur endocrinien ne permettant de préjuger du caractère perturbateur endocrinien d'une molécule donnée. En conséquence, les EDCs se définissent par un mécanisme d'action, et, leur nature est très diverse. Nous donnons dans cette partie quelques exemples d'EDCs connus.

a. Hormones et dérivés

α Œstrogènes de synthèse

Les œstrogènes synthétiques sont très actifs, et parfois même plus que le 17β-œstradiol naturel. Le **17α-ethinyl-œstradiol** (EE_2), qui est très utilisé dans les pilules contraceptives, est potentiellement dangereux pour la faune sauvage. Il pénètre dans l'environnement aquatique par les décharges de stations d'épuration (Desbrow *et al*., 1998). Il a des actions à de très faibles concentrations sur la faune aquatique (Jobling *et al*., 1996).

β Œstrogènes naturels

Il y a des composés naturels présents dans l'environnement qui peuvent avoir des effets œstrogéno-mimétiques, tels que les mycœstrogènes produits par des champignons, ou les

phytœstrogènes produits par des plantes (Makela *et al*., 1994). En se basant sur les propriétés structurales, ces composés peuvent être divisés en plusieurs groupes : les isoflavonoïdes (Génistéine, équol, daidzeine), les coumestans (coumestrol) et les lignans (enterolactone). Ces composés ont des activités œstrogéniques, mais également d'anti-androgènes (Markaverich *et al*., 1995). Les effets de l'exposition à des **phytœstrogènes** semblent être dépendants de la période d'exposition. Ils sont présents en quantité non négligeable dans l'alimentation d'herbivores et d'omnivores, et donc les degrés d'exposition dépendent de l'alimentation (Tyler *et al*., 1998). Des études expérimentales tentant d'évaluer leurs effets sur les poissons montrent que ces composés interfèreraient avec la synthèse endogène de stéroïdes sexuels (Maclatchy et Vanderkraak 1995).

Il est impossible de ne pas citer **17β-œstradiol**, l'**œstrone** et l'**œstriol**. Les stéroïdes naturels sont très actifs et ont des effets sur les écosystèmes aquatiques à de très faibles concentrations. La première source de production sont les femmes cyclées qui excrètent énormément de stéroïdes dans leurs urines (Tyler *et al*., 1998). L'excrétion se fait sous forme conjuguée, qui est ensuite libérée dans l'environnement par des bactéries (Shore, 1993).

b. Pesticides et biocides

α Pesticides organochlorés

Les effets sur la reproduction du **DDT** et de ses métabolites ont été très étudiés *in vivo* et *in vitro*. L'o,p'-DDT induit de nombreux syndromes de féminisation, aussi bien chez les mammifères, que chez les oiseaux (Tyler *et al*., 1998) et les poissons (Donohoe et Curtis 1996). Le p,p'-DDE est également un anti-androgène très puissant.

Dans les pays industrialisés, l'utilisation de pesticides à base de DDT est très limitée, à cause des conséquences très importantes qu'il a sur les animaux aquatiques et terrestres. Néanmoins il est toujours présent dans l'environnement du fait d'une très forte résistance à la biodégradation. Par exemple, la demi-vie du DDT et de certain de ses métabolites est de plus de 50 ans (Tyler *et al*., 1998).

β Vinclozoline

La vinclozoline est un fongicide qui était très utilisé pour traiter le raisin, les fruits, les végétaux et le houblon contre les attaques de champignons. Il n'est pas persistant, mais

rapidement dégradé. Ses deux métabolites principaux sont reconnus pour leurs propriétés anti-androgènes chez les mammifères (Kelce *et al*., 1994) et les poissons (Sperry et Thomas 1999).

χ Organoétains

Le **tributylétain** (TBT) et les composés proches sont utilisés comme biocides, notamment comme peinture anti-salissure sur les bateaux. Les effets du TBT sur les populations de mollusques ont été très étudiés (Matthiessen et Gibbs 1998).

c. Produits issus de l'industrie

α PCBs (Polychlorinated Biphenyls)

Les PCBs sont des contaminants environnementaux ubiquistes et persistants, qui sont très problématiques en tant que polluants aquatiques. Les PCBs sont des mélanges de composés aromatiques chlorés issus de la chloration du biphenyl. Un total de 209 congénères est possible théoriquement, mais moins de la moitié est en fait responsable de la totalité de la pollution environnementale attribuée aux PCBs. De plus, moins de 25 congénères sont retrouvés dans les tissus des invertébrés, poissons, oiseaux et mammifères (McFarland et Clarke 1989). De la même façon que les organochlorés, les PCBs sont présents majoritairement dans l'hémisphère nord, mais leur utilisation est toujours intensive dans l'hémisphère sud, ce qui conduit à des augmentations de concentrations (Tyler *et al*., 1998).

Les PCBs non-ortho-substitués peuvent dégrader les processus reproductifs des poissons (Monosson *et al*., 1994). Certains PCBs ortho-substitués ont des activités œstrogéniques et une affinité forte pour le récepteur aux œstrogènes. Ces effets sont décrits chez les vertébrés et sont dose-dépendants (Bergeron *et al*., 1994; Tyler *et al*., 1998).

Certains PCBs hydroxylés ont une structure similaire à la thyroxine. Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle majeur dans la prolifération des cellules de Sertoli, qui sont responsables du développement testiculaire des nouveau-nés, chez les mammifères. Une réduction dose-dépendante de la concentration plasmatique de thyroxine ainsi que des anomalies de développement ont été observés chez la descendance de rattes exposées à l'Arochlor 1254 pendant a gestation (Goldey *et al*., 1995). D'autres auteurs rapportent une augmentation de la taille des organes génitaux mâles, et une augmentation de la quantité de sperme journalière produite (Cooke *et al*., 1996).

β Dioxines

Les **PCDDs** (PolyChloro DibenzoDioxines) sont constitués de 75 congénères, et la **TCDD** (2,3,7,8-tétrachloro-dibenzop-dioxine) est considérée comme la plus toxique pour la reproduction. L'exposition d'animaux en cours de gestation à de faibles concentrations de ce composé est à l'origine de l'altération de leur système reproducteur mâle (démasculinisation) de la descendance. Beaucoup de ces effets ne sont pas détectés avant la puberté. La capacité de la dioxine à agir comme perturbateur endocrinien semble dépendre du tissu cible, et de l'espèce étudiée (Tyler *et al*., 1998).

χ Alkylphenols

Les alkylphénols sont des surfactants non-ioniques qui ont été utilisés ces 50 dernières années principalement pour la fabrication de plastiques, d'élastomères, de produits phytosanitaires et de détergents industriels. Les **Nonylphénol éthoxylates** (NPEs) sont les plus fréquents. Leur activité œstrogénique est connue depuis de nombreuses années (Tyler *et al*., 1998). Les alkylphénols se lient au récepteur à œstrogène, et le nonylphénol et l'**octylphénol** peuvent aussi interagir avec le récepteur androgène des mammifères (Soto *et al*., 1991).

Les alkylphénols testés *in vivo* ont des activités œstrogéniques chez le poisson (Jobling et Sumpter 1993; Jobling *et al*., 1996), et induisent la synthèse de vitellogénine (Harries *et al*., 1997). L'octylphénol administré à des rattes gestantes est à l'origine de la diminution du poids des testicules et de la quantité de sperme produite chez la descendance mâle (Sharpe *et al*., 1995).

δ Produits dérivés des polycarbonés et résines Epoxy

Le **Bisphénol-A** (BPA) est un composé synthétique utilisé dans la production de polycarbonate pour la fabrication d'une grande gamme de produits plastiques. Il a des propriétés œstrogénomimétiques très fortes. Il se lie au récepteur aux œstrogènes (Routledge et Sumpter 1996).

ε Phtalates

Les phtalates sont des composés chimiques très abondants dans l'environnement. Un faible nombre est très utilisé pour donner des propriétés de flexibilité au plastique. Ils sont également utilisés comme insectifuges, cosmétiques, encres décoratives et huiles de lubrification.

Certains composés sont faiblement œstrogéniques chez les vertébrés (Gangolli 1982; Jobling *et al*., 1995; Harries *et al*., 1997). Ils sont fréquemment retrouvé dans le milieu aquatique (Sheldon et Hites 1978; Gledhill *et al*., 1980; Wine *et al*., 1997).

5. Présence de toxiques dans l'environnement

De nombreux polluants, dont certains sont des perturbateurs endocriniens, sont retrouvés dans les eaux de pluie, les puits, les lacs et les océans, ainsi que dans les produits terrestres, d'eau douce et marin. De très nombreux perturbateurs endocriniens ont été dispersés dans l'environnement en grande quantité depuis la deuxième guerre mondiale (Colborn *et al*., 1993).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de contaminants organiques dans les **eaux de surface**. Par exemple, aux Etats-Unis, les composants détectés font partie d'une vaste gamme de produits d'origine résidentielle, industrielle ou agricole. Les composés les plus fréquemment isolés sont le coprostanol (stéroïde fécal), le cholestérol (stéroïde animal et végétal), le *N,N*-diéthyltoluamide (insectifuge), la caféine (stimulant), le triclosan (désinfectant antimicrobien), le tri(2-chloroéthyl)phosphate (retardateur de flamme) et le 4-nonylphénol (métabolite de détergent). Les concentrations sont basses, de l'ordre **µg/L** ou **ng/l** (Kolpin *et al*., 2002). La présence de nombreuses substances pharmaceutiques dans les eaux de surface a également été étudiée (Ternes 1998; Metcalfe *et al*., 2003b; Boyd *et al*., 2004), ainsi que des perturbateurs endocriniens avérés ou des hormones (Desbrow *et al*., 1998; Fromme *et al*., 2002). La plupart de ces composés se retrouve également dans les **effluents** de stations d'épuration à des concentrations plus importantes (Ternes 1998; Metcalfe *et al*., 2003a; Metcalfe *et al*., 2003b).

6. Problématiques soulevées par les EDCs

Dans les expériences de laboratoire, les expositions sont **courtes**, ce qui n'est pas toujours représentatif de ce qu'il se passe dans l'environnement. Les effets peuvent s'exprimer des années plus tard du fait de la bioaccumulation. De même, en laboratoire, les tests ne se font qu'avec une seule substance, alors que dans le milieu naturel, les organismes sont exposés à de **multiples composés** en même temps. Enfin, certains **stades de vie** sont plus sensibles que d'autres aux polluants (Tyler *et al*., 1998).

a. Bioaccumulation, bioconcentration, biodisponibilité, biodégradation, biotransformation, biomagnification

Même lorsqu'un perturbateur endocrinien est identifié dans le milieu, s'il ne pénètre pas dans l'organisme, il n'aura pas de conséquences. Ainsi, ce sont les concentrations dans les organismes qui sont importantes.

La **biomagnification** (concentration dans la chaîne alimentaire) peut aussi arriver, et les prédateurs en fin de chaîne sont alors plus touchés (concentrations corporelles plus élevées), que les organismes de maillons inférieurs (Tyler *et al*., 1998).

La **bioaccumulation** d'un composé chimique dans les organismes aquatiques est la conséquence des contaminations de l'eau et de la nourriture. Chez les organismes terrestres, la nourriture semble être la source principale de contamination. Du fait de leur persistance et de leur nature lipophile, les organochlorés, les PCB, les alkylphénols et certains xénœstrogènes peuvent entrer facilement dans les cellules et se bioaccumuler (Tyler *et al*., 1998). Par exemple les concentrations de DDT dans des oiseaux d'Amérique du Sud sont faibles, alors que celles de son métabolite, le DDE sont bien plus élevées (Mora 1997). Les dioxines et les furanes s'accumulent également de manière importante (Larson *et al*., 1996).

La bioaccumulation ne va pas toujours de paire avec la **biodisponibilité**. Les composés lipophiles peuvent se retrouver bloqués dans les tissus gras, et donc ne pas être disponibles pour les tissus et organes cibles. Cependant, chez de nombreux animaux, les réserves graisseuses subissent un turn-over régulier, et donc les toxiques qu'ils contiennent peuvent être remobilisés. Lors de ces périodes, les organes cibles sont exposés à des concentrations relativement élevées de contaminants (Tyler *et al*., 1998). Enfin, les protéines de liaisons extracellulaires sont responsables de la plus ou moins grande quantité de composés présents sous forme libre et donc capable de se fixer à un récepteur. Suivant les capacités des organismes à lier ou non les xénobiotiques, ils seront donc plus ou moins biodisponibles (Tyler *et al*., 1998).

La plupartdes perturbateurs endocriniens subissent des **biotransformations**, qui affectent leur activité. Celle-ci peut être aussi bien diminuée qu'augmentée. Ainsi, les métabolites des alkylphénols sont plus œstrogéniques que leurs composés parents (Jobling et Sumpter 1993). De même, le DDE est plus actif que le DDT (Tyler *et al*., 1998).

b. Mélanges de composés chimiques

Dans l'environnement, les animaux sont exposés aux mélanges de produits chimiques présents. Il est donc important de savoir évaluer les effets des **mixtures** de xénobiotiques sur la faune sauvage, plutôt que celui de composés isolés (Rittschof et McClellan-Green 2005). Cela devient encore plus complexe lorsque l'on considère la nature variée des composés présents. Par exemple l'exposition de rats à des mélanges de PCBs, PCDFs et PCDDs induit des gammes de réponses qui ne peuvent s'expliquer que par une synergie des composés (Li et Hansen 1996). La plupart des études qui prennent en compte les effets des mélanges se font *in vitro* (Jobling *et al*., 1995; Soto *et al*., 1995; Sumpter et Jobling 1995), mais des études *in vivo* se mettent en place (Escher et Hermens 2002; Corcoran *et al*., 2010).

c. Période critique d'exposition

Les expositions se font généralement sur des adultes à des concentrations élevées d'hormono-mimétiques. Cependant, des concentrations bien inférieures peuvent être délétères pour la santé reproductive, si elles sont appliquées pendant de **longues périodes** ou lors d'une **période critique** dans le développement précoce de l'individu (Tyler *et al*., 1998). C'était le cas, par exemple, lors de l'exposition de fœtus humains *in utero* au DES (Sharpe *et al*., 1995). Chez *Danio rerio*, des auteurs ont montré que la période d'exposition (adulte, juvénile, nouveau-né) était cruciale en terme de sensibilité et d'irréversibilité de certains effets (Brion *et al*., 2004).

d. Effets sub-létaux

En considérant que les effets sub-létaux des polluants sont comparables aux effets secondaires des médicaments, il est possible que les impacts existent à tous les niveaux d'organisation (de l'expression de gènes, au métabolisme, à la morphologie ou au comportement). Ainsi, l'évaluation des conséquences sub-létales des contaminants ainsi que la compréhension de modèles animaux définis sont importants (Rittschof et McClellan-Green 2005).

e. Spécificité d'espèce

L'ensemble des espèces des écosystèmes aquatiques présente une variabilité phylogénétique importante. Ainsi, un perturbateur endocrinien reconnu chez une espèce peut avoir des actions très différentes dans d'autres espèces. Ces différences de sensibilité peuvent

provenir de spécificités écologiques (exposition supérieure, habitat, alimentation, place dans le réseau trophique), ou plus physiologiques (métabolisation différente, absence de cible, affinité pour la cible…). Les différences sont d'autant plus marquées lorsque l'on travaille chez les invertébrés. Les systèmes hormonaux deviennent très éloignés et les effets ne sont plus du tout prédictibles.

Les perturbateurs endocriniens présentent des **natures** très diverses : pesticides, produits issus de l'industrie, médicaments, substances naturelles…

Ils sont **présents dans les milieux aquatiques** et leurs effets ont déjà été observés sur la faune sauvage, notamment sur le milieu aquatique.

Les effets des **mélanges** sont à mieux évaluer, ainsi que les **expositions sur le long terme à de faibles doses**.

Il existe des **stades de vie critiques** pour les expositions.

B / INTERET DES MOLLUSQUES GASTEROPODES DITS « PROSOBRANCHES »

L'étude des effets des polluants environnementaux chez les Invertébrés est très importante dans la mesure où ils représentent plus de **95%** des espèces connues du règne animal, et sont aussi des espèces clés pour le fonctionnement des écosystèmes. Ils sont une partie insuffisamment étudiée de la biodiversité globale, bien qu'extrêmement importante. Au sein des invertébrés, les Mollusques sont eux-mêmes extrêmement diversifiés (Dillon 2000; Oehlmann et Schulte-Oehlmann 2003; Oetken *et al*., 2004; Strong *et al*., 2008). Les Gastéropodes représentent environ 85% des Mollusques, et les mollusques dits « prosobranches » en regroupent une part non négligeable (Oehlmann *et al*., 2007). Il existerait plus de 4000 espèces de gastéropodes dulcicoles (Strong *et al*., 2008).

Le nombre limité d'exemples connus de perturbations endocrines chez les invertébrés s'explique par le manque de connaissance de leur système hormonal par rapport à celui des vertébrés. Aussi le développement de biomarqueurs spécifiques est très limité (Rotchell et Ostrander 2003 et littérature citée).

1. Caractéristiques biologiques d'intérêt

Les **Mollusques**, qui représentent un des embranchement les plus diversifiés et les plus riches du règne animal, sont des cibles potentielles de contaminants chimiques. Pourtant l'impact des toxiques n'est que rarement étudié sur ce phylum, qui ne fait partie d'aucune **batterie de tests** mises en œuvres pour l'évaluation du risque des substances (Defur 2004; Rittschof et McClellan-Green 2005), bien que des propositions de biotest soient en cours à l'OCDE (OECD 2010).

Les mollusques sont **communs**, facilement **repérables**, importants écologiquement et économiquement en tant que ressource alimentaire. La possibilité de travailler avec **tous les stades évolutifs**, depuis des œufs en train d'éclore, jusqu'aux adultes en reproduction est avantageuse. Le mode de vie **sédentaire** (ou fixé pour certains mollusques) de beaucoup de stades adultes de ce taxon permet d'étudier de manière préférentielle la bioaccumulation et la biomagnification des polluants métalliques et organiques, ainsi que les processus reproductifs

(Oberdorster *et al*., 1998) et les modifications morphologiques (Rittschof et McClellan-Green, 2005). Les échecs reproductifs (Gibbs *et al*., 1991b), et la castration comportementale de certains mollusques (Straw et Rittschof 2004) en réponse aux apports anthropogéniques est également en faveur de leur utilisation en tant que modèle en écotoxicologie et particulièrement pour l'étude des perturbateurs endocriniens (Rittschof et McClellan-Green 2005). Leur **système endocrinien** est principalement neuroendocrine et produit des neuropeptides (Joose 1988). Bien que le rôle des stéroïdes sexuels n'ait pas été confirmé, leur présence et leur biosynthèse sont avérées. Il semble que leur système hormonal soit, pour partie, proche de celui des vertébrés, dont l'homme (Porte *et al*., 2006; Janer et Porte 2007; Lafont et Mathieu 2007). Les effets endocriniens mis en évidence pourraient donc être extrapolables à l'homme. Ce sont des modèles puissants, surtout si les approches se font à plusieurs niveaux : du niveau moléculaire, jusqu'au niveau de l'écosystème (Rittschof et McClellan-Green 2005).

Au sein de ce taxon, les gastéropodes dits **prosobranches** sont des espèces clefs des milieux aquatiques, et jouent un rôle fonctionnel capital dans ces écosystèmes. Malgré cela, ils n'ont été que très peu utilisés en écotoxicologie comparé à d'autres invertébrés comme les arthropodes, les bivalves, les nématodes ou les annélides (Oehlmann *et al*., 2007).

Ils ont un intérêt non négligeable en tant que modèles d'études pour les perturbateurs endocriniens, car ils présentent une grande variété de **modes reproductifs** (hermaphrodites, gonochoriques, parthénogénétique), et de **modes de nutritions**, ce qui permet de suspecter des modes de contaminations divers (Oehlmann *et al*., 2006). D'autre part les systèmes endocriniens variés des mollusques sont certainement sujets à des modulations par un nombre important et pas forcément prédictible de composés chimiques (Oehlmann et Schulte-Oehlmann 2003; Oetken *et al*., 2004). Cependant pendant de nombreuses années les études ont principalement été menées sur des espèces marines, du fait de l'exemple connu du TBT (voir paragraphe suivant). Depuis le début des années 2000, quelques études ont été publiées sur la sensibilité d'espèces d'eau douce à des EDCs connus (Oehlmann *et al*., 2007).

Leur **sensibilité** à différents types de perturbateurs endocriniens a été montrée (Oehlmann *et al*., 2000; Tillmann *et al*., 2001). Chaque type de perturbateurs endocriniens a induit des réponses caractéristiques. Les xéno œstrogènes provoquent une « super féminisation » des organismes caractérisée par des malformations anatomiques chez les femelles, et conduisant à des mortalités et une stimulation massive des oocytes et de la ponte, alors que les androgènes

conduisent à la masculinisation des femelles avec le développement d'un imposex et une diminution nette de la fécondité. Des auteurs ont montré une stimulation de la production d'embryons chez un gastéropode (*Potamopyrgus antipodarum*) exposé à des concentrations environnementales d'œstrogène de synthèse (17α-éthinylestradiol de 1-25ng/L), avec un effet inhibiteur pour des expositions plus importantes (Jobling *et al*., 2003). La sensibilité des réponses et la caractérisation d'endpoints spécifiques ont conduit à proposer la mesure de la reproduction chez *P. antipodarum* comme test d'effets perturbateurs endocriniens des substances chimiques dans le cadre du groupe d'expert *ad hoc* de l'OCDE (Invertebrate testing) (Duft *et al*., 2007; Matthiessen 2008; OECD 2010).

Ce taxon semble donc être très intéressant pour étudier les effets des perturbateurs endocriniens. Il est représentatif d'autres espèces des écosystèmes et simple à étudier.

2. Cas des Mollusques et du TBT

Les effets du TBT (**tributylétain**) chez les gastéropodes dits prosobranches sont un des exemples les plus documentés des effets d'un perturbateur endocrinien sur les invertébrés aquatiques, et de ses conséquences au niveau de populations entières (Matthiessen et Gibbs 1998). Les études sur les impacts des organoétains sont des éléments très en faveur de l'utilisation des prosobranches en tant que modèle.

Les organoétains sont utilisés comme catalyseurs et stabilisateurs dans certaines gommes et plastiques (Takahashi *et al*., 1999), et des biocides à large spectre pour les revêtements antisalissures (Michel et Averty 1999). Par exemple, l'exposition de gastéropodes à des niveaux sub-létaux (ng/l) est à l'origine d'effets tels que des modifications du métabolisme des **cytochromes P450** (Oberdorster *et al*., 1998), ou des phénomènes **d'imposex** qui est un syndrome de superposition d'organes génitaux de type mâles, comme le pénis et le canal déférent chez des gastéropodes femelles parasitées ou non (Smith 1971).

a. Historique

L'existence de femelles présentant des caractères mâles chez les gastéropodes gonochoriques constitue un fait décrit depuis les années 1970 (Blaber 1970; Smith 1971). Cette anomalie a ensuite été décrite sur les côtes françaises sur *Ocenebra erinacea*. Certaines femelles

présentent un pénis, et le TBT est la cause vraisemblable de cette masculinisation des femelles (Féral et Le Gall 1982).

Nucella lapillus est un gastéropode marin dont la population a été très touchée par l'imposex, et l'induction de caractères sexuels mâles chez les femelles. Les populations proches des centres maritimes et plaisanciers sont celles qui ont été le plus touchées, et le degré d'imposex a augmenté significativement de 1969 à 1985, parallèlement à l'introduction et l'usage plus fréquent des peintures antisalissures comprenant du TBT. De fortes concentrations de TBT ont également été retrouvées au sein des organismes touchés, et ont été mises en relation avec la longueur du pénis des femelles touchées. Les effets sont suffisamment marqués pour provoquer un **déclin de la population**, non pas du à une augmentation de mortalité, mais par une **diminution de succès reproductif**. Ce phénomène semble **irréversible** (Bryan *et al*., 1986). Les concentrations induisant l'imposex chez cette espèce sont très basses, de l'ordre du **ng/l** (Gibbs *et al*., 1991a). Différents stades d'imposex ont été proposés, suivant la gravité de la masculinisation (Oehlmann en 1996).

Depuis, de très nombreuses espèces ont été décrites comme atteintes d'imposex. Ce genre de phénomène a été observé, notamment chez *Urosalpinx cinerea* en Grande Bretagne, chez qui la population a très fortement décliné, avec des individus restant majoritairement âgés. Les femelles sont soit stériles à cause des malformations qu'elles ont subit, soit trop âgées pour se reproduire. Les auteurs n'ont observé aucune ponte viable sur la période d'observation, de 1987 à 1990 (Gibbs *et al*., 1991c). Cependant, les effets dépendent des espèces considérées. Chez certaines, la reproduction ne semble pas affectée (Gibbs *et al*., 1991b). Egalement, les effets peuvent ne pas passer par l'imposex, mais par une diminution de la production d'œufs, étant à l'origine d'une modification de la population chez *Littorina littorea* (Matthiessen *et al*., 1995). Des auteurs ont montré qu'une **castration comportementale** avait lieu. Ainsi, les escargots morphologiquement normaux ne se reproduisent pas non plus dans les sites où il y a beaucoup d'imposex (Straw et Rittschof 2004). Par ailleurs, le TBT induit des réponse à un niveau inférieur, avec la production de protéines de choc thermique (HSP) chez *Ilyanassa obsoleta*, aussi bien en exposition que sur les individus retrouvés sur le terrain (Oberdorster *et al*., 1998), ainsi que chez *R. decussata* (Sole *et al*., 2000).

Actuellement, plus de **150 espèces** de Mollusques sont touchées par l'imposex dans le monde (Matthiessen *et al*., 1999). Le plus souvent, ce sont des populations côtières (Oehlmann *et*

al., 1996). Des protocoles d'évaluation de la présence de TBT dans les eaux en utilisant l'imposex comme indicateur d'exposition aux organoétains ont vu le jour (Ellis et Pattisina 1990).

La France a été le premier pays à limiter l'usage des peintures antisalissures, en interdisant l'utilisation du TBT pour les bateaux de moins de 25m, en 1982. La Grande Bretagne a suivi cette décision en 1987. Depuis l'application de peintures contenant du TBT a été interdite pour tous les bateaux en 2003. En conséquence à ces interdictions, la quantité de TBT présente dans l'environnement a diminué et parallèlement, les effets sur les gastéropodes ont également diminué (Matthiessen *et al*., 1995). Cependant les améliorations des premières années ne se perpétuent pas et la quantité de TBT présente dans l'environnement stagne. Lorsque des études sont effectuées, les concentrations environnementales de TBT sont majoritairement (75%) au dessus des concentrations sans effet (1ng/l). Il existe toujours des sources de pollution persistantes, et des mesures doivent être prises pour enrayer ce phénomène (Michel et Averty 1999). Même actuellement, le TBT est retrouvé dans les eaux côtières à des concentrations supérieures à celles qui induisent des effets biologiques (Chen *et al*., 2009).

b. Mécanisme d'action potentiel

Le mécanisme d'action du TBT est controversé. Il existe, à l'heure actuelle, plusieurs mécanismes d'action différents proposés, impliquant soit les **hormones stéroïdiennes**, soit les **neuropeptides** ou le récepteur X rétinoïde (**RXR**).

α Stéroïdes sexuels de type vertébrés

ॐ Inhibition de l'activité P450-aromatase

Spooner *et al.* (1991) ont montré que l'exposition à 40ng/l de TBT de *N. lapillus* était à l'origine d'accumulation de la molécule dans les tissus et d'imposex (mesuré par une augmentation significative de la taille du pénis). En parallèle ils ont noté une augmentation significative du taux de **testostérone** (T) après 28 et 42 jours (mais aucun effet sur la progestérone et le 17β-œstradiol, E2). Ils ont supposé que cette accumulation d'hormone était à l'origine des modifications morphologiques. Les auteurs ont confirmé cela en injectant de la testostérone à des femelles. Elles ont alors développé un phénomène d'imposex. Bien qu'ils ne l'aient pas prouvé, leur hypothèse est que cela passait par l'inhibition de l'aromatase cytochrome P450 dépendante.

Des femelles de *N. lapillus* et *H. reticulata* ont été exposées pendant 5 à 6 mois à des concentrations de TBT allant de 12 à 244ng/l. L'imposex a été induit chez les deux espèces en deux mois, et a été associé à une augmentation dose-dépendante des concentrations de T dans les escargots de toutes les concentrations au bout de six mois. De plus, les escargots présentant les degrés d'imposex les plus avancés avaient également les concentrations en T les plus élevées. De même que dans l'étude précédente, la T seule (500ng/l) induit l'imposex (Bettin *et al*., 1996).

Les mêmes auteurs ont répété cette expérience avec du TBT et un mélange d' E2 et d'œstrone (500ng/l de chaque). Le développement d'imposex a été essentiellement inhibé, ce qui a été interprété comme la conséquence du retour du ratio androgène/œstrogène à la normale. En effet, ce ratio augmente de manière dose-dépendante chez *N. lapillus*, mais n'est pas significatif chez *N. reticulatus*. Chez cette espèce, les niveaux d'E2 deviennent même élevés après 4 mois d'exposition (Bettin *et al*., 1996).

Une exposition de ces deux espèces à un inhibiteur non spécifique de l'aromatase (1-méthyl-1,4-androstadiène-3,17-dione), mer pendant 5 mois, a bloqué irréversiblement la conversion des androgènes en œstrogènes. L'imposex a ainsi été induit dans les deux espèces, mais dans une moindre mesure qu'avec du TBT (Bettin *et al*., 1996).

Les mêmes auteurs ont montré que les concentrations de TBT et DBT les escargots en bon état étaient capables de débutyler le TBT. Les auteurs ont supposé que le TBT et la T rentraient en compétition pour le même système métabolique (l'aromatase). Ainsi, dans les conditions de terrain, le TBT inhiberait l'aromatase cytochrome P450 dépendante (Bettin *et al*., 1996).

Cette conclusion est supportée en partie par une exposition de 6 mois à du TBT (122 et 488ng/l) d'un gastéropode d'eau douce gonochorique, *Marisa cornuarietis*, qui a montré une augmentation de la concentration de T dans les individus, et une faible et transitoire diminution d'E2. Une augmentation du ratio T/E2 a été observée chez les animaux exposés. Les variations de concentrations entre animaux étaient très fortes, ce qui empêche de conclure plus en avant (Schulte-Oehlmann *et al*., 1995).

Il est intéressant de noter que le TBT interagit significativement *in vitro* avec les flavoprotéines réductases du système microsomial monooxygénase chez *R. decussata*, et les inhibe significativement à des concentrations de 50µM de TBT (Morcillo et Porte 1997). Une autre étude a montré que le TBT était à l'origine de la réduction du métabolisme total de la T *in*

vitro, cependant, aucune différence n'est observée *in vivo*. Par contre, des modifications du profil des métabolites de la T *in vitro* et *in vivo* sont présentes. Une forte diminution de l'aromatisation de la T en œstrone et E2 est observée chez les animaux exposés au TBT, ce qui montre une inhibition spécifique de l'activité de l'aromatase par le TBT. Cela peut être du à une inhibition directe de l'enzyme, ou alors à un effet indirect comme une régulation négative, étant donné qu'aucun effet n'a été observé avec des microsomes incubés *in vitro* avec du TBT. En outre, l'activité aromatase des microsomes est très faible (0,15pmol/h par mg de protéine) comparé au métabolisme total de la T (300 à 400pmol/h par mg de protéine). Ainsi, les interactions du TBT avec cette enzyme ne sont certainement pas responsables à elles seules de l'augmentation de concentration de la T, bien qu'elle puisse tout de même augmenter le ratio T/E2. Ces résultats ne permettent pas de conclure quant à une importance physiologique de ces mécanismes (Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b). Chez *R. decussata* et *M. galloprovincialis* il semble également que le TBT inhibe l'aromatase. De même que précédemment, les auteurs ne pensent pas que cette seule activité explique l'apparition de l'imposex (Morcillo *et al*., 1999).

Chez *Buccinum undatum*, l'activité de l'aromatase cytochrome P450-dépendante a été étudiée chez des individus provenant de sites plus ou moins contaminés en TBT. Cette activité était significativement plus élevée chez les femelles normales que chez les femelles souffrant d'imposex. Une corrélation négative très forte a été retrouvée entre la quantité de TBT dans les organismes et l'activité de l'aromatase. Les auteurs ne sont pas sûrs de l'action directe ou indirecte du TBT sur cette enzyme (Santos *et al*., 2000).

En conclusion, bien qu'aucune expérience n'ait réussi à prouver que le mécanisme d'action du TBT passait par une inhibition de l'aromatase cytochrome P450 dépendante, il semble que ce soit une possibilité. Cependant, il y a des incompréhensions, notamment le fait, qu'il n'existe pas de relation temps-dépendante entre l'augmentation des concentrations de T et la croissance du pénis chez les femelles (Bettin *et al*., 1996). Il y a des contradictions entre la réduction de l'activité aromatase-like et l'avancement des symptômes d'imposex chez le Gastéropode *Bolinus brandaris* (Morcillo et Porte 1999).

- **Inhibition de la 5α-réductase**

Le métabolisme de la T chez *I. obsoleta* exposée au TBT, et provenant du terrain a été étudié. Des différences existent entre les escargots présentant de l'imposex issus du terrain, et ceux dont l'imposex a été induit par l'exposition à du TBT au laboratoire. Chez les individus

provenant du terrain, il y a une diminution significative de l'activité de la 5α-réductase, qui induit une augmentation de la concentration de la T, par absence de catabolisme (arrêt de la transformation en dihydro-testostérone, DHT). Chez les individus chez lesquels l'imposex a été induit en laboratoire, et lors des premières phases de l'imposex, il n'y a pas de changement global du métabolisme de la T. Il y aurait plutôt une tendance à l'augmentation de l'activité réductase (Oberdorster *et al*., 1998).

Chez *M. cornuarietis* le TBT inhibe aussi l'activité 5α-réductase *in vitro* particulièrement la formation de DHT et de dihydo-androstenedione (DHA) à partir d'androstenedione. Cependant, lors d'expérimentations *in vivo* de 150 jours à des concentrations induisant l'imposex, le métabolisme de l'androstenedione est modifié uniquement chez les femelles (Janer *et al*., 2006a). Une autre étude, plus récente, montre que le TBT induirait *in vitro* la 17β-HSD chez *Hexaplex trunculus*. Ainsi, il semble que le TBT soit capable d'interférer avec de nombreuses enzymes clefs de la stéroïdogenèse (Lyssimachou *et al*., 2008).

ॐ Interaction avec un récepteur aux androgènes

D'autres éléments sont en faveur de l'interaction du TBT passerait avec un récepteur aux androgènes. Des femelles de *N. lapillus* et *H. reticulata* ont été exposées pendant 5 mois à du TBT (122ng/l) et un antiandrogène (acétate de cyprostérone, 1,25mg/l), qui antagoniserait le récepteur à la T. Le développement de l'imposex a été totalement inhibé, ce qui est en faveur d'une action du TBT par une élévation des niveaux de T. Des différences ont été observées entre les deux espèces, certainement dues à un nombre de récepteurs à la T différent. Cela expliquerait alors, que l'imposex n'ait pas lieu chez toutes les espèces gonochoriques. Ces résultats suggèrent un rôle du récepteur aux androgènes (Bettin *et al*., 1996; Santos *et al*., 2005).

ॐ Inhibition de l'excrétion de la testostérone

Des études sur *L. littorea* ont débouché sur un mécanisme d'action alternatif. Des microsomes de la glande digestive ont été utilisés pour les expériences, après vérification de la présence de cytochrome P450. Des études *in vitro* montrent que le métabolisme global de la T serait peu impacté. Le TBT a induit une diminution de T et de ses métabolites sulfatés, ce qui diminue son excrétion, et donc augmente les concentrations tissulaires. Le TBT bloquerait la sulfo-conjugaison de la T et de ses métabolites (et donc leur excrétion) (Ronis et Mason 1996). Il faut tout de même préciser que l'exposition est de très courte durée, et que les concentrations de

TBT utilisées sont très au-dessus de celles se trouvant dans l'environnement (Matthiessen et Gibbs 1998).

β Mécanisme neurohormonal

Ces hypothèses sont nées des lacunes présentées par les mécanismes d'action passant par les hormones stéroïdiennes. En effet, si une réelle inhibition de l'aromatase P450-dépendante survient, lorsque la conversion de la T en E2 est bloquée, il devrait y avoir des changements dans les titres de ces deux hormones, ce qui n'est pas le cas. De plus, si l'augmentation du taux de T est à l'origine de la masculinisation, les titres de l'hormone devraient augmenter avec l'apparition d'imposex, ce qui n'est pas le cas non plus. Lors des premières phases de l'imposex, les taux de T ne sont pas encore modifiés (Oberdorster 2001).

Féral et Le Gall (1982) avaient proposé un mécanisme neurohormonal. Il semblerait que cette hypothèse soit probable, dans la mesure où le TBT est une neurotoxine qui a un tropisme ganglionnaire et active la libération du facteur morphogénique par une action directe. En effet, lors de l'exposition de *O. erinacea* au TBT (200ng/l), 35% des ganglions pédieux présentent une activité morphogénique. Ce facteur morphogénique est la neurohormone **PMF** (Penis Morphogenic Factor) qui induirait le développement de caractères sexuels mâles secondaires, et un rétro-contrôle positif maintiendrait ces structures. La T serait alors produite par les tissus nouvellement apparus. Oberdorster et McClellan-Green (2000) ont déterminé que l'**APGWmide** était un neuropeptide induisant l'imposex chez *I. obsoleta* à des concentrations très basses (10^{-12} moles pendant 2 semaines), bien inférieures à celles de la T. L'activité de ce neuropeptide semble être supérieure à celle du TBT.

Cette hypothèse a été travaillée plus en avant, en induisant les cytochromes P450 (par du 3-méthylcholantrene, 3MC), afin d'éliminer plus rapidement le TBT et la testostérone. Cela a eu pour conséquence de réduire l'apparition d'imposex chez des escargots exposés en même temps à du TBT ou de la T. De même, le rétrocontrôle positif semble être perturbé par l'administration conjointe d'E2 et de TBT ou de T. Cependant, ni le 3MC, ni l'E2 n'ont pu réduire l'apparition de l'imposex induit par l'APGWamide, ou induire eux-même l'imposex (Oberdorster 2001; Oberdorster et McClellan-Green 2002).

Les mêmes auteurs concluent que l'AGPWamide est certainement le PMF, dans la mesure où l'administration exogène induit une croissance du pénis chez les mâles, et que les concentrations endogènes d'APGWamide chez les mâles au pénis les plus longs sont plus

élevées. Ils estiment que ce facteur aurait le même rôle que la LH ou la FSH chez les Mammifères (Oberdorster *et al*., 2005). Il semblerait donc que les hypothèses d'action du TBT via des neuropeptides et des hormones stéroïdiennes ne soient pas contradictoires (Figure I-1).

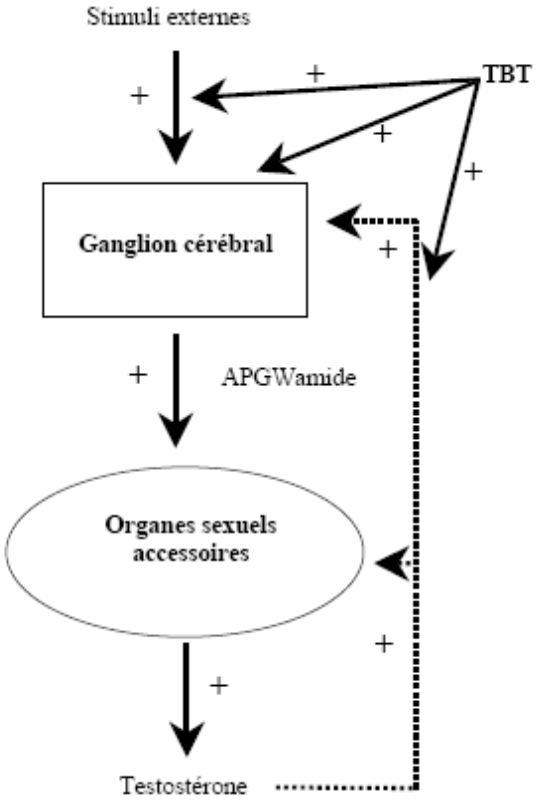


Figure I-1 : Schéma théorique du mécanisme d'action du TBT d'après Oberdorster et McClellan-Green (2002)

χ *Récepteur X Rétinoïde (RXR)*

Plus récemment, une étude a mis en évidence, chez *Thais clavigera*, les relations entre le TBT et le RXR. Il semble que le TBT et le TPT augmentent fortement les interactions protéines-protéines entre le hRXR et le coactivateur TIF2. Leur action est supérieure à celle du 9-cis acide rétinoïque (9-cis RA), qui est le ligand naturel du RXR. Il semble que les organoétains soient des **agonistes des RXRs**. Cependant, il n'a pas été trouvé d'action avec d'autres récepteurs nucléaires, dont les récepteurs de l'acide rétinoïque, qui lie pourtant le 9-cis AR. Une compétition *in vitro* entre du 9-cis RA marqué et du TBT et TPT a montré que l'affinité de ces composés pour les RXRs était identique. Le RXR cloné du gastéropode a des similarités

fortes avec la P-box du domaine de liaison à l'ADN, et l'hélice 4 du domaine de liaison au ligand. Ainsi, le RXR de *T. clavigera* est proche de celui des vertébrés et invertébrés connus. De plus, le RXR de *T. clavigera* est capable de se lier au 9-cis RA, bien que ce soit celui d'un mollusque. Enfin, des injections de 9-cis RA, ont induit de l'imposex (Nishikawa *et al*., 2004). Une autre étude chez *N. lapillus* et *N. reticulatus* n'a pas permis de reproduire ces résultats (Oehlmann *et al*., 2007), ce qui est probablement due au mode d'administration de l'acide rétinoïque (Castro *et al*., 2007a).

Certains auteurs ont montré l'importance de la signalisation RXR dans la recrudescence des mâles et femelles chez *I. obsoleta* (Figure I-2): une signalisation précoce stimule la recrudescence mâle, alors qu'une stimulation tardive stimule une recrudescence femelle (Sternberg *et al*., 2008b). Ainsi, le TBT pourrait induire le développement de caractères sexuels mâles chez les femelles (imposex) en initialisant la voie de signalisation du RXR prématurément chez les femelles pendant la fenêtre temporelle de recrudescence mâle. Cette hypothèse est soutenue par la fait que l'action du TBT, chez les femelles, ne se met en place que lors de la fenêtre temporelle de recrudescence mâle (Sternberg *et al*., 2010).

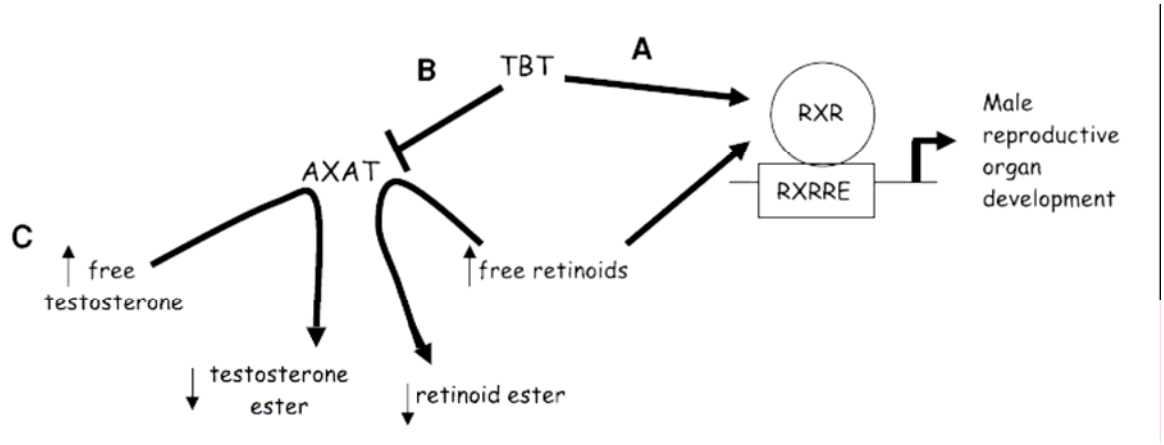


Figure I-2 : Mécanisme d'action proposé pour l'induction d'imposex par la TBT (dans Sternberg *et al.*, 2010).[a]

[a] (Le TBT active la voie de signalisation du RXR afin d'initier la transcription de gènes nécessaire au développement du tractus génital mâle. A: directement en se liant et activant le RXR. B : indirectement, en inhibant l'acyl coenzyme A :acyltransferase (AXAT), induisant une augmentation de l'acide rétinoïque (et T) endogènes. Le RXR est ensuite activé par l'acide rétinoïque endogène libre. Le RXR stimule la transcription de gène via l'interaction avec le RXR responsive elements (RXRRE). De la même façon, la T exogène (C) inhibe de manière compétitive l'estérification de l'acide rétinoïque, provoquant l'augmentation de l'acide rétinoïque endogène, qui active la voie de signalisation du RXR.)

Les mollusques gastéropodes dits « prosobranches » sont importants **écologiquement** dans les systèmes aquatiques d'eau douce.

Ils n'appartiennent à **aucune batterie de test**.

Ils ont des **caractéristiques biologiques** intéressantes, notamment concernant leurs **modes de reproduction**.

Ils sont **sensibles aux perturbateurs endocriniens** :

- Au laboratoire ;
- Sur le terrain avec l'exemple du **TBT**, qui met en avant l'importance potentielle de la **voie de synthèse des stéroïdes**.

C / CARACTERISTIQUES DES ORGANISMES DE TRAVAIL

Deux espèces de mollusques gastéropodes dits prosobranches sont support d'étude : ***Valvata piscinalis*** et ***Potamopyrgus antipodarum***. Leur physiologie, notamment leur mode de nutrition et de reproduction, ouvrent différentes perspectives à la fois en terme de faisabilité, de voies d'exposition et de mécanismes d'effets des perturbateurs endocriniens.

L'espèce *V. piscinalis* a été sélectionnée lors de la thèse de V. Ducrot. Le laboratoire dispose d'élevages et de méthodologies d'exposition (Ducrot *et al*., 2006). La mesure de la reproduction chez *P. antipodarum* comme test d'effet perturbateurs endocriniens des substances chimiques dans le cadre du groupe d'expert *ad hoc* de l'OCDE (Invertebrate testing, Duft *et al*., 2007; Matthiessen 2008; OECD 2010) a été proposée. C'est une espèce d'importance croissante dans les tests d'écotoxicologie. Elle est également utilisée au laboratoire et sur le terrain pour évaluer l'impact de substances ou de rejets toxiques.

1. Classification

Jusqu'au milieu des années 1990, *P. antipodarum* et *V. piscinalis* faisaient partie de la sous-classe des **Prosobranches**. Cependant des avancées sur les marqueurs moléculaires principalement, ont conduit à modifier la phylogénie des Gastéropodes. Ainsi les sous-classes bien connues des Pulmonés, Opistobranches et Prosobranches ont disparu (Ponder et Lindberg 1997). Nos deux espèces modèles ont ainsi été placées dans des ordres différents, les **Caenogastéropodes** regroupant la majorité des anciens Prosobranches, et les **Hétérobranches** qui regroupent principalement les anciens Pulmonés, Opistobranches et quelques Prosobranches.

Cependant la classification utilisant les Prosobranches est encore très utilisée et très souvent citée, voire la nouvelle phylogénie est totalement occultée dans les publications d'écotoxicologie. Nous présentons donc ici un schéma de la phylogénie simplifiée de nos deux espèces de travail (Figure I-3), ainsi que des espèces de gastéropodes majeures en écotoxicologie. Néanmoins, nous utiliserons les appellations de Prosobranches, Pulmonés et Opistobranches au cours du manuscrit pour faciliter la compréhension du lecteur. En effet, il semble que la phylogénie des Gastéropodes soit encore en pleine évolution.

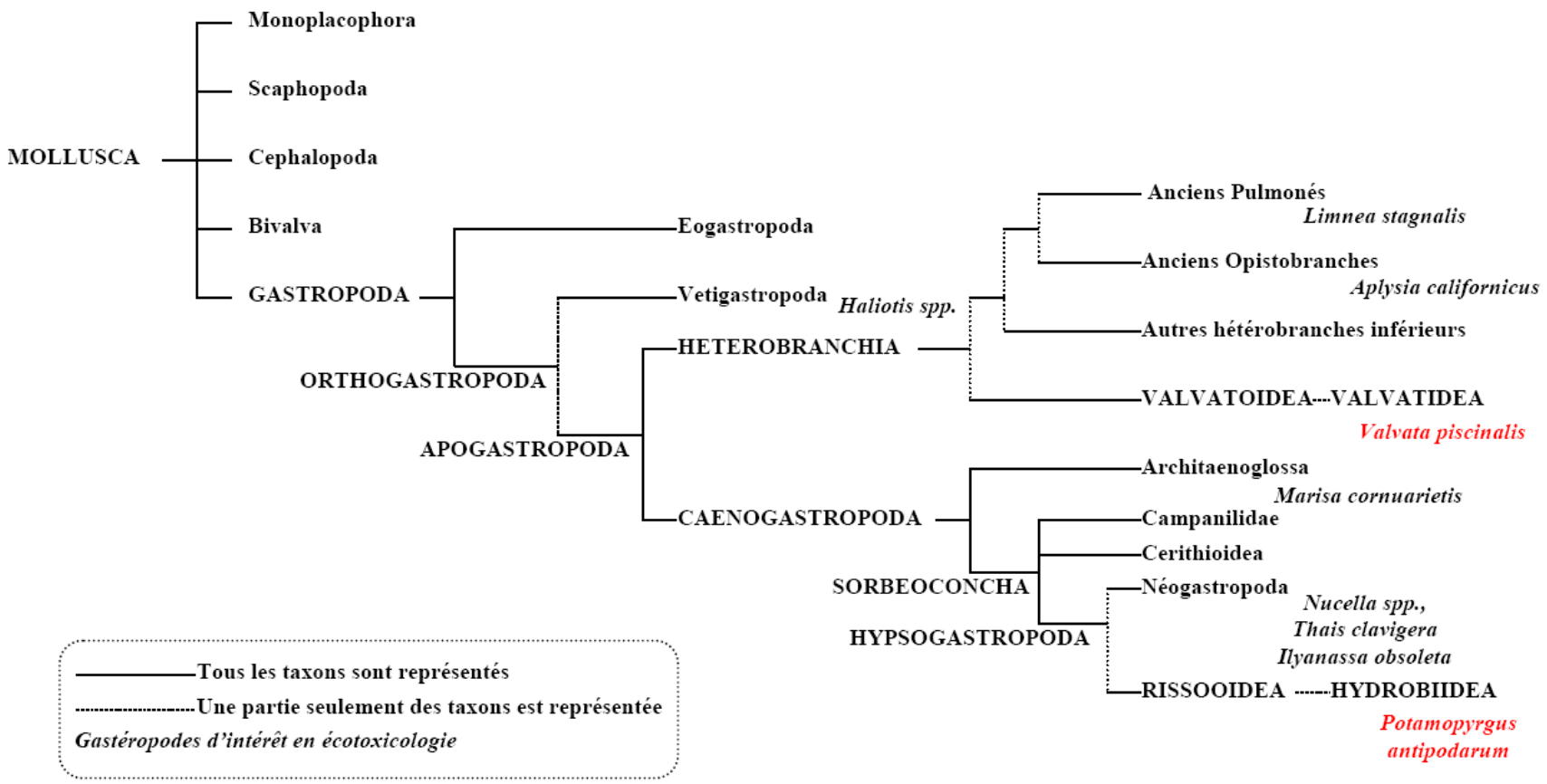


Figure I-3 : Phylogénie simplifiée des gastéropodes d'après Ponder et Lindberg (1997) et Dinapoli et Klussmann-Kolb (2010). En italique, principaux gastéropodes d'intérêt écotoxicologique.

a. Potamopyrgus antipodarum

Classification d'après Ponder et Lindberg (Ponder et Lindberg 1997) :

Embranchement : Mollusques

Classe : Gastropoda

Clade : Orthogastropoda

Apogastropoda

Ordre : Caenogastropoda

Clade : Sorbeoconcha

Hypsogastropoda

Super-famille : Rissooidea

Famille : Hydrobiidae

Genre Potamopyrgus

Cette espèce a été introduite de **Nouvelle Zélande**. En effet, ***Potamopyrgus jenkinsi***, l'espèce décrite en Europe est la même que *P. antipodarum*.

Figure I- 4 : *Potamopyrgus antipodarum* adulte

b. Valvata piscinalis

Classification d'après Ponder et Lindberg (Ponder et Lindberg 1997) et Dinapoli et Klussmann-Kolb (Dinapoli et Klussmann-Kolb 2010) :

Embranchement : Mollusques

Classe : Gastropoda

Clade : Orthogastropoda

Apogastropoda

Ordre : Heterobranchia

Clade : Hétérobranches inférieurs

Super-famille : Valvatoidea

Famille : Valvatacea

Genre : Valvata

Figure I- 5 : *Valvata piscinalis* adulte

Dès les années 1960, il avait été noté que les *Valvatidae* représentaient un très petit groupe tout à fait à part des autres prosobranches (Binder 1967), ce qui explique certainement qu'ils aient été classés avec les Hétérobranches, plutôt qu'avec les Caenogastéropodes, qui constituent l'essentiel des anciens prosobranches. Cette famille contient environ 25 espèces (Fretter et Graham 1978). *Valvata piscinalis* est une espèce paléarctique (fossiles lors de l'Oolithique) et relativement polymorphe. Les écotypes se reconnaissent à l'ornementation, et à la forme de la coquille (Russel-Hunter 1961; Binder 1967; Falniowski *et al*., 1988).

2. Morphologie

a. *Potamopyrgus antipodarum*

P. antipodarum a un corps mou dont la tête bien distincte et la masse viscérale est enroulée en hélice. Le pied aplati sert à la reptation. Le manteau entoure la masse viscérale et forme une cavité qui contient des branchies plumeuses. Les tentacules sont longs et fins, portant les yeux à leur base (Winterbourn 1970).

α *Coquille*

L'espèce est facilement identifiable par sa coquille, qui est dextrale, solide mais fine (Zaranko *et al*., 1997). Elle est conique, de couleur brun-jaunâtre, formée de tours convexes ou arrondis (Michaut 1968). L'ouverture est elliptique et large, avec une marge concave et

collumnaire. Le péristome est complet, le long du bord pariétal. Les lèvres externes et basales sont épaissies vers l'intérieur (Zaranko *et al*., 1997). La coquille fait 3 à 12 mm chez les adultes, avec 4 à 8 tours et 72% des individus ont une coquille entre 5,5 et 7,5 mm. En règle générale, plus la coquille est grande et plus il y a de circonvolutions (Winterbourn 1970). La longueur des spires est plus grande que la hauteur de l'ouverture (Zaranko *et al*., 1997). Il semblerait que la taille des adultes soit différente suivant la population étudiée, puisque certains auteurs rapportent des adultes mesurant de 3,5 à 5 mm (OECD 2010).

La coquille possède des ornementations diverses : principalement lisse ou carénée, mais également subcarénée ou dentriculée. Il se pourrait que ces ornementations aient un rapport avec des facteurs du milieu, mais pas uniquement (Michaut 1968). Ces ornementations (qui sont parfois décrite comme majoritairement périostracale) n'ont aucun intérêt pour la classification de ces espèces (Winterbourn 1970). L'opercule n'a pas non plus d'intérêt pour la distinction des espèces entre elles. Il est ovoïde, semi-transparent, allant du jaune au marron. Le nucléus est subcentral. L'insertion de muscle n'est pas distinguable. L'opercule présente des stries circulaires, et n'a pas de zone marginale identifiée (Winterbourn 1970).

β Appareil digestif

La radula est taenioglosse comprenant dans chaque rangée une dent médiane, des dents latérales de part et d'autre de la dent médiane et des dents marginales (Winterbourn 1970).

χ Appareil génital

♂ Mâle

Le testicule se situe au niveau de la circonvolution supérieure de la coquille, du côté columnaire. De lui, part le vas déférent, un tube fin et très tortueux. Il passe dans une large glande prostatique, et va jusqu'à la tête, au niveau du pénis. Celui-ci se situe sur la partie droite de la tête, sous le bord du manteau. Sa forme est simple, sans lobes accessoires (Winterbourn 1970).

♀ Femelle

L'ovaire est situé du côté columnaire de la glande digestive, dans les spires apicales. Il est blanc et contraste avec l'appareil digestif qui est marron. L'oviducte est étroit, mais s'élargit vers la bourse copulatrice et le receptaculum seminis. La partie inférieure de l'oviducte forme une **poche embryonnaire**. Dans la partie antérieure, on trouve le canal spermatique, qui mène à

la bourse copulatrice et au receptaculum seminis. La glande à albumen et la glande à mucus entourent la partie postérieure de la poche embryonnaire (Winterbourn 1970).

La poche embryonnaire contient les embryons en cours de développement. On distingue les embryons néoformés sans coquille et les embryons qui vont être expulsés sous peu, avec coquille (Figures I-6 à I-8).

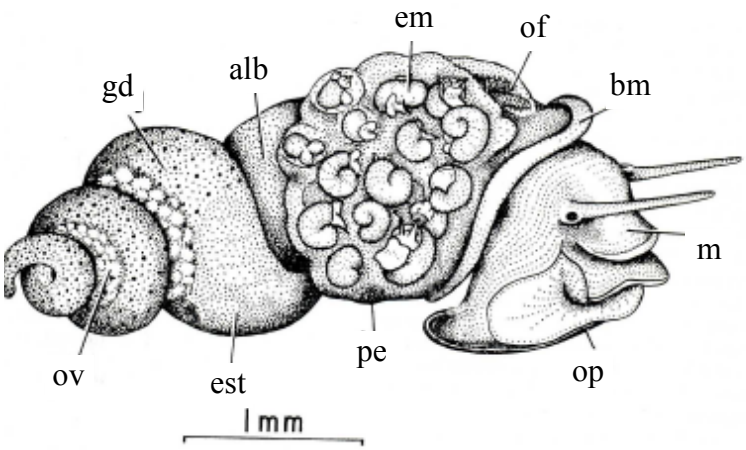


Figure I-6 : *P. antipodarum* femelle modifié d'après Fretter et Graham (1994).

Alb : glande à albumen ; bm : bord du manteau ; em : embryons ; est : estomac ; gd : glande digestive ; m : museau ; op : opercule ; ov : ovaire ; pe : poche embryonnaire,

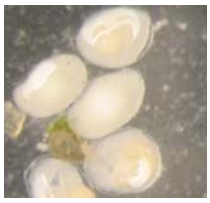


Figure I-7 : Embryons sans coquille

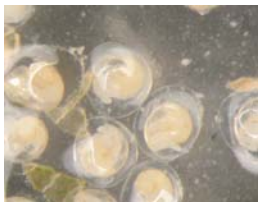


Figure I-8 : Embryons avec coquille

δ Jeunes

Les coquilles des embryons sont semi-transparentes, ne possèdent aucune ornementation et font 1,5 tours (Winterbourn 1970). Elles ont un diamètre de 0,5mm. Les embryons sont expulsés un par un, et, quelques secondes plus tard le jeune se libère et commence à ramper. Son corps est blanc laiteux, et entouré d'une coquille très transparente, brun-jaune. Il mesure 0,3mm de longueur et 0,4mm de largeur (Michaut 1968).

ε Nombre de chromosomes

L'espèce est diploïde (2n=34) en règle générale dans la population native et sexuée (Winterbourn 1970; Wallace 1992). En revanche, la population invasive et parthénogénétique est composée d'individus diploïdes sexués et triploïdes asexués (2n=52 ou 46) (Wallace 1992; Dybdahl et Lively 1995).

b. Valvata piscinalis

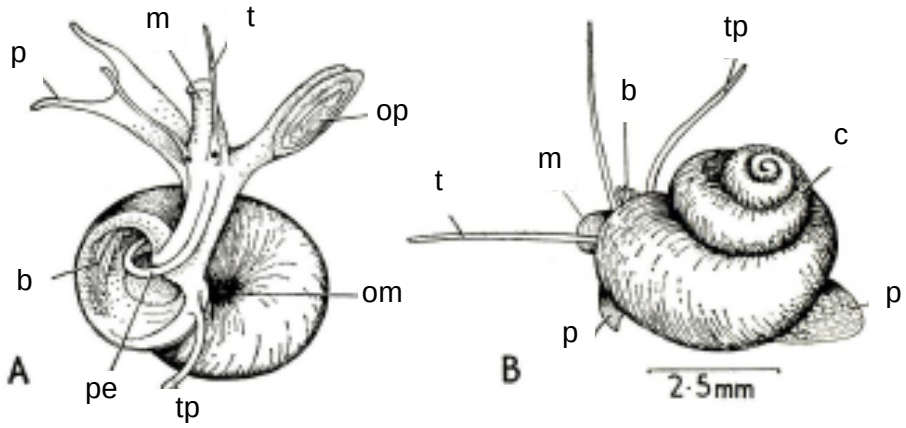


Figure I-9 : Morphologie de *V. piscinalis* d'après Fretter et Graham (1994). A, animal sorti de sa coquille, B, animal rampant.

b : branchie ; c : coquille ; m : museau ; om : ombilic ; op : opercule ; p : pied ; pe : pénis ; t : tentacule ; tp : tentacule palliale.

La tête est caractérisée par une paire de tentacules filiformes, qui sont légèrement contractiles, et à la base desquels se trouvent les yeux. Entre les tentacules se trouve un proboscis cylindrique qui explore le sédiment quand l'animal se déplace et lui permet de trouver de la nourriture. Le pied présente en avant un bord arrondi, terminé latéralement par deux pointes rejetées en arrière (Bernard 1890; Cleland 1954).

α Coquille

La coquille est subdiscoïdale, l'ouverture est circulaire et munie d'un opercule corné à nucléus central. De couleur jaunâtre, elle est constituée de trois tours et demi de spire. Elle varie de 1 à 7mm de haut et 3 à 6,5mm de diamètre selon le développement de l'individu (Mouthon 1982). La longueur moyenne est de **5mm** (entre 4 et 6,1mm), la largeur moyenne de 5,2mm (entre 4,5 et 6mm), et le nombre moyen de tours sur la coquille est de 3,75 (Oughton 1938). L'opercule est presque circulaire (Bernard 1890).

β Appareil digestif

La bouche s'ouvre à l'extrémité du mufle exsertile. La radula est également taenioglosse. Le bulbe se continue par un œsophage, qui atteint le fond de la cavité antérieure du corps. Une paire de glandes salivaire est accolée à l'œsophage. L'estomac se trouve dans la cavité abdominale. Il est volumineux, et une glande hépatique s'ouvre dedans. Il se continue par les intestins. L'anus s'ouvre au niveau du bord palléal antérieur (Bernard 1890; Cleland 1954).

χ Appareil respiratoire

V. piscinalis est le seul prosobranche capable de faire sortir ses branchies de sa cavité palléale. C'est un organe bipectiné (Bernard 1890; Cleland 1954).

δ Rein

Le rein correspond à une bande large, de teinte blanchâtre, qui s'étend en arrière de la branchie, à gauche du rectum jusqu'au fond de la cavité palléale. La portion postérieure est contre l'estomac (Bernard 1890; Cleland 1954).

ε Appareil génital

On trouve une glande hermaphrodite, occupant toute la fin du tortillon. Elle donne au centre des spermatozoïdes et en périphérie des ovules. Un canal efférent côtoie quelques temps la glande ; puis le foie et l'estomac, et enfin des glands annexes. Ce canal efférent est à droite de l'animal et se dédouble en canal déférent et oviducte. La prostate est une glande volumineuse dorsale. Le canal déférent côtoie la partie terminale des organes femelles, contourne l'orifice femelle, passe dans le manteau, et atteint le pénis, situé près de l'œil. L'oviducte se renfle rapidement en vaste poche copulatrice, d'où part un canal allant à la glande à albumine. Sous la poche copulatrice se trouve la glande accessoire (glande de la coque). L'autofécondation ne semble pas de règle (Bernard 1890; Cleland 1954).

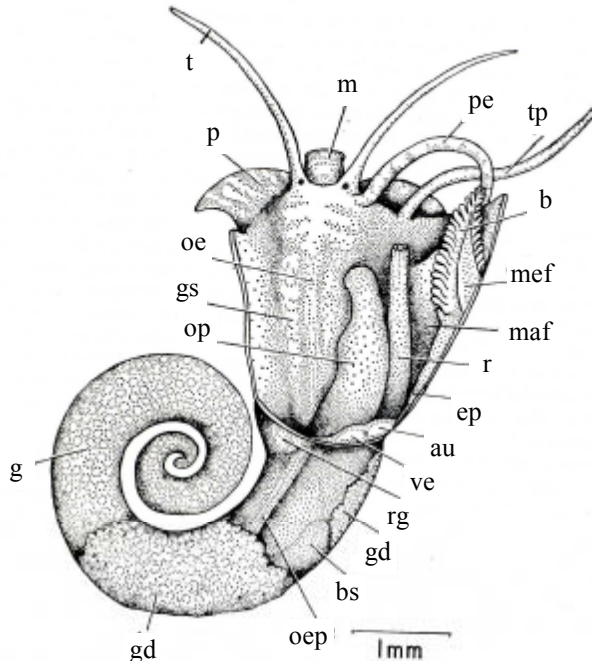


Figure I- 10 : Anatomie de *V. piscinalis* d'après Fretter et Graham (1994).

Au : auricule ; b : branchie ; bs : bouclier stomacal ; ep : extension palliale du rein ; g : gonade ; gd : glande digestive ; gs : glande salivaire ; m : museau ; maf : membrane afférente de la branchie ; mef : membrane efférente de la branchie : oe : œsophage ; oep : œsophage postérieur ; op : oviduct pallial ; p : pied ; pe : pénis ; r : rectum ; rg : rein gauche ; t : tentacule, tp : tentacule pallilae ; ve : ventricule.

ϕ Jeunes

Les œufs sont pondus dans des **masses** gélatineuses (Figure I-11). Chacune mesure 1 à 2 mm suivant le nombre d'œufs qu'elles comprennent, est grossièrement sphérique, jaunâtre et attachée au substratum par un disque rond et une structure apicale qui se fissure plus tard. Les œufs sont verdâtres et ellipsoïdaux, mesurant 350 sur 250 µm (Fretter et Graham 1978). Les jeunes (Figure I-12) sortant des œufs sont des miniatures des adultes (Cleland 1954).

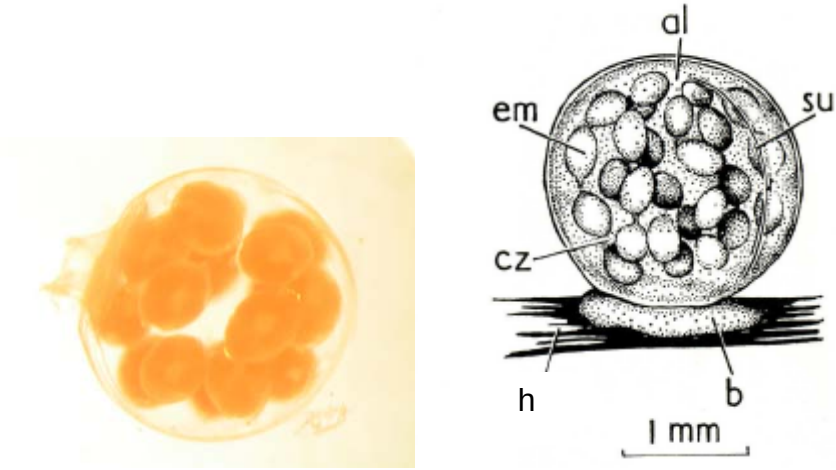


Figure I-11 : Masse de *V. piscinalis*. A droite, schéma d'après Fretter et Graham (1994).
al : albumen ; su : suture, cz : chalèze ; em : manteau externe muccoïde dans lequel l'embryon est ; h : herbe aquatique

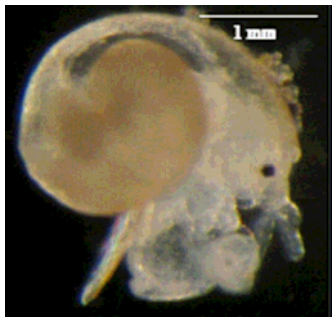


Figure I-12 : Juvénile de *V. piscinalis*

3. Données biologiques

a. Cycle de développement

Le déroulement du cycle biologique des mollusques est sous l'étroite dépendance des **facteurs environnementaux** comme la photopériode, la température, les conditions trophiques… (Sternberg *et al*., 2010) Cette plasticité adaptative permet notamment aux gastéropodes d'avoir une productivité maximale dans des conditions données et ainsi de compenser d'une année sur l'autre la faible productivité, due par exemple, à un hiver rigoureux (Mouthon 1982). En effet il existe une variabilité des cycles de vie très importante suivant les lieux et les années considérées (Young 1975).

Les prosobranches peuvent être à sexes séparés (gonochorique), hermaphrodites ou parthénogénétiques, bien que la majorité soit gonochoriques (Mouthon 1982; Joose 1988).

Le cycle biologique **annuel** semble être la règle. Les individus de génération précédente ayant passé l'hiver pondent à la belle saison, puis meurent peu après. Les œufs éclosent et donnent naissance à une nouvelle génération. Celle-ci va se développer rapidement jusqu'à l'automne, puis passer l'hiver à l'état de vie ralentie, en attendant le printemps suivant. Ce type de cycle présente l'avantage sélectif d'avoir des adultes qui ne rentrent pas en compétition avec la génération naissante (Mouthon 1982).

α *Potamopyrgus antipodarum*

Cette espèce est **bisannuelle**, **itéropare** (Calow P. 1978). Elle est **ovovivipare** et **parthénogénétique** (Robson 1926). Cette dernière caractéristique est essentielle dans le caractère invasif de l'espèce. En Nouvelle Zélande (son territoire d'origine), il semble que la reproduction sexuée soit beaucoup plus fréquente, avec jusqu'à un tiers de la population mâle. En effet, (Winterbourn 1970) a décrit 29% de la population constituée de mâles en moyenne en Nouvelle Zélande, et une reproduction mixte, sexuée et asexuée. Dans les sites où elle est espèces invasive, la population est essentiellement constituée de femelles (Ponder 1988; Wallace 1992; Schreiber *et al*., 1998; Gerard *et al*., 2003).

Il semble que le maintien à l'origine d'individus sexués soit du à la coévolution entre *P. antipodarum* et ses parasites Trématodes (Schreiber *et al*., 1998). Des auteurs ont analysé la divergence génétique entre différentes souches asexuées. Les variations sont importantes, ce qui indique des ages de lignées asexuées très variables (jusque 500 000 ans). Les milieux dans lesquels on trouve le plus d'individus sexués sont également ceux où les lignées les plus anciennes sont absentes. Il est possible que des conditions environnementales particulières favorisent cette situation (Neiman *et al*., 2005), ou bien que le passage à un état de clone « fige » le phénotype, dont les traits de vie, du génome sexué à l'origine (Jokela *et al*., 1997). La diversité génotypique des populations asexuées est très élevée (Dybdahl et Lively 1995).

La ponte est continue, mais la reproduction peut être considérée comme **saisonnière**, la fécondité des femelles étant maximale au printemps. *P. antipodarum* passe l'hiver sous forme de juvénile, et se reproduit à partir de la fin du printemps. La descendance de la première génération est réduite par un fort taux de mortalité. La deuxième génération se reproduit à la fin de l'été, et la mortalité des juvéniles est bien inférieure (Michaut 1968; Frenzel 1979).

Le nombre d'embryons disponibles pour entrer dans la population dépend non seulement de la fécondité des femelles, mais aussi de la densité des femelles en reproduction. Le recrutement est continu et l'éclosion des jeunes a lieu toute l'année ce qui favorise sans doute le maintien d'une population consistante (Lumbye et Lumbye 1965; Schreiber *et al*., 1998).

La majorité des femelles matures (65%) est porteuse d'embryons, dont le nombre peut aller jusque 42 chez une femelle (Schreiber *et al*., 1998) ou 50 (Lassen 1979), mais étant généralement de **20 à 40** (Michaut 1968). Ce nombre est certainement influencé par la température, la nutrition, et l'âge des adultes (Lassen 1979). Ainsi, une source de protéines semble augmenter significativement le nombre de jeunes produit (Dorgelo *et al*., 1995). Le développement embryonnaire dure de 30 à 35 jours à 15°C (Dorgelo 1991). La maturité sexuelle est atteinte pour une taille de **3,5mm** environ, et l'activité maximale est atteinte pour une taille de 5mm (Lassen 1979).

En laboratoire, le temps de génération minimum est de **6 mois** (Winterbourn 1970), ce qui permet d'avoir deux générations par an (Frenzel 1979).

Le nombre de jeunes produit par an est d'environ **230**. La reproduction est maximale dans les eaux saumâtres de faible salinité. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir 2 (au maximum 4) jeunes par jours et par escargot (Lassen 1979). A 21°C, 9,6 jeunes par individus sont produits par mois en condition de laboratoire (Zaranko *et al*., 1997). Cependant, cette espèce est parthénogénétique, et présente plusieurs clones dont les niveaux de reproduction de base sont variés (Jensen *et al*., 2001)

β *Valvata piscinalis*

Cette espèce est **hermaphrodite** (Bernard 1890; Heard 1963) avec des ouvertures distinctes mâle et femelle (Russel-Hunter 1961). La copulation est l'imprégnation d'un animal jouant la femelle par un autre jouant le mâle (Fretter et Graham 1978). La reproduction est **saisonnière** et se déroule d'avril à septembre en général, avec un pic de ponte au mois de juin (Cleland 1954; Russel-Hunter 1961). Le cycle de l'espèce se cale sur le développement des **macrophytes** d'eau douce (Rittschof *et al*., 2002). Les œufs sont pondus dans des masses gélatineuses attachées à la végétation ou, plus rarement à des pierres (Fretter et Graham 1978). La taille minimale pour la reproduction est de 4 mm (Young 1975).

Chaque escargot pond une dizaine de masses avec une moyenne de 150 œufs au total (Heard 1963). Fromming (1956, cité par Heard 1963) décrit trois périodes de ponte à proprement

parler espacées de quatre semaines entre chaque. L'ovoposition dans chaque période, qui dure de 8 à 14 jours, a lieu de 2 à 4 fois. Les œufs éclosent après 15 à 30 jours, les jeunes étant de petits escargots de 300 µm de diamètre. Il n'y a qu'un seul cycle reproductif dans leur vie (Russel-Hunter 1961).

L'espèce présente un comportement migratoire assez particulier et probablement lié au degré de maturité des gonades et aux conditions climatiques saisonnières (Cleland 1954), ainsi que par un mécanisme chimiotactique (Rittschof *et al*., 2002). Immédiatement avant la ponte, les escargots migrent du substrat sédimentaire vers la végétation aquatique sur laquelle les masses sont déposées. Après l'éclosion les jeunes se nourrissent pendant une courte période sur le périphyton, et retournent ensuite sur le substrat (Cleland 1954).

Ainsi, pendant les mois d'hiver, les individus sont enfouis dans la partie supérieure de la vase. A la fin avril, les escargots vont à la surface de la vase, et rampent sur toutes les herbes pouvant être présentes. C'est la période de reproduction. Dès la fin août, les individus s'enterrent de nouveau dans la vase (Cleland 1954).

b. Croissance et longévité

La croissance des gastéropodes s'effectue suivant une courbe sigmoïde. Elle est forte au printemps et en été, se poursuit après la ponte, décroît en automne et devient pratiquement nulle en hiver. Ici encore, les facteurs environnementaux jouent un rôle prépondérant (**température**, **conditions trophiques**). La longévité est également à prendre en compte. En effet, l'intensité de la croissance diminue avec l'âge. La plupart des gastéropodes vivent un an, mais cette durée est prolongée en laboratoire (Mouthon 1982).

α *Potamopyrgus antipodarum*

La durée de vie de cette espèce est **supérieure à un an** (Michaut 1968). La croissance est significativement supérieure chez les individus vivant dans les milieux eutrophiques (Dorgelo 1991). Ceci est particulièrement vrai concernant les individus de plus petite taille. Par contre, le nombre d'individu présent n'est pas affecté (Dorgelo 1988). La qualité de l'alimentation a un effet très important sur la croissance (Dorgelo *et al*., 1995). En effet, le ratio C/N optimal pour la croissance est de 15,9. Au dessus de ce ratio, le taux de croissance diminue fortement. Par contre, il augmente rapidement pour de faibles augmentations de C/N lorsque ce dernier est faible (Dorgelo et Leonards 2001). La température n'a un effet sur la croissance principalement

lorsque l'alimentation est très favorable (Dorgelo 1991). Enfin, il a été montré que les individus asexués de la population avaient un taux de croissance en laboratoire significativement plus élevé que les individus sexués (Jokela *et al*., 1997).

β Valvata piscinalis

Les auteurs ne sont pas d'accord pour cette espèce ce qui pourrait s'expliquer par les différentes populations étudiées. *V. piscinalis* vivrait **13 à 21 mois**. La croissance serait constante pendant l'année (même en hiver) et les individus rentreraient en reproduction à un an (Russel-Hunter 1961). Young (1975) estime que la croissance se déroulerait d'avril à octobre, à un rythme d'un à deux mm par mois (taille maximale 7 mm). La longévité serait de 12 à 13 mois.

c. Distribution géographique et habitats des Gastéropodes

Les mollusques dulcicoles sont **largement répartis** dans toute la France car ils sont capables d'occuper des habitats divers. De nombreux gastéropodes peuvent survivre à un assèchement temporaire du milieu dans lequel ils se développent. D'une manière générale ils se protègent en s'enfouissant dans la vase. Ils utilisent le même système lors d'hibernation. De plus leur résistance à la salinité est, en général, bonne. Ils ont un degré élevé de saprobiontie. Ainsi, ces caractéristiques expliquent leur large distribution et leur présence dans des écosystèmes très divers. Les prosobranches se distribuent préférentiellement au niveau du Potamon (Mouthon 1982).

α Potamopyrgus antipodarum

C'est une espèce **invasive** originaire de Nouvelle Zélande , et qui a colonisé l'Europe (Winterbourn 1970; Roth 1987), l'Australie (Ponder 1988) et l'Amérique du Nord (Jacobsen et Forbes 1997; Zaranko *et al*., 1997; Gangloff 1998). Il a été démontré, par des méthodes génétiques, que la population européenne provenait bien de Nouvelle Zélande (Stadler *et al*., 2005). Une fois cette espèce introduite dans un nouvel environnement, les populations augmentent rapidement en densité, et colonisent les plans d'eau avoisinant (Ponder 1988).

P. antipodarum est un macro invertébré benthique. On le retrouve dans toute la France, avec des habitats de type **fonds vaseux**, **sableux**, **substrats pierreux**, **graveleux**, et **végétaux aquatiques** (Michaut 1968). Certains auteurs ont montré que 70% des individus d'une population donnée étaient dans la vase et 30% sur les hydrophytes (Heywood et Edwards 1962).

Il est décrit dans les rivières de plaine, les ruisseaux rocheux, les criques, les fossés, les estuaires, les étangs, lacs, les sources, les puits et les retenues d'eau permanentes. Cependant, il est incapable de coloniser les étangs temporaires, par manque de forme de résistance pour survivre pendant la saison sèche (Winterbourn 1970). Il est généralement enfoui dans la couche superficielle de vase ou de sédiments des fonds (Michaut 1968; Dorgelo 1987).

Sa densité peut être extrêmement élevée, jusqu'à 30 000 (Mouthon 1982), 50 000 (Schreiber *et al*., 1998), ou 300 000 (Kerans *et al*., 2005) individus au m^2. Il semble que cette densité soit favorisée par la présence de végétation (Schreiber *et al*., 1998).

Les *Hydrobiidae* sont des espèces globalement **tolérantes aux facteurs abiotiques** (forte température, dessiccation, anoxie, salinité, sulphides), ce qui leur permet une colonisation d'une vaste gamme d'habitat, et une survie aisée en laboratoire (Lassen et Kristensen 1978; Alonso et Castro-Diez 2008). Il est à noter que la présence de *P. antipodarum* dans un écosystème semble défavoriser la présence d'autres macroinvertébrés. Il n'est pas évident que cette observation ne soit pas due à une différence de milieu, plutôt qu'à des interactions avec *P. antipodarum* (Kerans *et al*., 2005).

Concernant la sensibilité spécifique de *P. antipodarum* aux facteurs abiotiques, cette espèce vit aussi bien dans les eaux douces que saumâtres (Michaut 1968). Elle peut s'adapter à une **salinité** de 12 à 32 pour mille (Winterbourn 1970; Mouthon 1982). Cependant, sa survie diminue avec l'augmentation de salinité contrairement aux autres individus de sa famille (Hylleberg et Siegismund 1987).

Elle s'adapte à des gammes de **température** large (Dorgelo 1987; Roth 1987). Quinn *et al*. (1994) ont trouvé qu'elle était très thermotolérante, avec une température létale pour 50% des individus à 96 heures de 32,4°C. Cette limite de tolérance de la température de l'eau est de quelques degrés inférieure (28°C) sur le terrain. En revanche, *P. antipodarum* supporte très mal les basses températures (inférieures à 0°C) comparé à d'autres *Hydrobiidae*.

P. antipodarum peut aussi bien vivre dans des **eaux eutrophisées** que non polluées (Dorgelo 1988). Certain auteurs citent *P. antipodarum* comme étant sensible aux **pollutions organiques** du milieu (Watton et Hawkes 1984), alors que d'autres le considèrent comme très tolérant aux pollutions biodégradables (Mouthon 2001b).

Elle est **rhéotactique positivement**, c'est-à-dire qu'il se déplace diagonalement vers le courant (Haynes *et al*., 1985). C'est un mollusque très actif pouvant se déplacer à une vitesse de

3 cm/min aussi bien à la lumière que dans l'obscurité mais le mouvement ne semble pas être orienté (Heywood et Edwards 1962). Il semble présenter une **phototaxie négative** (Michaut 1968).

La **consommation d'oxygène** augmente avec la taille de l'animal (Heywood et Edwards 1962). Généralement, la consommation en oxygène est supérieure dans les milieux saumâtres, par rapport aux milieux d'eau douce chez *P. antipodarum* (Lumbye et Lumbye 1965).

β *Valvata piscinalis*

Cette espèce a également une distribution comprenant la France entière (Mouthon 1982). Les *Valvatacea* sont répandus dans les régions paléartiques, et absents uniquement en Islande. Ils ont été introduits au Canada et aux Etats-Unis (Fretter et Graham 1978). Ils sont donc très communs en Europe et en Amérique du Nord (Falniowski *et al*., 1988).

V. piscinalis colonise des habitats de type **vase** fine (comparé aux sols durs) et **végétaux supérieurs** (Cleland 1954).

Il n'a pas de sensibilité particulière à la dureté de l'eau et se plait en **eau douce**. Cette espèce n'apprécie pas particulièrement les eaux agitées, mais aime les eaux courantes, et est peu commune dans les mares petites et calmes, bien qu'elle soit présente dans les étendues d'eau plus importantes. Elle est abondante dans les fossés, ruisseaux et rivières avec un **courant doux** ou affaibli par les macrophytes, et eutrophiques. Elle est peu représentée sur les rochers et les lacs, et évite les lieux à vagues. On la retrouve près de berges. Elle ne vit que jusqu'à 10 mètres (Cleland 1954; Fretter et Graham 1978). Cette espèce ne survit pas longtemps hors de l'eau, n'ayant pas de mécanismes de résistance (Cleland 1954).

D'après Oughton (1938), *V. piscinalis* se développe particulièrement bien dans les sites protégés. De plus, toute analyse de l'abondance dans une zone donnée doit être mise en relation avec les types d'habitats disponibles. Cela confirme l'observation de Cleland (1954) selon laquelle il a une distribution large, mais seulement localement abondante. Ainsi on peut observer jusqu'à 5000 individus au m^2 dans les zones à macrophytes. La densité de population est généralement corrélée avec la densité du couvert végétal qui constitue une protection contre la prédation par les poissons, ainsi qu'une source de nourriture directe (débris végétaux collectés dans le sédiment) et indirecte (périphyton à la surface ; van den Berg *et al*., 1997).

Elle ne tolère la salinité que jusque 0,2% (Cleland 1954; Fretter et Graham 1978). Mouthon (2001) classe *V. piscinalis* comme tolérante aux pollutions biodégradables.

d. Modes de dispersion

La dispersion s'effectue par l'intermédiaire de l'homme, d'oiseaux, de poissons ou d'amphibiens, d'insectes ou enfin par dérive (Mouthon 1982).

P. antipodarum est adapté à la dispersion passive par les oiseaux (Boycott 1936 cité par Zaranko *et al*., 1997). Il survit également au passage dans le tube digestif de la truite, et est même capable de pondre des embryons quelques heures après (Haynes *et al*., 1985).

e. Régimes alimentaires

La majorité des gastéropodes présente un régime mixte à tendance détritivore et végétarienne alterné suivant les saisons. Ils se nourrissent principalement d'algues filamenteuses ou unicellulaires l'été, et de détritus lorsqu'ils sont enfouis dans la vase (Mouthon 1982).

α Potamopyrgus antipodarum

Cette espèce se nourrit d'une vaste gamme de nourriture Elle est principalement **détritivore**, mais également végétarien (algues et débris de macrophytes) (Mouthon 1982). C'est un **mangeur de fins dépôts organiques**, qui affectionne les diatomés (Dorgelo et Leonards 2001), ou un **fouisseur** suivant les auteurs (Michaut 1968). C'est une espèce s'alimentant avec des débris de végétaux ou d'animaux préférentiellement, mais pouvant également se nourrir d'algue verte ou de diatomés. (Haynes et Taylor 1984).

Il est intéressant de noter que des auteurs ont mis en évidence que cette espèce était capable de se nourrir par **chimiotactisme** (Haynes et Taylor 1984). Son comportement de recherche alimentaire est affecté par la taille des individus et le statut reproductif. En effet, les jeunes escargots, ainsi que les femelles ne se reproduisant pas ont tendance à plus rechercher leur nourriture pendant le jour, ce qui les expose potentiellement plus aux prédateurs (Levri et Lively 1996). Son efficacité d'assimilation est de 4% chez les individus adultes. Le taux d'assimilation est situé entre 7 et 8 µg de carbone organique par escargots et par jours (Heywood et Edwards 1962). Le régime alimentaire a un effet prononcé sur les traits de vie de *P. antipodarum*. Par exemple, la croissance est supérieure pour un régime alimentaire à base de laitue que de cœur d'agneau et elle est optimale avec un mélange des deux. La reproduction est, elle, plus favorisée par un régime alimentaire très protéique comme le cœur d'agneau (Dorgelo *et al*., 1995).

β Valvata piscinalis

Il se nourrit d'algues filamenteuses ou unicellulaires, de débris de macrophytes et de détritus en hiver. Il peut aussi filtrer les suspensions (Mouthon 1982). *V. piscinalis* récupère sa nourriture en se déplaçant dans et à la surface de la vase ou lorsqu'il rampe sur les plantes. C'est un **racleur** d'après Cleland (1954), un **mangeur de fins dépôts organique**s d'après Fretter et Graham (1978), et il serait capable de filtrer sa nourriture en suspension dans l'eau à l'aide de sa branchie (Lodge et Kelly 1985). Ils ingèrent des diatomées, bactéries et autres fines particules en rampant sur le substrat ou la végétation.

f. Prédateurs

Il en existe un grand nombre (Mouthon 1982). Dans le cas de *P. antipodarum*, les prédateurs sont la truite, la brème, le gardon et certains oiseaux aquatiques plongeant (Dorgelo 1987).

g. Parasitisme et commensalisme

Sur les mollusques d'eau douce, des petits oligochètes commensaux appelés *Chaetogaster* sont souvent trouvés (Mouthon 1982). Peu de données sont disponibles concernant le parasitisme de *P. antipodarum* en dehors de la Nouvelle-Zélande (Morley 2008). En Nouvelle-Zélande, *P. antipodarum* présente des parasites du genre Microphallus (Trématode), qui ont la particularité de castrer leur hôte lors de leur développement, ainsi que d'induire des troubles du comportement alimentaire qui augmente l'exposition aux prédateurs (Levri et Lively 1996). Il est fort possible que des phénomènes comparables existent en Europe, puisque *P. antipodarum* présente des parasites (Gerard *et al*., 2003; Gerard et Dussart 2003; Gerard et Le Lannic 2003), mais les implications physiologiques et pour les tests écotoxicologiques (avec la possible castration) ne sont pas évaluées à l'heure actuelle (Morley 2008). Young (1975) a également observé ce phénomène de castration par un parasite chez *V. piscinalis*, par un stade d'un Echinostome.

4. Données écotoxicologiques

Les mollusques sont peu sensibles aux pollutions de faible intensité, mais lorsque l'intensité de la pollution augmente, ils se révèlent plus sensibles que les Ephéméroptère et les Trichoptères. Les Prosobranches sont les plus polluo-sensibles (Mouthon 1982).

Du fait de l'utilisation plus importante de *P. antipodarum* en écotoxicologie que *V. piscinalis*, les données écotoxicologiques sont plus abondantes pour la première espèce. En revanche, il existe de nombreuses données chez les gastéropodes dit pulmonés (Lagadic *et al*., 2007).

a. Potamopyrgus antipodarum

Haynes et Taylor (1984) ont suggéré que *P. antipodarum* était capable de détecter les produits chimiques par chimiodétection, et de les éviter. Cette faculté a été utilisée pour évaluer la toxicité de certains polluants (Golding *et al*., 1997).

Etant donné que la reproduction a lieu toute l'année, toutes les phases développementales peuvent être exposées aux polluants, et la sensibilité aux pollutions peut en être affectée (Gerard et Poullain 2005). Il semble que les juvéniles soient les plus sensibles aux polluants (Watton et Hawkes 1984).

Il semble que *P. antipodarum* soit relativement résistant aux pollutions liées aux industries telles que les mines, le fer ou le charbon. En effet, dans des zones très impactés, cette espèce se développe particulièrement bien, voire, en défavorise d'autres (Serafinski *et al*., 1993 - 1994). Cependant la réponse de *P. antipodarum* aux polluants dépend du contaminant en cause, et les différences de sensibilité entre espèces de Gastéropodes sont fortes (Gérard et Poullain, 2005). Il est possible que la relative sensibilité de *P. antipodarum* aux polluants soit un facteur limitant pour son caractère invasif (Gerard et Poullain 2005).

α Tests de laboratoire

Nous avons réalisé un tableau récapitulatif de tous les tests présentés ici (Tableau I-1). Dans la mesure où il est très synthétique, les informations qu'il contient sont développées ci-dessous.

ॐ Métaux et métalloïdes

☙ Cuivre

La toxicité aiguë du cuivre sous forme **CuSO4** en renouvellement continu a été testée (Watton et Hawkes 1984) sur des juvéniles (4 à 12 semaines, 1-2mm), des adultes (moins de 4mm et se reproduisant) et des adultes sénescents. Les juvéniles sont les moins tolérants (CL_{50} à 96h de 54µg/l), comparé aux adultes (CL_{50} à 96h de 77µg/l) et aux individus sénescents (CL_{50} à 96h de 79µg/l). Brown (1980) avait trouvé une CL_{50} du $CuCl_2$ à 48 et 72h de 50µg/l pour des adultes. *P. antipodarum* est donc un invertébré relativement sensible au Cu.

Les effets du Cu sous forme de **$CuCl_2$** sur la croissance de juvéniles ont été évalués lorsque l'alimentation se fait à base de laitue. Une concentration de 10µg/l (LOEC) diminue significativement la croissance. Une suppression quasi-totale de la croissance a lieu pour des concentrations de 50µg/l. L'EC_{50} est de 3µg/l, la NOEC de 5µg/l (Dorgelo *et al*., 1995).

Ces valeurs sont faibles, ce qui montre une sensibilité forte de l'espèce à ce polluant comparé à d'autres métaux (Watton et Hawkes 1984; Dorgelo *et al*., 1995).

☙ Cadmium

Les effets du cadmium sur *P. antipodarum* ont été étudiés en laboratoire. Comme cette espèce est parthénogénétique, elle se présente sous forme de clones. Ces clones n'ont pas forcément la même sensibilité aux toxiques, ce qui explique qu'il y ait des études évaluant leur sensibilité respective. Ces études ont été conduites avec le Cd comme polluant modèle.

Les CL_{50} du **$CdCl_2$** à 48 heures ont été déterminées chez différents clones de *P. antipodarum*. Elles s'échelonnaient de 0,56 à 1,92mg/l. Des différences de sensibilité importantes de clones au Cd existent. De plus, tous les individus sont décédés suite à l'exposition au cadmium, ce qui laisse supposer des concentrations létales inférieures à celles données par les CL_{50} (Jensen et Forbes 2001). Dans d'autres expérimentations, les CL_{50} du $CdCl_2$ ont été évaluées entre 1 et 7.2mg/L (Moller *et al*., 1994, 1996).

La toxicité chronique (8 semaines) du Cd a également été évaluée sur cette espèce en utilisant des sédiments contaminés. Les traits de vie (taux de croissance, age à la première reproduction, taille à la première reproduction, survie des adultes et des juvéniles, taux de reproduction, taille à la naissance), et le taux d'alimentation ont été étudiés sur différents clones. Ici encore, la sensibilité des différents clones est variable, et les traits de vie affectés également.

Ainsi, il est difficile d'évaluer quel clone est le plus sensible au Cd, puisque cela dépend du trait de vie choisi. Une LOEC proposée est 7,29µg/kg de sédiment sec. Cette quantité est compatible avec des concentrations retrouvées dans l'environnement (Jensen *et al*., 2001).

Les effets du Cd sous forme de **$CdCl_2$** sur la croissance de juvéniles ont été évalués lorsque l'alimentation se fait à base de laitue. Une concentration de 25µg/l (LOEC) diminue significativement la croissance.. L'EC_{50} est de 16µg/l, la NOEC de7µg/l (Dorgelo *et al*., 1995). Dans d'autre études, la LOEC croissance pour les juvéniles a été évaluée à 200µg/L (Forbes *et al*., 1995; Moller *et al*., 1996). De plus le Cd augmente la variabilité des taux de croissance au sein d'une population donnée (Forbes *et al*., 1995).

- **Zinc**

La CL50 du **$ZnSO_4$** chez des adultes *P. antipodarum* est de 10mg/L à 48 et 72h (Brown 1980). Les effets du **$ZnCl_2$** sur la croissance de juvéniles a été évaluée lorsque l'alimentation se fait à base de laitue. Une concentration de 100µg/l diminue significativement la croissance. L'EC_{50} est de 103µg/l, la NOEC entre 50 et 75µg/l, et la LOEC de 75µg/l (Dorgelo *et al*., 1995).

- **Arsenic**

La toxicité de l'arsenic dissout (As) sous forme d'arsenate (**As(V)**) ou plus toxique d'arsenite (**As(III)**) a été évaluée sur les comportements d'évitement et d'immobilité de deux populations de *P. antipodarum*. Le comportement d'évitement est le premier à apparaître puis, s'il ne suffit pas, l'immobilité est observée, soit en tant que réaction protectrice pour réduire l'exposition ou à cause de l'effet du toxique. Dans les deux populations étudiées, celle qui est habituellement exposée à de l'As est plus sensible que l'autre. Les EC50 varient de 200 à 325mg As(V)/L et 20 à 35 mg As(III)/L après 48h d'exposition et diminuent avec le temps. La diminution des EC50 de la population jamais exposée à l'arsenic est plus importante que celle de l'autre population. Ainsi, après 96h, leur sensibilités respectives aux deux formes d'As sont comparable (Golding *et al*., 1997).

- **TBT et TPT**

La toxicité du TBT et TPT sur la reproduction de *P. antipodarum* adultes a été évaluée par exposition *via* le sédiment pendant 56 jours. Le nombre d'embryons total dans la poche embryonnaire a été compté, en distinguant ceux avec et sans coquille. Le TBT et TPT ont induits une diminution du nombre d'embryons présents. La LOEC est de 10 µg/kg après 8 semaines

d'exposition pour les deux composés, ce qui était la plus faible concentration testée. La NOEC n'a pas donc pu être évaluée. Cette espèce est donc très sensible aux organoétains, à des concentrations environnementales (Duft *et al*., 2003a). Une autre exposition de 4 semaines au TBT par l'eau (5-500ng/L) n'a montré aucun effet sur la reproduction (juvéniles et embryons) (Gagnaire *et al*., 2009).

- **Polluants organiques**

  - **17α-ethinylestradiol**

Un test de reprotoxicité (embryons dans la poche embryonnaire) a été conduit pendant 9 semaines avec l'EE2 *via* l'eau. Une induction significative du nombre d'embryons sans coquille a été observée à 25ng EE2/L (Jobling *et al*., 2003).

  - **Bisphénol A**

La toxicité de cette molécule sur la reproduction de *P. antipodarum* a été évaluée par exposition sédimentaire pendant 56 jours. Le paramètre le plus sensible était le nombre d'embryons sans coquille. La LOEC est de 1 µg/kg après 8 semaines d'exposition. L'EC_{50} est de 0,2 ng/kg. La réponse est de type dose-dépendante. (Duft *et al*., 2003b). Le BPA à 25µg/L induit aussi le nombre d'embryons sans coquille (Jobling *et al*., 2003). En revanche, Gagnaire *et al*. (2009) n'ont trouvé aucun effet du BPA (1-100µg/L) sur la reproduction (juvéniles et embryons) de *P. antipodarum* après 4 semaines d'exposition à 20°C.

  - **Octylphénol**

Un test de reprotoxicité (embryons) de 8 semaines a été réalisé avec ce composé sur sédiment. La LOEC est de 1 µg/kg après 8 semaines d'exposition si on considère les embryons sans coquille. L'EC_{50} est de 0,27 µg/kg au bout de 4 semaines.(Duft *et al*., 2003b). L'OP à 5µg/L induit aussi le nombre d'embryons sans coquille (Jobling *et al*., 2003) et à 100µg/L il induit un taux de mortalité significatif après 4 semaines d'exposition, mais aucun effet sur la reproduction (juvéniles et embryons) (Gagnaire *et al*., 2009).

  - **Nonylphénol**

Le même test que précédemment a été réalisé avec ce composé. La LOEC est de 10 µg/kg après 8 semaines d'exposition si on considère tous les embryons. L'EC_{50} n'a pas pu être évaluée (Duft *et al*., 2003b).

HHCB

La toxicité du parfum musqué polycyclique HHCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[γ]-2-benzopyrane) a été évaluée sur la croissance, le taux d'alimentation, la survie et la reproduction de *P. antipodarum* via le sédiment. Le HHCB réduit significativement la croissance des juvéniles dès 30mg/kg et augmente l'âge et la taille à la première reproduction dès 100mg/kg. Chez les adultes le taux d'alimentation est réduit dès 30mg/kg, ainsi que le nombre de juvéniles dès 10mg/kg après 10 semaines d'exposition (Pedersen *et al*., 2009).

Crème solaire

La reprotoxicité de deux crèmes solaires, 3-benzylidene-camphor (3-BC) et 3-(4o-methylbenzylidene)-camphor (4-MBC), a été évaluée par exposition sédimentaire chez *P. antipodarum*. Après 8 semaines d'exposition, le nombre d'embryons est augmenté pour les deux composés, avec une EC50 de la 4-MBC de 1.17mg/kg (Schmitt *et al*., 2008).

Médicaments

Carbamazépine

Aucun effet de la carbamazépine (0,4-250mg/L) n'a été observé sur la mortalité ou le nombre d'embryons après 4 semaines d'exposition chez *P. antipodarum* (Oetken *et al*., 2005).

Fluoxétine

La fluoxétine provoque une diminution significative du nombre d'embryons après 8 semaines d'exposition. La LOEC et de 16µg/L et la NOEC de 3,2µg/L (Nentwig 2007). D'autres auteurs ont montré une induction du nombre d'embryons après 6 semaines pour une concentration de 3,7µg/L, et une diminution à 100µg/L/ Le nombre de juvéniles nés allait dans le même sens. Les juvéniles nés au cours de l'expérimentation présentaient un retard à la ponte (Gust *et al*., 2009).

Fadrozole

Ce composé anti-aromatase a provoqué une diminution de la reproduction (juvéniles et embryons) dès 6,7µg/L chez *P. antipodarum*, associé à des altérations de l'histologie de la gonade, après 6 semaines d'exposition (Gust *et al*., 2010c).

Pesticides

Atrazine

Quel que soit l'âge des individus, l'exposition à l'atrazine (10 et 50µg/l, pendant 5 semaines), ne modifie pas significativement les traits de vie (survie, croissance, reproduction) des escargots. La locomotion des adultes et jeunes adultes exposés est significativement modifiée dès 10µg/L, ce qui n'est pas le cas pour les jeunes (Gerard et Poullain 2005).

Divers polluants

Toxine de cyanobactérie

L'exposition à la mycrocystine L-R (33µg/l, pendant 5 semaines) diminue la survie et la croissance des juvéniles et la survie et reproduction (embryons dans la poche embryonnaire) des adultes. En revanche, la locomotion n'est pas affectée (Gerard et Poullain 2005). Les effets et l'accumulation des mycrocystines cyanobactériennes chez les prosobranches sont plus maruqés que chez les pulmonés (Lance *et al*., 2008{Lance, 2010 #712; Gerard *et al*., 2009; Lance *et al*., 2010b)}.

Ammonium

La toxicité de l'ammonium sous forme **NH_4Cl** en renouvellement continu a été testée sur des juvéniles, des adultes et des adultes sénescents. Les juvéniles sont significativement les moins tolérants (CL_{50} à 96h de 315µg/l), comparé aux adultes (CL_{50} à 96h de 490µg/l) et aux individus sénescents (CL_{50} à 96h de 850µg/l). *P. antipodarum* est donc relativement intolérante au NH_4 et pourrait être utilisée comme espèces indicatrice (Watton et Hawkes 1984).

Ammoniac

L'effet de l'ammoniac (**NH_3**) sur le comportement (locomotion) de *P. antipodarum* a été évalué lors d'expositions de 40 jours. La LOEC mesurée a été de 0.07mg de NH_3/L (Alonso et Camargo 2009).

Eau de bouteilles en PET

Le nombre d'embryons chez des adultes *P. antipodarum* est augmenté après 8 semaines de culture dans des bouteilles en polyethylène terephtalate (PET) comparé à des bouteilles en verre (Wagner et Oehlmann 2009).

↬ Désinfectants d'aquaculture

P. antipodarum est une espèce qui pose de nombreux problèmes en aquaculture, ce qui explique que des tests de tolérances aux désinfectants communément utilisés aient été réalisés. Les CL_{50} sont évaluées après 15 minutes d'exposition. Elles sont de 187 ppm pour l'iodine, 12ppm pour le formol, 2 ppm pour l'H_2O_2 et 35 ppm pour le permanganate de potassium (Oplinger et Wagner 2009).

β *Expérimentations* in situ

P. antipodarum a été utilisé très tôt dans des expérimentations *in situ* par Brown (1980) pour évaluer les effets d'émissions intermittentes de toxiques dans une rivière. Le seul paramètre suivi a été la mortalité. Cet auteur avait conclu que c'était une espèce très prometteuse pour l'évaluation de l'impact des pollutions *in situ*. La sensibilité de l'espèce aux polluants au cours de l'expérimentation de terrain est supérieure à celle qu'elle présente au laboratoire. Depuis, d'autres études ont utilisé *P. antipodarum* dans des expositions de terrain pour évaluer les effets de pollutions diverses sur sa fécondité (Gust *et al*., 2010b; Schmitt *et al*., 2010b; Gust *et al*., 2011a), et comparer avec les populations locales (Lance *et al*., 2010a).

χ *Expérimentations en canaux artificiels*

Les canaux artificiels présentent une situation intermédiaire entre les expérimentations *in situ* vraies et celles de laboratoires. La densité de population, la biomasse et le taux de reproduction de *P. antipodarum* ont été suivis pendant 21 mois dans des canaux artificiels soumis à des concentrations variables d'effluent de stations d'épuration (0, 25 et 50%). Les canaux avec de l'effluent présentent une abondance et une biomasse de *P. antipodarum* inférieures à celle des témoins. Aucun effet n'a été observé sur la reproduction. Les auteurs ont conclu que les différences observées au niveau de la population étaient dues principalement à des différences de taux de mortalité (Watton et Hawkes 1984).

Dans une autre expérimentation, *P. antipodarum* a été exposé à des concentrations croissances d'effluents de STEP via des canaux expérimentaux pendant 6 semaines. Cette espèce a présenté une sensibilité comparable au poisson, avec des inductions de reproduction (embryons dans la poche embryonnaire) (Jobling *et al*., 2003).

δ Sédiments du terrain et extraits de sédiments

P. antipodarum a été également utilisé pour l'évaluation de la toxicité de sédiments contaminés directement issus de milieux contaminés.

La fécondité (nombre d'embryons dans la poche embryonnaire) est affectée par des sédiments issus de rivières européennes, soit en induction ou en inhibition (Duft *et al*., 2007; Schmitt *et al*., 2010a). Dans une autre expérimentation, *P. antipodarum* a été exposé à des sédiments de terrain contaminés et à des sédiments témoins contaminés avec l'extrait des sédiments précédents. L'exposition a duré 8 semaines et la fécondité a été suivie par craquage. En parallèle, des essais *in vitro* ont été menés, avec l'appréciation de l'activité AhR, et l'œstrogénicité et androgénicité avec des tests sur levures recombinantes. Les sédiments ont des activités AhR, œstrogènes et anti-androgènes. La fécondité de *P. antipodarum* est également affectée, avec une augmentation en début d'exposition dans certaines conditions, puis une diminution après 56 jours (Mazurova *et al*., 2008).

		Stade exposé	Milieu d'exposition	Type d'endpoint	Concentration d'effet	Référence
Métaux	**As**	Adulte	Eau	Evitement, immobilité	$EC_{50As(V)}$=194-325mg/L à 48h, 135-180mg/L à 72h ; 11-164mg/L à 96h $EC_{50As(III)}$=19,3-34,6mg/L à 48h ; 15,8 à 24,2mg/L à 72h, 14,5 à 19,4mg/L à 96h	(Golding *et al*., 1997)
	Cu	Juvénile, adulte et adulte sénescent	Eau	Létalité	$CL_{50CuSO4}$ (96h)=54µg/l pour juvéniles ; 77µg/l pour adultes ; 79µg/l pour individus sénescents	(Watton et Hawkes 1984)
		Adulte	Eau	Létalité	$CL_{50CuCl2}$ (48 et 72h)=50µg/L.	(Brown 1980)
		Juvénile	Eau	Croissance	$LOEC_{CuCl2}$=10µg/L ; $EC_{50CuCl2}$=3µg/L ; $NOEC_{CuCl2}$=5µg/L	(Dorgelo *et al*., 1995).
	Zn	Adulte	Eau	Létalité	$CL_{50ZnSO4}$ (48 et 72h)=10mg/L.	(Brown 1980)
		Juvénile	Eau	Croissance	$LOEC_{ZnCl2}$=75µg/L ; $EC_{50\ ZnCl2}$=103µg/L ; $NOEC_{ZnCl2}$=50µg/L	(Dorgelo *et al*., 1995)
	Cd	Juvénile	Eau	Croissance	$LOEC_{CdCl2}$=25µg/L ; $EC_{50\ CdCl2}$=16µg/L ; $NOEC_{CdCl2}$=7µg/l	(Dorgelo *et al*., 1995)
		Adulte	Eau	Létalité	$CL_{50CdCl2}$(48h)=0,56-1,92mg/l.	(Jensen et Forbes 2001).
		Adulte	Eau	Létalité	$CL_{50CdCl2}$(48h)=1-7.20mg/l.	(Moller *et al*., 1994, 1996)
		Juvénile	Eau	Croissance	$LOEC_{CdCl2}$=200µg/L	(Forbes *et al*., 1995; Moller *et al*., 1996)

		Adulte	Sédiment	Croissance, age et taille à la première reproduction, reproduction, taille à la naissance	$LOEC_{CdCl2}$=7,29µg/kg	(Jensen *et al*., 2001).
métalloïde	**TBT**	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{TBT}$(8 sem)=10µg/kg	(Duft *et al*., 2003a)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	Pas d'effet	(Gagnaire *et al*., 2009)
	TPT	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{TPT}$(8 sem)=10µg/kg	(Duft *et al*., 2003a)
Polluants organiques	**EE2**	Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$LOEC_{EE2}$(9 sem)=25ng/L	(Jobling *et al*., 2003)
	BPA	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{BPA}$(8 sem)=1µg/kg ; EC_{50BPA}(8 sem)=0,2 ng/kg..	(Duft *et al*., 2003b)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$LOEC_{BPA}$(9 sem)=25µg/L	(Jobling *et al*., 2003)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	Pas d'effet	(Gagnaire *et al*., 2009)
	OP	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{OP}$(8 sem)=1µg/kg ; EC_{50op}(4 sem)=0,27ng/kg	(Duft *et al*., 2003b)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$LOEC_{OP}$(9 sem)=5µg/L	(Jobling *et al*., 2003)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	Pas d'effet	(Beatrice Gagnaire *et al*., 2009)
	NP	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{NP}$(8 sem)=10µg/kg	(Duft *et al*., 2003b)

	HHCB	Adulte	Sédiment	Croissance, age et taille à la première reproduction, reproduction	$LOEC_{HHCB}$=10mg/kg	(Pedersen *et al*., 2009)
	Crème solaire	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$EC_{504\text{-}MBC}$(8 sem)=1.17mg/kg	(Schmitt *et al*., 2008)
Médicaments	**Carbamazépine**	Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	Pas d'effets	(Oetken *et al*., 2005)
	Fluoxétine	Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$NOEC_{fluoxétine}$(8 sem)=3,2µg/L ; $LOEC_{fluoxétine}$(8 sem)=16µg/L	(Nentwig 2007)
		Adulte, juvénile	Eau	Reproduction (embryon, juvénile, age et taille à la première reproduction)	$LOEC_{fluoxétine}$(6 sem)=3,7µg/L	(Gust *et al*., 2009)
	Fadrozole	Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	$LOEC_{fadrozole}$(6 sem)=6,2µg/L	(Gust *et al*., 2010c)
Autres	**Atrazine**	Juvénile, adulte	Eau	Locomotion	$LOEC_{atrazine}$(5 sem)=10□g/L	(Gerard et Poullain 2005)
	Toxine de cyanobactérie (mycrocystin L-R)	Juvénile, adulte	Eau	Survie, croissance, reproduction (embryons)	$LOEC_{mycrocysrtineL\text{-}R}$(5 sem)=33µg/L	(Gerard et Poullain 2005)
	NH_3	Adulte	Eau	Locomotion	$LOEC_{NH3}$(40j)=0.07mg/L	(Alonso et Camargo 2009)
	NH_4	Juvéniles, adultes et adultes sénescents	Eau	Létalité	CL_{50} (96h)=315□g/l pour juvéniles ; 490□g/l pour adultes ; 850□g/l pour individus sénescents	(Watton et Hawkes 1984)

Tableau I-1 : Effets de toxiques sur *P. antipodarum* au laboratoire

b. Valvata piscinalis

Beaucoup moins d'études sont disponibles pour cet organisme. Actuellement, il n'a été utilisé qu'au sein de notre laboratoire.

α Zinc

La toxicité du zinc a été évaluée avec des sédiments contaminés et le suivi de la croissance d'adultes pendant 28 jours. La NOEC est de 200mg de Zn/kg et la LOEC de 624mg de Zn/kg. En parallèle, La CL_{50} sur 24 heures est de 31,6mg/l en exposition par l'eau. Ces valeurs aussi bien court terme que long terme sont bases (inférieures aux sensibilités de la daphnie et du chironome) (Ducrot *et al*., 2006).

β Polluants organiques

Gagnaire *et al*. (2009) ont étudié les effets du BPA, OP et TBT sur la reproduction de *V. piscinalis* après 28 jours. Ils n'ont observé aucun effet pour les concentrations explorées.

ॐ Fluoxétine

Une exposition de 6 semaines à la fluoxétine (3,7-100µg/L) n'a pas eu de conséquences significative sur la reproduction de *V. piscinalis*. Le taux d'éclosion des masse et l'âge à la première reproduction n'ont pas été modifiés non plus (Gust *et al*., 2009).

Deux espèces de gastéropodes ont été choisies : ***Potamopyrgus antipodarum*** et ***Valvata piscinalis.***

Elles se caractérisent par :

- Des **modes de reproduction différents** (parthénogénétique ovovivipare et hermaphrodite ovipare) ;
- Des **milieux de vie comparables** (aval des cours d'eau lents) ;
- Des modes alimentaires distincts ;
- Une **petite taille** (quelques mm à l'age adulte) ;
- Des cycles de vie supérieurs à un an ;
- Une utilisation en **laboratoire** existante.

Il existe **beaucoup de données écotoxicologiques chez *P. antipodarum*** :

- Avec des polluants métalliques, organiques…
- Avec des modes d'expositions variés (eau, sédiment, canaux artificiels, *in situ*) ;

Peu de données écotoxicologiques sont disponibles chez ***V. piscinalis***.

D / CONTROLE DE LA REPRODUCTION CHEZ LES MOLLUSQUES

Les hormones régulent de nombreux processus biologiques aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Elles exercent leur action à de **faibles concentrations**, et ont des structures moléculaires très diverses. Les principes généraux d'actions sont conservés entre les espèces, mais l'organisation diffère. Les principes de base sont les suivants : les cellules cibles expriment des **récepteurs** hautement spécifiques, à forte affinité, et l'hormone se lie à son récepteur, ce qui crée un **complexe**, qui médie l'activité biochimique dans le tissu cible (LeBlanc *et al*., 1999).

Les hormones agissent comme déclencheur d'événements spécifiques (mue, ovulation…) qui sont induits par des pics de concentration, ou bien comme facteurs homéostatiques, qui régulent les constantes physiologiques. Les mécanismes d'actions des messagers chimiques des systèmes nerveux ou endocriniens sont limités. On distingue les neurotransmetteurs rapides (acétylcholine et le récepteur nicotinique), les neurotransmetteurs lents (acétylcholine et le récepteur muscarinique), les neuromodulateurs (stéroïdes qui modifient l'activité du récepteur GABA) et les hormones à proprement parler. Les neurotransmetteurs sont des éléments de faible poids moléculaire, bien conservé lors de l'évolution. *A contrario* les neurohormones et les hormones des invertébrés ont subit de multiples modifications (LaFont 2000).

Chez les invertébrés, les mollusques ont été les espèces les moins étudiées en endocrinologie (Joose 1984). On distingue la présence d'**hormones stéroïdiennes** et de **neuropeptides**, plus fréquents (Nassel 1996; LaFont 2000). Chez les mollusques, les hormones jouent un rôle dans la reproduction, la croissance, le métabolisme énergétique, la circulation sanguine et la régulation hydrique et ionique (Joose 1988).

Il n'y a que très peu d'informations sur le contrôle endocrinien de la reproduction chez les prosobranches. Les données sont plutôt issues de travaux qui ont été effectués chez les pulmonés. Le schéma de synthèse hypothétique proposé se base donc sur ce qui est connu chez ces espèces. Il est principalement tiré de la revue de Joose « Hormones in Molluscs » (Joose 1988).

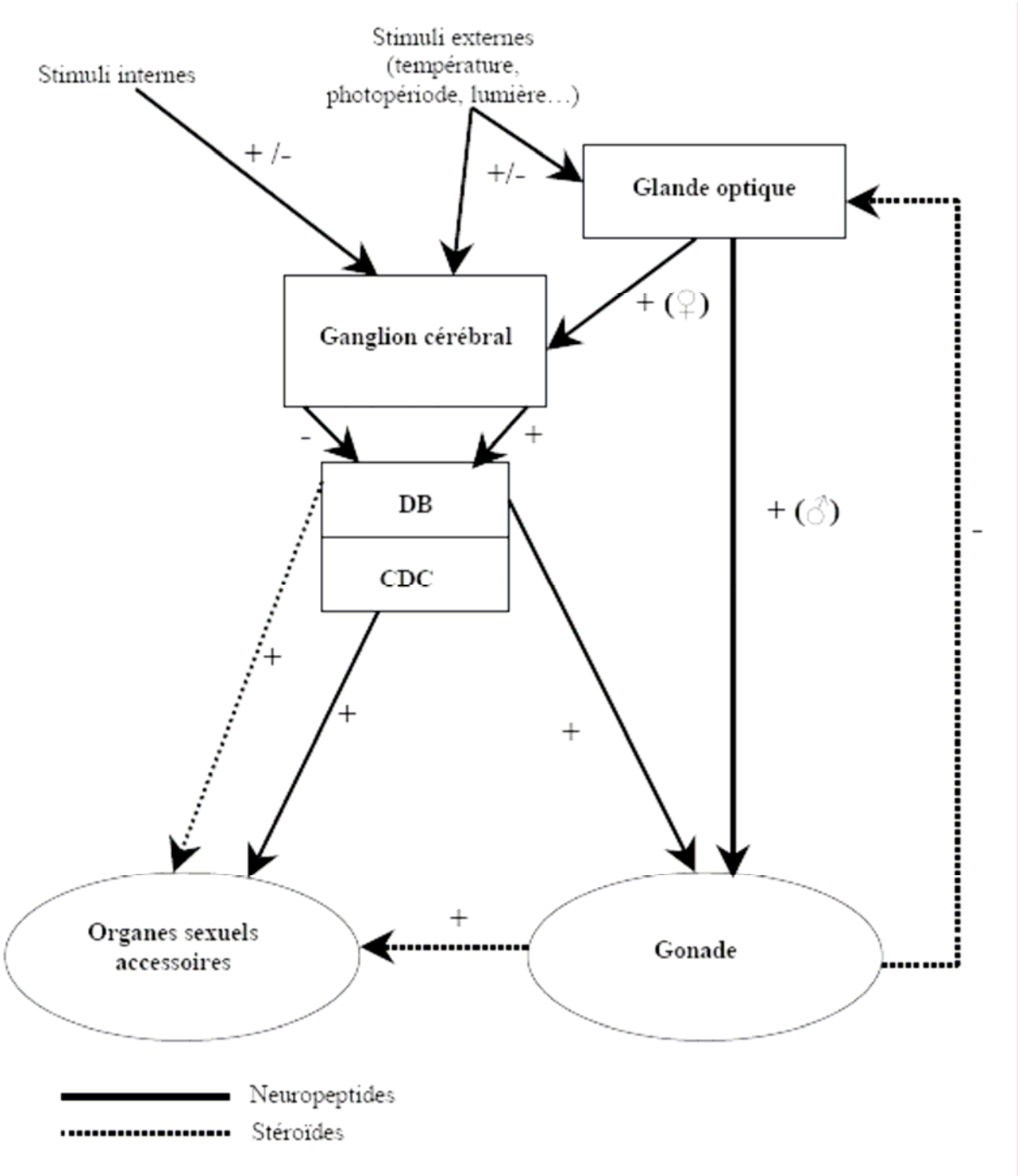


Figure I-13 : Schéma théorique du contrôle hormonal de la reproduction chez les gastéropodes prosobranches d'après Joose (1988). DB : dorsal body, CDC : centro caudal cells

1. Neuropeptides

Le système endocrinien des mollusques est centré sur des centres neurosécréteurs du système nerveux central : les **ganglions cérébral, pleural, pédal et abdominal**. Les produits de sécrétions de ces sites sont les neuropeptides (LeBlanc *et al*., 1999). Les glandes endocrines sont apparues chez les Mollusques, bien que des cellules endocrines soient retrouvées chez les annélides (LaFont 2000).

Les neuropeptides sont bien plus connus que les hormones stéroïdiennes chez les mollusques. Il existe de nombreux peptides différents, aussi bien du point de vue de leur structure que de leur fonction. De plus, de nombreux peptides existent dans des isoformes très proches, qui sont souvent issus de la même protéine précurseur. Il est possible que cette multiplicité de neuropeptides soit le signe de propriétés de signalisation chimique complexes augmentant les capacités de gestion de l'information. Une redondance fonctionnelle est également suspectée (Nassel 1996). Il convient de rappeler que des molécules apparentées structurellement avec des hormones de vertébrés, peuvent avoir des rôles totalement différents chez les invertébrés. Il faut donc éviter de généraliser les conclusions que l'on peut obtenir sur un nombre restreint d'espèces (LaFont 2000).

Les peptides les plus connus sont l'**hormone gonadotropique** et l'**hormone de ponte**, les **peptides insulin-like** et le peptide cardiaccélérateur **FMRFamide** (LeBlanc *et al*., 1999).

a. Contrôle endocrinien de la reproduction

Peu d'informations sont disponibles concernant le contrôle endocrinien des prosobranches, en dehors des mécanismes de contrôle de l'excrétion de gamètes. En revanche, des connaissances pointues sont disponibles sur le phénomène de réversion de sexe et de son contrôle endocrinien (LaFont 2000).

Les deux principaux neuropeptides identifiés sont l'hormone gonadotropique et l'hormone de ponte. L'**hormone gonadotropique**, produite par les cellules vert pâle (LGC) du ganglion cérébral au niveau de masses dorsales joue un rôle dans la différenciation sexuelle, la maturation gonadique et l'ovulation. L'**hormone de ponte** (egg-laying hormone) est produite par le ganglion abdominal et contrôle la maturation gonadique, la production d'œufs et le comportement de ponte (Nassel 1996). Les données présentées par la suite ont été obtenues

majoritairement sur des pulmonés et ne sont donc qu'indicatives du fonctionnement chez des prosobranches.

α Gamétogénèse

La gonade juvénile est bisexuelle. Il semble que le ganglion cérébral relâche un facteur androgénique pendant la période mâle du développement. La réversion de sexe commencerait après le relâchement d'un facteur neuroendocrinien féminisant, par l'encéphale. Egalement un facteur mitotique a été mis en évidence dans l'hémolymphe de *Patella vulgata*, qui serait de nature neuroendocrinien (Joose 1988).

β Organes sexuels accessoires

La régression des organes sexuels accessoires mâles en femelle se fait sous l'action de centres tentaculaires et neuroendocrines. Un facteur sécrété par le ganglion cérébropleural stimule la sécrétion de la neurohormone du ganglion pédal (Joose 1988).

χ Facteurs environnementaux

Dans les espèces chez lesquelles le phénomène de réversion de sexe a été étudié, la sécrétion des facteurs neuroendocriniens responsable est sous dépendance de facteurs environnementaux, notamment l'environnement social (Joose 1988).

δ Contrôle de la ponte

La ponte est induite par l'ajout de prostaglandines E ou F dans l'eau environnante. La sécrétion de prostaglandine endogène peut être stimulée par l'ajout de péroxyde d'hydrogène dans l'eau de culture, et inhibée par l'ajout d'aspirine. Il est probable que la ponte soit naturellement induite par un ensemble de facteurs environnementaux spécifiques. Il semble que la neurohormone des prosobranches soit de nature peptidique (Joose 1988).

b. Contrôle endocrinien de la croissance corporelle et de la coquille

La croissance du corps du mollusque doit être intimement liée à celle de sa coquille, en raison des relations spatiales entre les parties dures et molles du corps, qui déterminent les capacités comportementales de l'animal. La coquille a non seulement un rôle de protection contre les prédateurs, mais également d'attache du muscle, de protection contre la dessiccation, de réservoir de calcium et de carbonate… (Joose 1988).

c. Contrôle de l'énergie et du métabolisme

Le glycogène est la forme de réserve énergétique la plus utilisée. Il est présent dans toutes les cellules, bien que chez les gastéropodes notamment, il existe des cellules de stockage spécifiques, présentes dans la partie antérieure du manteau, et entre les lobes de la glande digestive et l'ovotestis. Ces cellules stockent également des lipides et protéines (Joose 1988).

D'après Joose (1988), les mollusques ne présentent pas de système de contrôle de la concentration de glucose dans l'hémolymphe. En règle générale, la concentration de glucose est inférieure à 50 µg/ml, ce qui est très nettement inférieur aux valeurs observées chez les vertébrés.

Chez la limnée (*Lymnea stagnalis*), des auteurs ont identifié un neuropeptide Y homologue (NPY) jouant un rôle clef dans la régulation des flux énergétiques, mais n'ayant aucun effet sur la prise alimentaire. Il semble que les cellules de stockage du glycogène produisent un facteur leptin-like (storage feedback factor : LySFF), qui inhiberait la prise alimentaire. Ainsi, la prise alimentaire est régulée par la quantité d'énergie stockée. Les auteurs supposent que les neurones producteurs de NPY ont des récepteurs spécifiques pour le LySFF, ce qui lierait leur activité de régulation de l'homéostasie énergétique à l'énergie stockée (de Jong-Brink *et al*., 2001).

Il faut noter que la superfamille de l'insuline est bien représentée au sein des invertébrés. Cette molécule est ancienne d'un point de vue évolutif. Il est donc fort possible qu'il existe des **molécules insuline-like** chez les prosobranches (Joose 1988; Smit *et al*., 1998). Des cellules susceptibles de sécréter ces facteurs ont été identifiés chez plusieurs prosobranches (LaFont 2000).

d. Contrôle hormonal du volume corporel et de la composition ionique de l'hémolymphe

Les régulations ioniques et aqueuses sont capitales pour ces espèces vivant en milieu aquatique. Le volume de l'hémolymphe est, par exemple, très important dans le maintien de sa fonction de squelette hydrostatique. Un système diurétique a été mis en évidence chez *Lymnea stagnalis*, se situant dans le ganglion pleural, avec des cellules (Dark Green Cells) produisant un neuropeptide. Des cellules similaires ont été décrites dans les ganglions pariétaux et viscéraux

(Yellow Cells, et Yellow Green Cells). Enfin, des facteurs de régulation de la natrémie ont été observés. Ils sont produits au niveau du ganglion cérébral (Joose 1988).

Les hormones de type vasopressines sont conservées au sein de l'évolution, avec un rôle d'osmorégulation chez les mollusques, ainsi qu'un faible rôle dans la reproduction (Joose 1988).

e. Contrôle du rythme cardiaque

Le peptide cardioaccélérateur **FMRFamide** est bien décrit chez les mollusques et joue un rôle dans de nombreux processus physiologiques dont la régulation du rythme cardiaque (LeBlanc *et al*., 1999).

2. Hormones stéroïdiennes

a. Présence chez les mollusques

Les stéroïdes typiques des invertébrés, tels que l'ecdysone, ont rarement été décrits (LeBlanc *et al*., 1999). En revanche, de nombreux stéroïdes sexuels de type vertébrés ont été **identifiés** chez les mollusques, et plus particulièrement les gastéropodes dits prosobranches. Une revue de Janer et Porte (2007) fait le point sur toutes les études ayant détecté des stéroïdes chez des invertébrés, avec quelle technique de dosage et les quantités trouvées. Chez les Mollusques, les méthodes utilisées ont principalement été de type immunoassays, du fait de leur faible limite de détection. Des méthodes de type chromatographie liquide ou gazeuse couplée à un spectromètre de masse existent également (Labadie *et al*., 2007; Devier *et al*., 2010). Il est important de noter que les niveaux mesurés varient beaucoup suivant la technique utilisée, le stéroïde mesuré et l'espèce en question. En général ils sont compris entre le pg/g pour le 17β-œstradiol, jusqu'à la centaine de ng/g pour la testostérone ou l'androstènedione. Pour un stéroïde donnée, les niveaux peuvent varier d'un facteur 1 000 à 10 000 (Janer et Porte 2007).

La présence de stéroïdes sexuels n'est cependant en rien la preuve de leur rôle en tant qu'hormone. En effet, ils sont également retrouvés chez les plantes ou les crustacés, où ils n'ont aucun rôle. Néanmoins la synthèse *de novo* de stéroïdes sexuels a été décrite chez les mollusques, ce qui laisse supposer qu'ils joueraient un rôle physiologique. De plus de nombreux mécanismes d'action supposés du TBT passent par l'inhibition de l'action d'enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse, ce qui est également très en faveur d'un rôle des stéroïdes sexuels dans la reproduction des mollusques.

b. Synthèse théorique des stéroïdes

Bien que le rôle des stéroïdes soit encore débattu, les étapes clefs de la stéroïdogenèse ont été décrites chez les mollusques gastéropodes et bivalves (revues de Porte *et al*., 2006; Janer et Porte 2007). La figure I-14 résume la synthèse théorique des stéroïdes chez les mollusques d'après les données de la littérature.

Le **cholestérol** est métabolisé en prégnénolone par clivage de chaîne latérale par une *$C_{20,22}$-desmolase* (P450 scc) chez un gastéropode dit pulmoné, la limace *Ariolimax californicus* (Gottfried et Dorfman 1970).

La **pregnénolone** est soit convertie en **progestérone** par une *3β/Δ^5-Δ^4-hydroxystéroïde déhydrogénase* (3β-HSD-Δ^5-Δ^4-isomérase); chez les gastéropodes dits pulmonés *A. californicus* (Gottfried et Dorfman 1970), opisthobranche *Aplysia depilans* (Lupo Di Prisco et Dessi' Fulgheri 1975), et le bivalve *Mytilus edulis* (De Longcamp *et al*., 1974), soit en **17α-OH-prégnénolone** par une *17α-hydroxylase* chez *A. californicus* (Gottfried et Dorfman 1970)

La 17α-OH-prégnénolone peut être convertie en 17α-OH-progestérone par une *3β-HSD-Δ^5-Δ^4-isomérase* chez le *M. edulis* (De Longcamp *et al*., 1974).

La progestérone est un stéroïde de type vertébré actif, qui est également un précurseur d'autres stéroïdes sexuels et est métabolisé par des cytochromes P450 (*17α-hydroxylase*, *C_{21}-hydroxylase*, *11β-hydroxylase*) en **cortisol**, ou en **17α-OH-progestérone** (par une *17α-hydroxylase*), puis en androstenedione (*$C_{17,20}$-lyase*) chez *M. edulis* (De Longcamp *et al*., 1974), et *A.depilans* (Lupo Di Prisco et Dessi' Fulgheri 1975).

De manière intéressante, la progestérone semble être métabolisée en **20β-OH-progestérone** chez le gastéropode dit prosobranche, *Littorina littorea* (Lehoux et Williams 1971).

L'**androstenedione** est aussi synthétisé via la déhydroépiandrostenedione, ou **DHEA** (*3β-HSD-Δ^5-Δ^4-isomérase*), elle-même issue de la 17α-OH-prégnénolone par une *$C_{17,20}$-lyase* chez *A. californicus* (Gottfried et Dorfman 1970), *A.depilans* (Lupo Di Prisco et Dessi' Fulgheri 1975) et *M. edulis* (De Longcamp *et al*., 1974).

Une *17β-hydroxystéroïde déhydrogénase* (17β-HSD) catalyse la formation de **testostérone** à partir de l'androstenedione et réciproquement chez les bivalves *Crassostrea. gigas* (Le Curieux-Belfond *et al*., 2001), *M. edulis* (De Longcamp *et al*., 1974), *Ruditapes decusata*

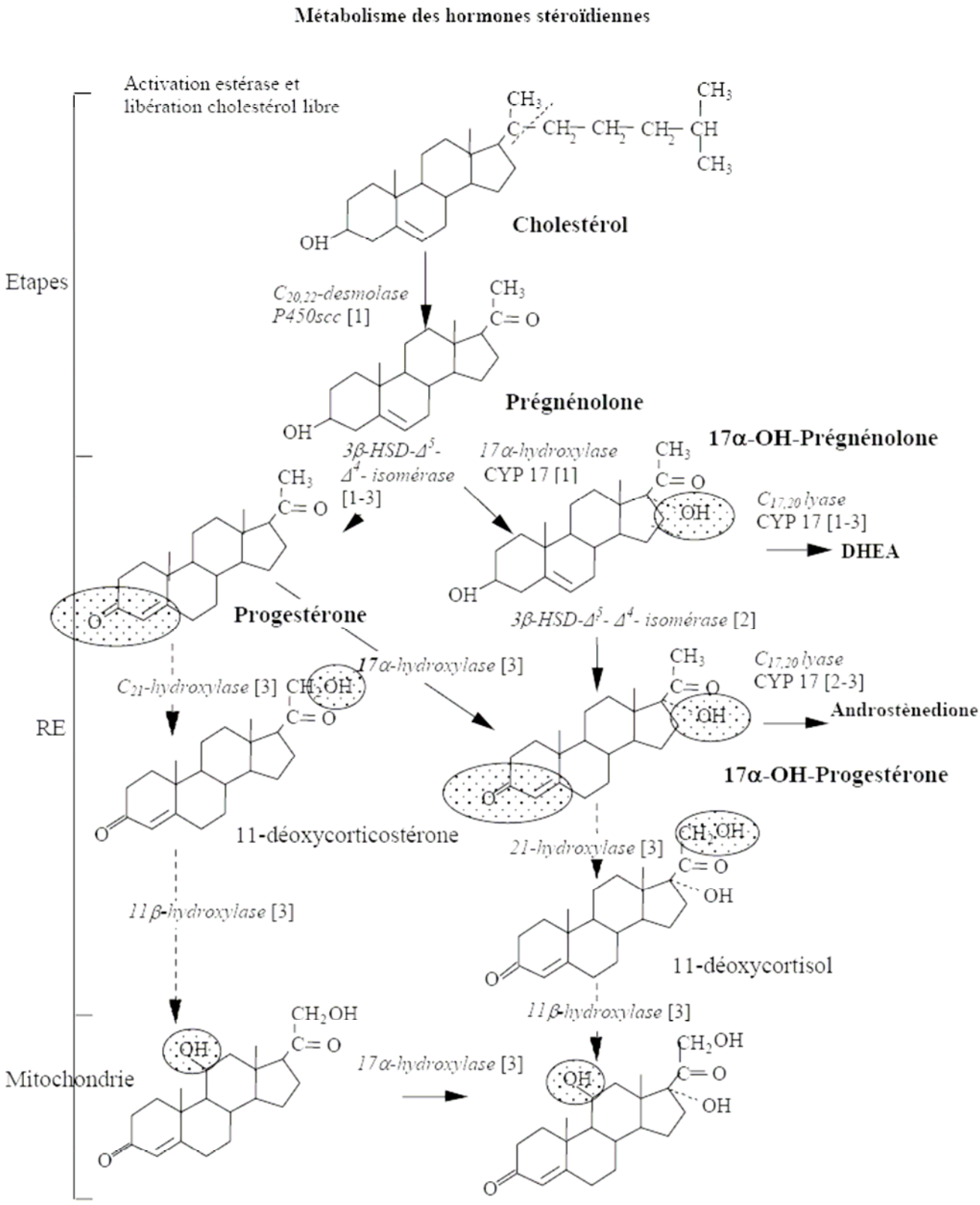
(Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b), et les gastéropodes dits prosobranches *L. littorea* (Ronis et Mason 1996), *Ilyanassa obsoleta* (Oberdorster *et al*., 1998) et le pulmoné *Helix. aspera* (Le Guellec *et al*., 1987).

L'androstenedione est également aromatisée en **œstrone** par l'action d'une *aromatase* cytochrome P450 dépendante chez *M. edulis* (Morcillo *et al*., 1999).

L'**œstradiol** est issu de l'aromatisation de la testostérone (*aromatase* cytochrome P450 dépendante) chez *L. littorea* (Ronis et Mason 1996), *H. aspera* (Le Guellec *et al*., 1987) ou de l'œstrone, via une *17β-HSD* et réciproquement chez *C. gigas* (Le Curieux-Belfond *et al*., 2001) et *M. edulis* (De Longcamp *et al*., 1974; Labadie *et al*., 2007).

Ainsi, la voie métabolique ressemble à celle des vertébrés, en utilisant la combinaison de cytochromes P450 et de stéroïde déshydrogénases pour transformer le cholestérol en stéroïdes sexuels (De Longcamp *et al*., 1974). Cette voie métabolique est à rapprocher du mécanisme d'action de certains perturbateurs endocriniens (notamment le TBT).

Il faut cependant remarquer que les **taux de conversion** des différents métabolites sont très faibles (en dessous de 0,1% pour les étapes antérieures à l'androstenedione, Gottfried et Dorfman 1970). Ces taux deviennent plus élevés en fin de chaîne métabolique (De Longcamp *et al*., 1974)


Métabolisme des hormones stéroïdiennes
Activation estérase et
libération cholestérol libre
Cholestérol
Etapes
$C_{20,22}$-desmolase
P450scc [1]
Prégnénolone
17α-OH-Prégnénolone
3β-HSD-Δ5-
Δ4- isomérase
[1-3]
17α-hydroxylase
CYP 17 [1]
$C_{17,20}$ lyase
CYP 17 [1-3]
DHEA
Progestérone
3β-HSD-Δ5- Δ4- isomérase [2]
17α-hydroxylase [3]
$C_{17,20}$ lyase
CYP 17 [2-3]
Androstènedione
C_{21}-hydroxylase [3]
RE
17α-OH-Progestérone
11-déoxycorticostérone
21-hydroxylase [3]
11β-hydroxylase [3]
11-déoxycortisol
11β-hydroxylase [3]
17α-hydroxylase [3]
Mitochondrie

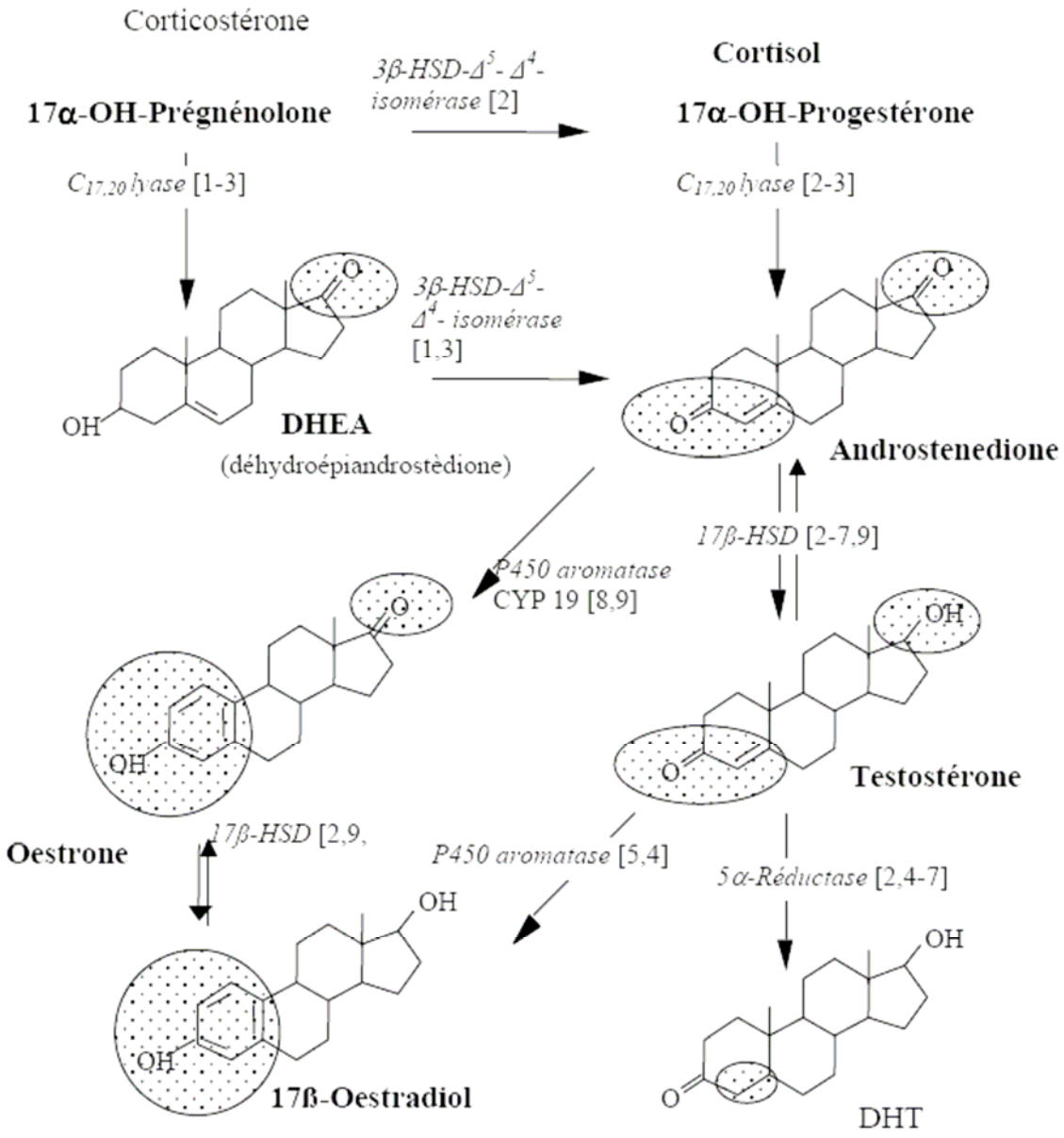


Figure I-14 : Métabolisme des stéroïdes chez les Mollusques, d'après [1] Gottfried et Dorfman, 1970 ; [2] De Longcamp *et al.*, 1974 ; [3] Lupo di Prisco et Dessi'Fulgheri, 1975 ; [4] Le Guellec *et al.*, 1987 ; [5] Ronis et Mason, 1996 ; [6] Oberdörster *et al.*, 1998b; [7] Morcillo *et al.*, 1998a ; [8] Morcillo *et al.*, 1999 ; [9] Le Curieux-Belfond *et al.*, 2001 ; [10] Labadie *et al.*, 2007

c. Devenir des stéroïdes sexuels

Les taux de conjugaison des stéroïdes, ainsi que les taux de biosynthèse et de déconjugaison, régulent les concentrations des stéroïdes, et jouent un rôle très important dans leur homéostasie. Peu de données sont cependant disponibles concernant les réactions métaboliques de phase II des stéroïdes (Janer *et al*., 2005d).

α Catabolisme : Réduction, hydroxylation et glucuronoconjugaison

L'activité 5α-réductase est importante dans le catabolisme de la testostérone et de l'androstenedione. La testostérone est réduite en **5α-dihydrotestostérone** (DHT) par une *5α-réductase* chez *M. edulis* (De Longcamp *et al*., 1974), *R. decussata* (Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b), *L. littorina* (Ronis et Mason 1996) et *I. obsoleta* (Oberdorster *et al*., 1998).

Chez le gastéropode *Marisa cornuarietis* l'androstenedione semble former préférentiellement la **5α-andostenedione** (DHA) via une *5α-réductase*, qui est ensuite réduite en DHT par une *17β-HSD* (Figure I-15). La testostérone n'est donc pas le métabolite majeur de l'androstenedione chez cette espèce. Il existe un dimorphisme sexuel des voies de métabolisation des stéroïdes sexuels dans cette espèce (voir plus loin) (Janer *et al*., 2005c, b; Janer *et al*., 2006a).

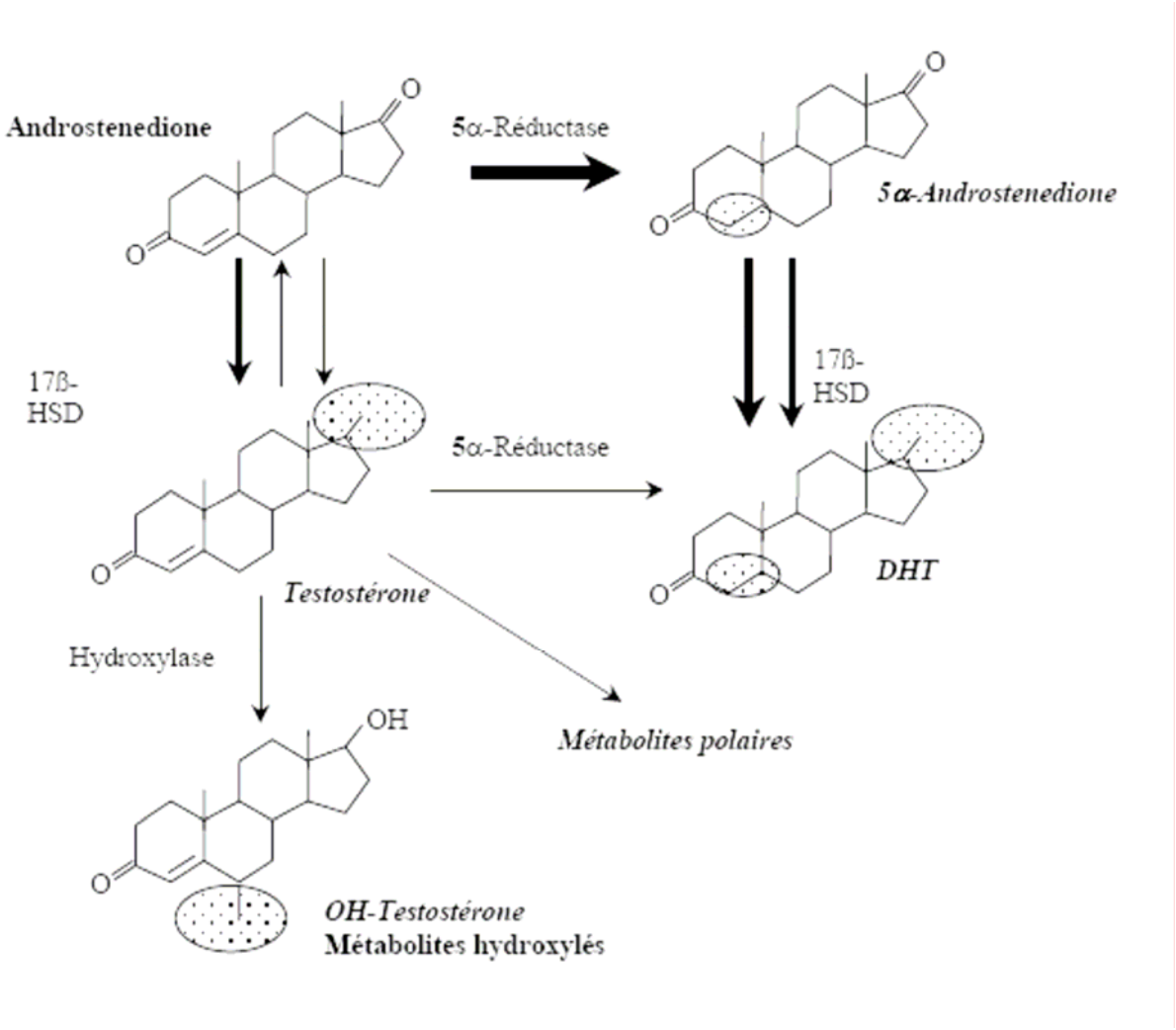


Figure I- 15 : Routes métaboliques de l'androstenedione et de la testostérone chez *M. cornuarietis* . L'épaisseur des flèches indique le taux de conversion de chaque métabolite, d'après Janer *et al*., 2005b, c, 2006a

ॐ Métabolites identifiés de l'androstenedione :

Il en existe de nombreux : la testostérone (De Longcamp *et al*., 1974; Lupo Di Prisco et Dessi' Fulgheri 1975; Le Guellec *et al*., 1987; Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b; Oberdorster *et al*., 1998), la 3β-androstenediol (Lupo Di Prisco et Dessi' Fulgheri 1975), la 3α-androstenediol (Gottfried et Dorfman 1970), la DHA (Gottfried et Dorfman 1970), l'androstérone (Gottfried et Dorfman 1970; Le Guellec *et al*., 1987), l'œstriol (Le Guellec *et al*., 1987) et l'œstrone (Morcillo *et al*., 1999).

Métabolites de la testostérone

La testostérone peut être catalysée en DHT et hydroxy-testostérone (6b, 6a, 15b; Ronis et Mason 1996; Oberdorster *et al*., 1998), androstenedione (Ronis et Mason 1996; Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b; Oberdorster *et al*., 1998), DHT-diols, 3β(α)-androstenediol (Gottfried et Dorfman 1970; Ronis et Mason 1996; Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b; Oberdorster *et al*., 1998), 5α-androstenedione (Gottfried et Dorfman 1970), dihydroandrostenedione (Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b), andostanediols (Oberdorster *et al*., 1998) et œstrone (Morcillo *et al*., 1998a; Morcillo *et al*., 1998b).

Métabolites de la progestérone

Les métabolites identifiés de la progestérones chez les mollusques sont la 20β-OH-progestérone (Lehoux et Williams, 1970), la 5α-pregnane-3,20-dione, la 3β-hydroxy-5α-pregnan-20-one, la 3β-hydroxy-4-pregnen-20-one (Hines *et al*., 1996) et la 11-désoxycorticostérone (Lupo Di Prisco et Dessi' Fulgheri 1975).

Formes de « stockage »

Les stéroïdes peuvent être inactivés par conjugaison. Les métabolites formés sont alors polaires (sulfatés et glycosilés) ou apolaires (conjugués avec des acides gras).

Formes sulfatées

Les **stéroïdes sulfatés** sont inactifs biologiquement, à cause d'une affinité pour leurs récepteurs médiocre, et une augmentation du taux d'élimination. Ils peuvent être à l'origine de stéroïdes actifs par l'action de sulfatases (Strott 1996). Ces conjugués sulfatés sont des métabolites majeurs des xénobiotiques hydroxylés chez les invertébrés (James 1987).

Les hormones stéroïdiennes semblent également subir ce type de biotransformation (Hines *et al*., 1996; Ronis et Mason 1996; Janer *et al*., 2005a; Janer *et al*., 2005d). Ainsi chez *L. littorea*, des métabolites sulfatés de la testostérone ont été identifiés (Ronis et Mason 1996). Chez *M. cornuarietis*, l'activité sulfotransférase sur la testostérone est **faible** (moins de 0,2pmol/min/mg de protéine) et quasiment indétectable. Cela peut peut-être s'expliquer par la forte activité sulfotransférase associée à certains tissus et par une forte affinité et une faible capacité des enzymes (Janer *et al*., 2005d).

La sulfatation de l'œstradiol est plus importante (de l'ordre de 6 à 12pmol/h/mg de protéine) chez *M. galloprovinciallis*, et pourrait jouer un rôle dans la régulation des taux de stéroïdes dans l'organisme (Janer *et al*., 2005a).

ॐ Formes estérifiées

L'**estérification** des hormones stéroïdes les rend apolaire, ce qui permet un stockage dans les tissus gras, une réduction d'activité et de biodisponibilité et une élimination plus difficile (Borg *et al*., 1995). Les esters de stéroïdes ne peuvent se lier à leurs récepteurs, mais peuvent être hydrolysés par des estérases, qui libèrent des formes actives. Ils sont considérés chez les mammifères comme des stéroïdes à vie longue (Hochberg 1998).

L'estérification de la testostérone chez un gastéropode a été mise en évidence pour la première fois chez *I. obsoleta*. Près de 70% des produits de biotransformation de la testostérone sont des esters, les métabolites restant étant certainement des conjugués multiples à des acides gras. Il semble donc que se soit la forme de stockage **majoritaire** (Gooding et LeBlanc 2001).

La majeure partie de la **testostérone** et de l'**œstradiol** chez *M. cornuarietis* est présente sous forme estérifiée. Seulement 4 à 30% de la testostérone est présente sous forme libre et 1 à 2% de l'œstradiol (Janer *et al*., 2006b). L'estérification de la testostérone chez *M. cornuarietis* par des acides gras a été évaluée (ATAT : activité testostérone acyltransférase Palmitoyl-CoA). Cette activité est présente (environ 100pmol/min/mg de protéine), avec une affinité forte pour la testostérone, mais une vitesse maximale relativement faible. Il est à noter que dans cette espèce c'est la métabolisation préférentielle de la testostérone. En effet, les auteurs ont retrouvé peu ou pas de métabolites réduits, hydroxylés ou oxydés (Janer *et al*., 2005c). Le taux de formation d'œstradiol-palmitoate est relativement proche de celui de la testostérone (24-105 pmol/min/mg de protéine). L'activité ATAT est sensiblement la même chez les mâles et les femelles de *M. cornuarietis*, avec très certainement, une même enzyme conjuguant l'E2 et la T (Janer *et al*., 2006b).

D'autres stéroïdes sont estérifiés chez les mollusques : le 17β-œstradiol a également *M. galloprovinciallis* (Janer *et al*., 2005a), *M. edulis* (Labadie *et al*., 2007) et *C. virginica* (Janer *et al*., 2004), la DHEA chez *C. virginica* (Janer *et al*., 2004). *M. edulis* concentre l'E2 et le stocke sous forme d'ester. Les esters principaux ont été identifiés. Il a ainsi été observé que cette espèce présente une activité acyltransférase C16-CoA importante, qui aboutit à l'estérification du cycle

D en acide gras conjugués. Le schéma d'estérification majeur est donc celui conduisant à des acides gras en **C16** (Labadie *et al*., 2007).

Le rôle physiologique de l'estérification des stéroïdes n'est pas élucidé chez les Mollusques. Il semble que l'estérification de la testostérone soit un **mécanisme de régulation de sa forme libre**, et donc une cible potentielle de polluants. Ainsi, l'exposition au TBT de *I. obsoleta* est à l'origine de l'élévation du taux de testostérone libre, par diminution de la synthèse ou augmentation de l'hydrolyse des esters de testostérone (Gooding et LeBlanc 2001; Gooding *et al*., 2003). Lors de l'exposition de *M. galloprovincialis* à de la T exogène, les niveaux de T libre restent constants jusqu'à des concentrations d'exposition élevées (2000 ng/L), alors que la T conjuguée augmente dès 20 ng/L (Fernandes *et al*., 2010)

L'estérification semble être, comme pour la testostérone, un mécanisme d'**inactivation de l'excès d'œstradiol**. Ce serait un élément de régulation de l'homéostasie des stéroïdes sexuels (Janer *et al*., 2005a). Il a été également supposé que les stéroïdes estérifiés étaient transférés aux œufs (Janer *et al*., 2006b).

d. Rôle des stéroïdes chez les Mollusques

La présence de stéroïdes sexuels est avérée chez les mollusques ainsi que leur synthèse, mais leur rôle physiologique n'est pas clairement défini. Ce sont des molécules anciennes d'un point de vue évolutif et bien préservées (Sandor et Mehdi 1979). Il existe de nombreuses informations qui laisse supposer un rôle des stéroïdes sexuels chez les mollusques, et qui sont résumées dans le tableau I-2. Ces données sont ensuite développées plus en avant dans cette section.

.

	Bivalves	**Gastéropodes**		
		Pulmonés	**Stylommatophara**	**Prosobranches**
Stéroïdogenèse au niveau des gonades	++ (Varaksina et Varaksin 1988; Matsumoto *et al*., 1997; Osada *et al*., 2004b).	++ (Takeda 1983).	++ (Krusch *et al*., 1979)	
Dimorphisme sexuel	+ (Mori 1969; Matsumoto *et al*., 1997; Wang et Croll 2004) - (Osada *et al*., 2004a; Gauthier-Clerc *et al*., 2006)			+ (Janer *et al*., 2005c; Janer *et al*., 2006a) - (Gooding et LeBlanc 2004; Sternberg *et al*., 2008a)
Lien des stéroïdes avec la gamétogenèse	+ (Mori 1969; Varaksina et Varaksin 1991; Varaksina *et al*., 1992; Matsumoto *et al*., 1997; Wang et Croll 2004) - (Li *et al*., 1998; Gauthier-Clerc *et al*., 2006)	+ (Takeda 1983; Takayanagi et Takeda 1985)	+ (Krusch *et al*., 1979)	
Lien avec l'expulsion de gamètes	+/- (Wang et Croll 2006).	+ (Takeda 1979)		
Liens avec les cycles sexuels	+ (Le Guellec *et al*., 1987; Reishenriques et Coimbra 1990; Matsumoto *et al*., 1997; Siah *et al*., 2002; Osada *et al*., 2004b; Gauthier-Clerc *et al*., 2006)			+/- (Sternberg *et al*., 2008a).
Effet sur l'expression de gènes et protéines (Vtg)	+ (Mori *et al*., 1972b, a; Li *et al*., 1998; Matsumoto *et al*., 2003; Osada *et al*., 2003; Gagne *et al*., 2005) +/- (Matozzo et Marin 2008)			

Tableau I- 2 : Synthèse des éléments en faveur et en défaveur du rôle des stéroïdes chez les mollusques. -: en défaveur, ++: très en faveur, +/-: résultats mitigés

α Distribution dans l'organisme, localisation de la stéroïdogenèse

ॐ *Patinopecten yessoensis* et *Crenomytilus grayanus*.

La présence de la **17β-HSD** (conversion de l'œstrone en E2 et vice et versa) dans les **testicules** et **ovaires** de ces deux espèces a été démontrée en histochimie. On l'a retrouve dans les cellules germinales et des hémocytes granulaires. L'activité de cette enzyme est supérieure dans les oocytres en croissance que dans ceux l'ayant terminée. En microscopie électronique, cette enzyme est retrouvée proche du réticulum endoplasmique lisse, ou bien à la surface externe de ses membranes et dans des globules lipidiques (Varaksina et Varaksin 1988).

ॐ *Crassostrea gigas*

Des incubations *in vitro* avec des extraits d'ovaires ont été réalisées. La présence de la **17β-HSD** a été mise en évidence (Matsumoto *et al*., 1997).

ॐ *Patinopecten yessoensis*

La présence de la **17β-HSD** a été mise en évidence par incubations *in vitro* avec des extraits d'ovaires (Matsumoto *et al*., 1997). Des études en immunohistologie ont été conduites sur cette espèce. La **3β-HSD** et l'**aromatase** seraient présentes dans les ovaires, dans des cellules le long des acini germinaux, et l'E2 serait dans les mêmes types cellulaires (Matsumoto *et al*., 1997). Chez les mâles, l'aromatase et l'E2 se trouvent dans des cellules distribuées le long de l'épithélium à l'intérieur de la paroi des acini (Osada *et al*., 2004b).

ॐ *Helix pomatia*

Chez cette espèce la présence de la **3β-HSD** a été mise en évidence par la conversion *in vitro* de la pregnenolone en progestérone et la DHEA en androstenedione, dans le dorsal body (Figure I-13), l'ovotestis et également le ganglion buccal (Krusch *et al*., 1979).

ॐ *Euhadra peliomphala*

L'activité **3-β-HSD** a été détectée chez cette espèce dans la glande hermaphrodite, ainsi que de la T, E2 et P par RIA (Takeda 1983).

β Dimorphisme sexuel

Placopecten magellanicus.

L'injection de PEA ou de DHEA chez des juvéniles modifie le sexe ratio en faveur des mâles, quelle que soit l'hormone utilisée (Wang et Croll 2004).

Mya arenaria.

Il n'y a pas de différence dans les titres d'E2 et de T entre des mâles et des femelles récupérés sur le terrain (Gauthier-Clerc *et al*., 2006).

Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis

L'E2, l'œstriol et l'œstrone ont été cherchés dans les deux sexes. Chez les mâles, seul l'E2 est présent dans les testicules. Chez les femelles, on retrouve de l'E2 majoritairement, de l'œstrone et sporadiquement de l'œstriol. L'E2 est l'œstrogène majeur. C'est confirmé par l'activité aromatase : les androgènes sont majoritairement convertis en E2 chez *Patinopecten yessoensis* (Matsumoto *et al*., 1997). Il n'y a pas de différence de quantité d'E2 dans les gonades entre les deux sexes (Osada *et al*., 2004b). Chez *C. gigas* l'injection d'E2 à un stade très précoce de la différenciation sexuelle provoque une inversion de sexe, du mâle vers la femelle (Mori *et al*., 1969).

Scobicularia plana

Les niveaux de P sont plus élevés chez les femelles et les niveaux de T chez les mâles mais uniquement dans des sites pollués (Mouneyrac *et al*., 2008).

Ilyanassa obsoleta

Il n'y a pas de différence des profils de T et d'E2 chez les mâles et femelles au cours du cycle (Gooding et LeBlanc 2004; Sternberg *et al*., 2008a).

Marisa cornuarietis

La formation de T et de DHT à partir d'androstenedione est 3 à 4 fois plus importante chez les mâles *M. cornuarietis* que chez les femelles, alors que chez ces dernières, il y a formation préférentielle de DHA. Il semblerait que l'activité 17β-HSD soit plus forte chez les mâles (Janer *et al*., 2005c; Janer *et al*., 2006a). Les taux de T estérifiée chez *M. cornuarietis* sont nettement plus élevés chez les mâles que chez les femelles, indépendamment de la saison

d'échantillonnage. Les taux de stéroïdes libres ne présentent pas de dimorphisme sexuel particulier (Janer *et al*., 2006b).

χ Lien des stéroïdes avec la gamétogenèse

ॐ *Mizuhopecten yessoensis*.

L'injection de stéroïdes sexuels chez cette espèce **stimule le développement des testicules**. Les zones acineuses, les zones de prolifération, de croissance et de développement des cellules sexuelles sont augmentées. La prolifération des spermatogonies, la maturation des spermatocytes II et la formation des spermatides et spermatozoïdes sont augmentées. La T induit la prolifération à partir de la phase de repos de manière plus efficace, alors que l'E2 est plus efficace lorsqu'il est injecté au début de la gamétogenèse (Varaksina *et al*., 1992).

L'injection de stéroïdes sexuels dans cette espèce stimule également le **développement des ovaires**. Ces hormones stimulent considérablement l'activité mitotique des gonies au stade d'inertie sexuelle. Les stéroïdes accélèrent la croissance des cellules sexuelles au début et lors de la gamétogenèse. Le poids des ovaires, l'indice gonadique et la taille des acini, des oocytes et de leur noyau sont augmentés (Varaksina et Varaksin 1991).

ॐ *Placopecten magellanicus*.

Chez ce pétoncle, l'E2 et la DHEA stimulent la **croissance d'oocytes** différenciés chez des juvéniles (Wang et Croll 2004).

ॐ *Mya arenaria.*

Les auteurs n'ont pas observé de corrélation entre les concentrations d'E2 dans les femelles et le diamètre moyen des oocytes pendant la vitellogenèse (Gauthier-Clerc *et al*., 2006).

ॐ *Crassostrea gigas et Patinopecten yessoensis*

Dans les ovaires, l'E2 est majoritaire, et son profil est synchronisé avec les variations de diamètres oocytaires et l'indice gonadique (Matsumoto *et al*., 1997). Chez *C. gigas*, l'E2 accélère la croissance ovarienne, et la maturation sexuelle des femelles (Mori 1969) et l'injection d'E2 dans la gonade, tous les 10 jours pendant 40 jours, provoque une augmentation du diamètre oocytaire (Li *et al*., 1998).

- ***Ruditapes decussatus***

La P chez les mâles et la T chez les deux sexes pourraient être impliqués dans la régulation de l'émission de gamètes. La T semble jouer un rôle dans la maturation sexuelle des mâles. Chez les femelles, une augmentation de l'E2 au début de la vitellogenèse est notée (Ketata *et al*., 2007a).

- ***Euhadra peliomphala.***

Chez cet escargot terrestre, la quantité de stéroïdes mesurée par RIA est importante pendant la période de reproduction, et faible en dehors. L'injection de T fait augmenter les cellules germinales mâles et cet effet est inhibé par un antiandrogène. La spermatogenèse est accélérée lorsque des morceaux de glande hermaphrodite sont cultivés dans un milieu contenant de la T, tandis que la présence d'E2 favorise l'oogenèse. Ces effets sont inhibés par des substances anti-stéroïdes. L'injection de ces deux stéroïdes chez des individus castrés ou non, induisent un développement graduel des organes sexuels accessoires, avec une spécificité de la T pour les organes mâles et de l'E2 pour les organes femelles. De nouveau ces effets peuvent être inhibés par des substances anti-stéroïdes (Takeda 1983).

La gamétogenèse est sous contrôle du ganglion cérébral et de la glande optique. La spermatogenèse dépend de la glande optique, tandis que l'oogenèse dépend du ganglion cérébral. Un feed-back négatif est exercé par la glande hermaphrodite. Le même effet est obtenu lors de l'injection de T (Takayanagi et Takeda 1985).

Lorsque la glande hermaphrodite est cultivée avec des extraits de la glande optique et du ganglion cérébral, la sécrétion de T est stimulée par le ganglion cérébral et celle d'E2 par la glande optique. Le volume nucléaire de la glande optique est diminué lorsqu'elle est cultivée dans un milieu contenant des extraits de la glande hermaphrodite ou des PEA. De nouveau la T exerce un feed-back négatif sur la glande optique. De plus, lorsque le ganglion cérébral est cultivé en présence d'extrait du ganglion optique, les cellules présentent une coloration plus importante, indicatrice que la glande optique agit sur le ganglion cérébral comme un facteur d'activation. De son côté, la glande optique est indépendante du ganglion cérébral pour son activation. Elle dépend cependant de la photopériode (Takeda 1983).

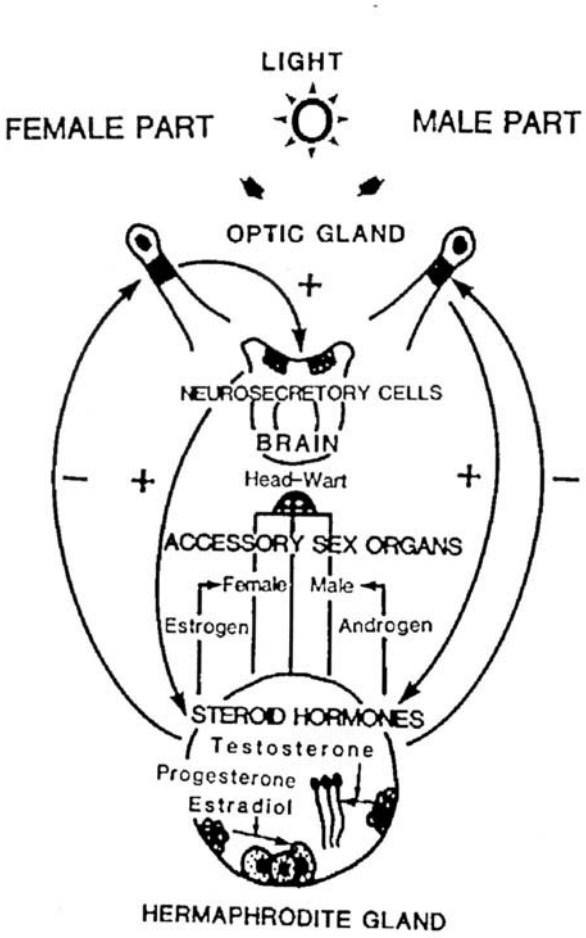


Figure I- 16 : Schéma de régulation endocrine théorique chez *E. peliompha* (Takeda, 1983)

♌ *Helix pomatia*

L'activité 3β-HSD chez cette espèce varie suivant l'état physiologique. Il semblerait que la voie de synthèse passant par la DHEA soit préférentiellement utilisée dans le dorsal body (Figure I-13) et le ganglion buccal avant et après l'oviposition, et également dans l'ovotestis avant l'oviposition. Après l'oviposition, la voie de synthèse passant par la P est utilisée préférentiellement dans l'ovotestis (Krusch *et al*., 1979).

♌ *Helix aspersa*

La conversion de l'androstenedione en T est identique chez différents stades de maturité de gastéropode, alors que sa conversion en 5α-DHT et en androstérone est nettement plus importante chez les adultes que chez les juvéniles. Dans les gonades des juvéniles, la T est le métabolite principal de l'androstenedione, alors que c'est l'androstérone chez les adultes. Cet

élément est en faveur d'un rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques (Le Guellec *et al*., 1987).

δ *Lien avec l'expulsion de gamètes*

Placopecten magellanicus.

In vitro

Chez cette espèce, les stéroïdes sexuels semblent provoquer l'expulsion des gamètes chez les deux sexes. L'E2 (10^{-5} à 10^{-8}M chez la femelle et 10^{-5} à 10^{-7}M chez le mâle) et la progestérone (10^{-7} à 10^{-8}M chez la femelle et 10^{-5} à 10^{-7}M chez le mâle) potentialisent l'expulsion de gamètes induite par la sérotonine dans les deux sexes. La T (10^{-5} à 10^{-7}M), elle, ne potentialise que chez le mâle (Wang et Croll 2003).

In vivo

Aucun effet significatif sur le nombre de pétoncle émettant des gamètes n'est noté après injection de stéroïdes. Cependant, le nombre de gamète émis et le temps après injection sont significativement modifiés. Chez les femelles, l'E2 induit l'émission de gamètes en plus grande quantité et plus rapidement, tandis que la T n'a pas d'effet. La P augmente la latence d'émission des gamètes, et diminue leur quantité. Chez les mâles, l'E2 et la T induisent la l'émission de spermatozoïdes en plus grand quantité, et la T diminue également la latence. La P a le même effet que chez les femelles (Wang et Croll 2006).

Deroceras reticulatus et Limax flavus

Des injections d'E2 chez ces espèces provoquent une augmentation du nombre d'œufs pondus, avec un taux de développement faible. La DHEA semble plutôt augmenter le taux de développement. L'auteur a posé l'hypothèse d'une régulation hormonale de la reproduction du même type que chez les vertébrés : un axe hypothalamus (ganglion cérébral)-hypophyse (glande optique) et gonades (Takeda 1979).

ε *Liens avec les cycles sexuels*

Mytilus edulis.

Les taux de **P** de la moule ont été suivis (GLC et RIA) pendant une année entière sur des animaux provenant du terrain. Les plus hauts taux de P correspondent aux **périodes**

d'émission de gamète. Il n'y a pas de différences notables entre les mâles et les femelles (Reishenriques et Coimbra 1990). Le suivi GC-MS de la pregnénolone et progestérone dans la glande digestive de cette espèce montre une variation annuelle des deux composés. Les pics de P observés coïncident également avec les périodes d'émission de gamètes, ce qui semble lier cette hormone et la gamétogenèse (Devier *et al*., 2010).

- ***Mya arenaria.***

Les niveaux de T, P et E2 chez cette espèce ont été suivis pendant un cycle reproductif chez les mâles et les femelles. La P dans les gonades augmente pendant la phase mature des gonades mâles et pendant la phase **d'émission des gamètes** chez la femelle (Siah *et al*., 2002). L'**E2** et la **T** augmentent au début de la **vitellogenèse** chez les femelles, et pendant la période d'**émission de gamètes** chez les deux sexes (Gauthier-Clerc *et al*., 2006).

- ***Crassostrea gigas et Patinopecten yessoensis***

Les taux d'E2, d'œstriol et d'œstrone ont été suivis chez ces deux espèces pendant un cycle reproducteur. Dans les testicules, seul l'E2 est détecté et ne varie pas avec le cycle. Dans les ovaires, l'**E2** est majoritaire, et son taux maximal est pendant la période d'**émission des gamètes**. Les auteurs considèrent que les variations saisonnières d'E2 sont associées au cycle reproductif et sont impliquées dans la régulation des protéines des œufs (Matsumoto *et al*., 1997).

- ***Patinopecten yessoensis***

L'activité de la 17β-HSD chez cette espèce est corrélée avec le cycle reproductif : une différence est observée entre la période après l'émission de gamètes et le début de la période de différenciation. Ces variations d'activité enzymatiques sont supposées être le reflet de la dynamique du métabolisme des stéroïdes (Matsumoto *et al*., 1997). L'activité aromatase et la quantité d'**E2** dans les gonades sont maximales pendant la phase de **croissance** et de **maturité des gonades**, et diminuent lors de la période d'émission des gamètes. La quantité d'œstrone, elle, ne varie pas. La quantité d'E2 retrouvée varie de la même manière que l'activité aromatase, ce qui tend à prouver que l'hormone est synthétisée sur place et ne provient pas du milieu (Osada *et al*., 2004b).

ॐ ***Scobicularia plana***

Les taux d'**E2** sont corrélés positivement avec le **développement des gonades**. Les taux de P sont significativement plus élevés au début de la gamétogenèse chez les femelles. Rien n'est observé concernant la T (Mouneyrac *et al*., 2008).

ॐ ***Ruditapes decussatus***

Les niveaux de T, P et E2 ont été mesurés en RIA tous les deux mois sur une année. Chez les deux sexes, des niveaux plus élevés de T et P en fin de gamétogenèse ont été observés. Les niveaux élevés de P pendant la période de repos pourrait être une période de reconstitution des stocks avant la prochaine phase de ponte. Chez les mâles niveau élevé de T et P pendant l'émission de gamètes. Il semble que chez la femelle la température stimule la production de stéroïdes, notamment de la T (Ketata *et al*., 2007a).

ॐ ***Ilyanassa obsoleta***

Une diminution significative de la T totale et libre est présente chez les mâles depuis la recrudescence jusque la dormance. Bien que les niveaux de T libre soient supérieurs pendant la dormance chez la femelle, aucune variation significative n'est visible au cours du cycle. Chez le mâle il semble donc que la **T** joue un rôle dans la **recrudescence du tractus sexuel**.

Lest niveaux d'E2 sont également augmentés chez les femelles pendant la phase de dormance, alors qu'aucune tendance n'est perceptible pendant le cycle sexuel des mâles. L'E2 ne jouerait pas de rôle dans la recrudescence du tractus sexuel (Sternberg *et al*., 2008a).

ॐ ***Marisa cornuarietis***

Des variation saisonnières de formes libres et estérifiées des stéroïdes sexuels ont été notées, avec une plus forte proportion de stéroïdes conjugués à des acides gras pendant la **période de reproduction** chez *M. cornuarietis* (Janer *et al*., 2006b).

ϕ *Effet sur l'expression de gènes et protéines (Vitellogénine)*

ॐ ***Crassostrea gigas***

L'injection d'E2 accélère la **glycogénolyse** chez cette espèce uniquement chez les individus qui n'ont pas été affectés par un changement de sexe. L'accélération de la glycogénolyse antagonise l'induction du changement de sexe, et semble liée de près à

l'accélération de la maturité sexuelle (Mori *et al*., 1972a). Ces effets de l'E2 semblent également présents lorsque l'administration se fait *via* l'eau du milieu (Mori *et al*., 1972b).

L'injection d'E2 dans la gonade, tous les 10 jours pendant 40 jours, provoque une augmentation de la **vitelline** après 40 jours. Une expérience sur des ovaires disséqués a été réalisée pour confirmer le rôle de l'E2 sur la Vn. Après 3 jours d'incubation à 10^{-6}M d'E2, la quantité de Vn retrouvée augmente significativement par rapport au contrôle. Il semble donc que l'E2 induise la formation de vitelline, et également que cette formation se fasse dans l'ovaire (Li *et al*., 1998). L'ADNc de la **vitellogénine** a été isolé dans les ovaires de cette espèce. La synthèse se fait au niveau des cellules folliculaires de l'ovaire. Les variations saisonnières d'E2 sont corrélées avec les variations de la vtg. Les auteurs concluent que l'E2 soit un des facteurs contrôlant la sécrétion d'E2 (Matsumoto *et al*., 2003).

- ***Elliptio complanata***

Des injections d'E2 (2.2nmol) dans le muscle adducteur (72h) provoquent une augmentation dose dépendante de l'expression de la **Vtg**, et de son dosage par méthode directe (électrophorèse) et indirecte (ALP/ALL) (Gagne *et al*., 2005).

- ***Patinopecten yessoensis***

L'injection d'E2 *in vivo* dans l'ovaire pendant 90 jours provoque une augmentation significative de la quantité de **vitelline** au bout de 90 jours. Il semble que l'E2 soit un inducteur primaire de la synthèse de Vn chez cette espèce par l'intermédiaire d'un ER (localisés par immunohistochimie) dans les cellules auxiliaires associées aux oocytes (Osada *et al*., 2003). En effet, la synthèse de Vn se ferait dans les cellules auxilliaires associées aux oocytes par une voie hétérosynthétique, sans passage par l'hémolymphe. La vitellogenèse chez les bivalves serait sous le contrôle de l'E2 à un niveau transcriptionnel, et d'un peptide du SNC à un niveau traductionnel (Osada *et al*., 2004a).

- ***Tapes philippinarum***

L'exposition de cette espèce à différentes concentrations d'E2 (5 à 100ng/L, pendant 7 à 14 jours) induit des résultats variables. Lorsque les animaux sont en phase indifférenciée, la vtg dans l'hémolymphe est augmentée de manière dose dépendante, mais pas dans la glande digestive. Ces effets s'estompent en partie après 14 jours d'exposition. Si les animaux sont en phase de pré-ovulation, aucune augmentation dose-dépendante n'est observée (voire une

diminution dose-dépendante dans l'hémolymphe). Il semble donc que le contrôle de la synthèse de la vtg par l'E2 ne soit pas simple. Des périodes de sensibilité plus ou moins importante des bivalves à l'E2 ont été suggérées (Matozzo et Marin 2008).

- ***Mytilus edulis***

Une exposition de 10 jours de cette espèce à l'E2 (200ng/L) n'a pas induit l'augmentation de l'expression des gènes de la Vtg et de l'ER. Il faut cependant noter que les niveaux d'E2 libres sont restés constants, alors que les niveaux d'E2 estérifiés ont été augmentés. Il est donc fort probable que *M. edulis* ait « inactivé » l'E2 en le conjugant à des acides gras (Puinean *et al*., 2006).

γ Présence d'un récepteur aux œstrogènes (ER)

- ***Aplysia californica***

Une séquence pour l'ER a été isolée chez cette espèce en utilisant des amorces dégénérées. Cette séquence est orthologue à celle de l'ER des vertébrés. Ce clone se lie à l'ADN, mais par contre, ne se lie pas spécifiquement à l'E2 et est un activateur continuel de la transcription. Cependant il n'est pas exclu que ce récepteur lie l'E2 ou un autre ligand dans son contexte natif. De plus lorsque les auteurs ont synthétisé un récepteur aux estrogènes ancestral, celui-ci lie spécifiquement l'E2. Cette régulation par le ligand semble avoir été perdue chez *Aplysia* (Thornton *et al*., 2003).

- ***Octopus vulgaris***

De même que chez *Aplysia* un récepteur orthologue a été isolé. Il se lie à l'ADN, mais ne lie pas l'E2 et est un activateur constitutionnel de la transcription. Il est exprimé majoritairement dans les ovaires (Keay *et al*., 2006).

- ***Placopecten magellanicus.***

L'expulsion des gamètes *in vitro* chez *P. magellanicus*, potentialisée par les stéroïdes sexuels, se fait peut-être par l'intermédiaire des récepteurs aux stéroïdes. En effet, elles sont abolies par l'utilisation d'antagonistes de récepteurs (tamoxifene, 1.25µM, flutamide 2.5µM et RU486, 1µM) et par des inhibiteurs de la synthèse d'ARN (actinomycine D, 8µM) et de protéines (cycloheximide, 10µM). Cependant la spécificité de chaque antagoniste n'est pas absolue. L'action de l'E2 chez le mâle est en partie bloquée par le RU486, l'action de la T chez les mâles est bloquée par le tamoxifene et le RU486, et l'action de la progestérone est bloquée

par le flutamide dans les deux sexes. Seule l'action de l'E2 chez la femelle est uniquement bloquée par le tamoxifene. Cette réactivité croisée est peut-être normale, ou bien les stéroïdes peuvent se fixer sur plus d'un récepteur. Il est possible que les récepteurs aux stéroïdes chez les mollusques ne soient pas identiques à ceux des vertébrés (Wang et Croll 2003).

♁ ***Crassostrea gigas***

Dans cette espèce également, un ER a été cloné. Il ne semble pas lier l'E2 non plus. Par contre, il est localisé dans les noyaux des cellules folliculaires et des oocytes (Matsumoto *et al*., 2007).

♁ ***Thais clavigera***

Un récepteur aux œstrogènes a été cloné chez cette espèce. Comme précédemment, il est constitutionnellement actif et ne répond pas aux œstrogènes. Par contre il est principalement exprimé dans les ovaires pendant la période de maturation de la gonade (Kajiwara *et al*., 2006).

♁ ***Nucella lapillus***

Un ER orthologue a été identifié. Lors de l'exposition à des effluents œstrogéniques, une augmentation de l'expression de l'ER est observée, conjointement à la maturation sexuelle (Castro *et al*., 2007b)

♁ ***Marisa cornuarietis***

Chez cette espèce un ER orthologue a été cloné, ainsi qu'un ERR. Aucun de ces deux récepteurs ne lient l'E2, et ne présentent une expression tissulaire préférentielle (Bannister *et al*., 2007).

♁ ***Ilyanassa obsoleta***

Un récepteur a été identifié chez cette espèce. Au cours du cycle sexuel, les mâles expriment significativement plus d'ARNm de l'ER pendant la recrudescence du tractus sexuel, et le niveau d'expression diminue ensuite pendant le cycle. Il est donc possible que l'ER soit impliqué dans la recrudescence du tractus sexuel chez le mâle. Cela ne semble pas être le cas chez les femelles (Sternberg *et al*., 2008a).

η *Présence d'un récepteur aux androgènes*

Chez *I. obsoleta*, aucun AR a pas pu être isolé (Sternberg *et al*., 2008a).

ι Modes d'action potentiels des stéroïdes

Le mode d'action traditionnel des hormones *via* la liaison à un récepteur spécifique et une cascade d'évènements biochimiques n'a pas encore été mis en évidence chez les Mollusques. Ce manque est l'élément le plus en défaveur de leur rôle physiologique, malgré tous les éléments en faveur. Ils ne sont qu'on faisceau de preuve, ne se suffisant pas à eux même. Toutefois, d'autres modes d'action ont été proposés.

Un mode d'action par des **voies non-génomique** a été avancé. L'action des hormones stéroïdiennes interviendrait via des récepteurs à la surface des cellules, en association avec des protéines liant les hormones localisées dans l'hémolymphe, et impliquerait des voies de transduction du signal analogues à celles des neuropeptides. Les effets rapides seraient engendrés au niveau membranaire ou cytosolique, et résulteraient dans des effets locaux ou de régulation secondaire de transcription de gènes pour activer des cascades de phosphorylation. Ces actions sont certainement médiées par des récepteurs ayant de propriétés pharmacologiques différentes de celles des récepteurs nucléaires (Falkenstein *et al*., 2000). Des effets de ce type ont été montrés chez les Mollusques. Chez *M. edulis* l'E2 provoque une augmentation rapide du Ca2+ dans les hémocytes, et modifie la phosphorylation dans des voies de transduction du signal (Canesi *et al*., 2004). L'E2 induit aussi une libération rapide et dose-dépendante de NO par le ganglion pédieux (Stefano *et al*., 2003).

Certains auteurs ont suggéré que les stéroïdes sexuels joueraient leur rôle non pas par l'ER et l'AR, mais par le **RXR** (retinoid X recepteur). La T pourrait stimuler le RXR en modulant les niveaux endogènes d'acide rétinoïque, dont elle inhiberait l'estérification (Sternberg *et al*., 2008a).

Résumé :

Le contrôle de la reproduction chez les Mollusques est principalement de type **neuroendocrinien**.

Une composante stéroïdienne ne peut être exclue. La présence et la synthèse des **stéroïdes sexuels de type vertébrés** sont avérées.

Il existe de nombreux éléments en faveur de leur **rôle dans le contrôle de la reproduction**.

Cependant, l'absence de mise en évidence d'un **récepteur aux œstrogènes** fonctionnel empêche toute certitude sur leur rôle physiologique.

Aux vues de l'ensemble des éléments disponibles, il est possible que la mesure des stéroïdes sexuels de type vertébrés soit un **marqueur** potentiel de **perturbation de la reproduction**.

E / OBJECTIFS DES TRAVAUX

Les travaux de cette thèse s'insèrent dans une approche autour de deux espèces de gastéropodes d'eau douce, visant à proposer des outils d'évaluation de la qualité des milieux en rapport avec leurs effets reprotoxiques. En effet les perturbations qui affecteront directement ou indirectement la reproduction sont les premières à étudier car la dynamique des populations touchées est susceptible d'être modifiée.

L'objectif de notre travail a donc été de mettre en place des **marqueurs de suivi de la reproduction à différents niveaux d'organisation biologique (**individu et sub-individu) et d'appliquer ces marqueurs pour évaluer un effet éventuel de type perturbation endocrinienne aussi bien au **laboratoire** que sur le **terrain**. Des **recommandations** quant à l'utilisation des deux **espèces modèles** étudiées et des différents **marqueurs** seront données.

D'un point de vue pratique, la première étape du travail de thèse a consisté au développement de marqueurs de suivi de la reproduction à différents niveaux d'organisation biologique : de l'individu avec le suivi de la **fécondité**, au sub-individu avec des marqueurs tissulaires (**histopathologie**), biochimiques (**mesure des hormones stéroïdiennes**, de **molécules de réserves énergétiques**, de la **vitelline** et vitelline-like) et moléculaire (**expression de gènes**). La variabilité des ces marqueurs a été, en partie, explorée pour permettre une interprétation plus aisée de leurs variations lors des expositions de terrain ou de laboratoire : les effets de différentes températures d'exposition, et les variations lors d'un cycle annuel sur une population naturelle sont présentés.

Une attention particulière a été portée sur l'amélioration des connaissances sur la physiologie de la reproduction des espèces. Nous nous sommes focalisés sur les **stéroïdes sexuels de type vertébrés**, et de leur **lien potentiel avec le contrôle de la reproduction**. Cette étape est indispensable pour sélectionner des marqueurs biochimiques à l'échelle moléculaire et/ou cellulaire susceptibles de traduire des perturbations hormonales. Une méthode de dosage hautement sensible et spécifique en RadioImmunoAssay (RIA) a été développée. Des expérimentations, avec des perturbateurs endocriniens modèles, sont présentées pour mieux

évaluer la pertinence de la mesure de stéroïdes pour l'évaluation de la perturbation endocrinienne.

Nous avons ensuite appliqué les marqueurs développés à l'évaluation de la reprotoxicité d'un perturbateur endocrinien probable (la fluoxétine) sur les deux espèces lors d'**expérimentations de laboratoire**. Ces mesures ont enfin été mises en œuvre pour évaluer le stress reprotoxique ***in situ*** sur des organismes implantés en amont et en aval de source de pollution diverses. Leur utilisation combinée a permis de mieux comprendre les modalités d'apparition des effets toxiques à l'origine des effets observés. Lorsque les expérimentations ont été réalisées sur les deux espèces modèles, leur sensibilité respective a été étudiée.

CHAPITRE 2 :

METHODOLOGIE DE SUIVI DE LA REPRODUCTION A PLUSIEURS NIVEAUX D'ORGANISATION BIOLOGIQUE

Afin de permettre une identification fiable des risques engendrés par les polluants environnementaux, la connaissance des effets à **différents niveaux d'organisation biologique** est nécessaire (Ingersol *et al*., 1999; Jemec *et al*., 2010).

Pour essayer de comprendre les modalités d'apparition des effets reprotoxiques observés aussi bien lors d'expositions au laboratoire que sur le terrain, nous avons voulu mettre en place une **batterie de marqueurs** de suivi de la reproduction (Figure II-1). Le terme « marqueur » dans la suite du manuscrit comprendra l'ensemble des méthodes de suivi de la reproduction, aussi bien au niveau de l'individu (fécondité, fertilité, histopathologie) qu'au niveau sub-individu (niveaux de stéroïdes, protéines Vn-like, réserves énergétiques).

Des **traits de vie** ont été mesurés au niveau de l'individu, comme la survie, la fécondité ou encore la croissance des juvéniles. Ces modifications au niveau individuel ne sont cependant pas spécifiques d'effets de type perturbation endocrinienne. Des marqueurs sub-individuels ont donc été suivis pour évaluer l'action spécifique sur le système neuroendocrinien , ou bien si les effets sont simplement d'ordre reprotoxiques (Ingersol *et al*., 1999).

Ainsi, les modifications **histologiques** des gonades ou d'autres organes ont été évaluées pour objectiver d'éventuelles lésions tissulaires incluant, ou non, le tissu reproducteur. Au niveau sub-individuel, des marqueurs biochimiques en relation directe, ou indirecte, avec la reproduction ont été développés. Le **statut énergétique** (triglycérides, protéines, cholestérol) des organismes a été évalué, ainsi que la production de **protéines vitelline-like**. Une méthode de dosage des **stéroïdes sexuels de type vertébrés** a aussi été développée. Dans la mesure où un effort particulier a été réalisé concernant ces derniers, le chapitre 3 leur est entièrement consacré, car nous avons essayé de lier ces mesures à la reproduction, leur implication dans son contrôle n'étant que suspectée et non pas avérée. Il est en effet très compliqué de mettre en place des marqueurs spécifiques de perturbation endocrinienne chez les mollusques car leur système endocrinien est méconnu. Nous avons donc voulu déterminer si la mesure de stéroïdes sexuels était un marqueur spécifique.

Ce chapitre apporte l'essentiel de la méthodologie développée et appliquée au cours de ce travail. Dans un premier temps, nous présentons le choix des différents marqueurs de suivi de reproduction et le développement de la méthode de mesure, si celui-ci a eu lieu. Par la suite, les méthodologies d'exposition au laboratoire et *in situ* sont décrites. Enfin, une partie de la variabilité des marqueurs de suivi de reproduction est décrite, d'une part la variabilité naturelle, et d'autre part celle induite par des températures d'exposition différentes.

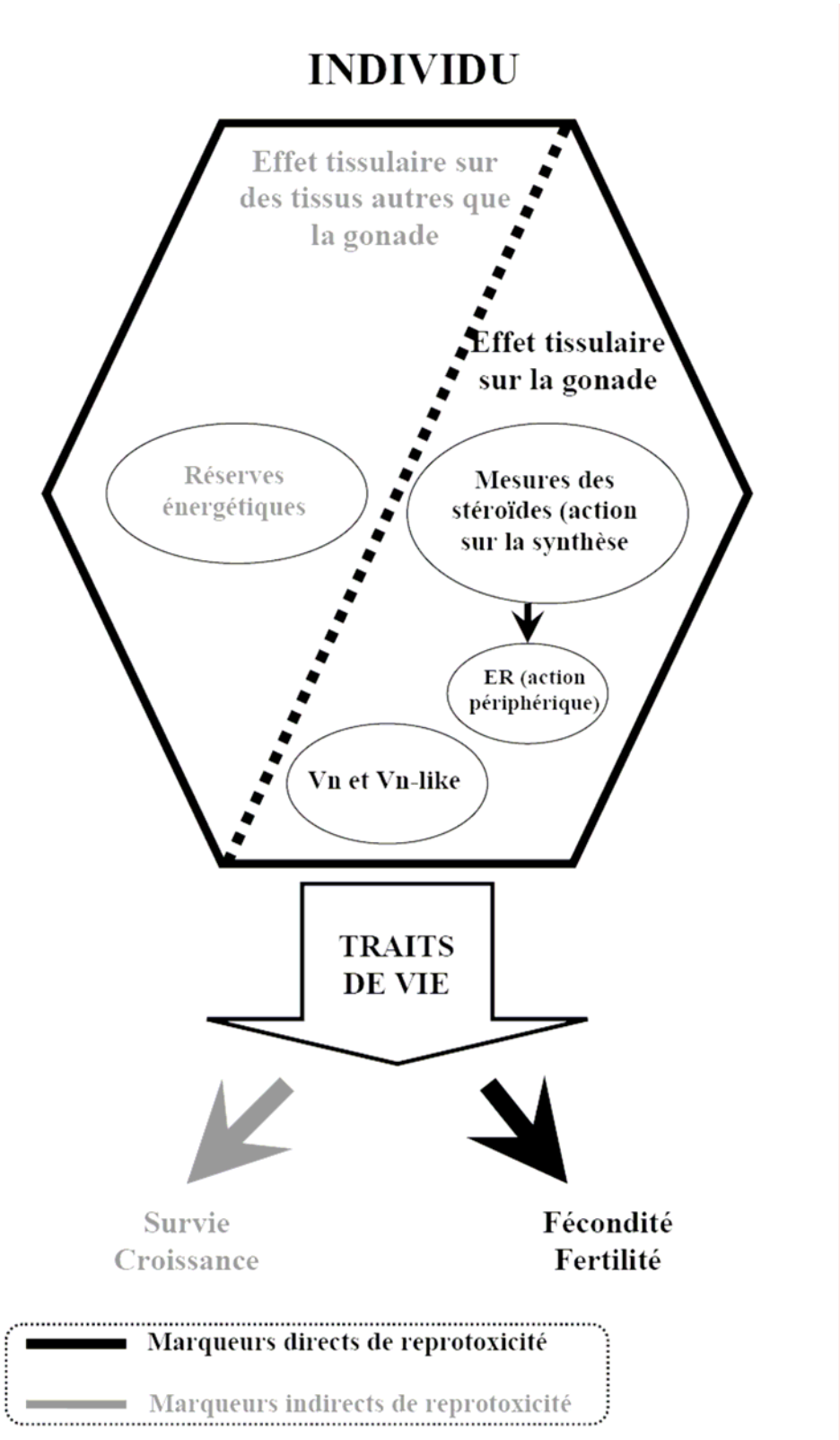


Figure II-1 : Schéma théorique de l'organisation des différents marqueurs et de leurs liens avec la reprotoxicité

A / CHOIX DES MARQUEURS ET JUSTIFICATION

Il semble important de préciser ici, qu'avant le début de notre travail, très peu de marqueurs étaient disponibles chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis*. Le suivi de reproduction de *V. piscinalis* avait été décrit par Ducrot *et al*. (2006), lors d'expositions *via* les sédiments. Concernant *P. antipodarum*, seul le suivi de fécondité (nombre d'embryons dans la poche embryonnaire) avait été décrit par Watton et Hawkes (1984), puis repris plus récemment par Duft *et al*. (2003b). Le décompte des juvéniles nés était également réalisé au laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref.

1. Individu

a. Suivi de la reproduction

Les mesures de fertilité et de fécondité permettent d'apprécier, au niveau de l'individu, les effets des polluants sur la reproduction, et d'en tirer des conclusions quant à l'altération potentielle de la **dynamique de population**. Il semble inconcevable de vouloir évaluer des effets de type perturbateurs endocriniens, qui auraient des conséquences sur la reproduction, sans mesurer en premier lieu la reproduction elle-même !

La **fécondité** peut être mesurée en comptant le nombre de masses et d'œufs par masse chez *V. piscinalis*, et le nombre d'embryons dans la poche embryonnaire chez *P. antipodarum*.

La **fertilité** est, elle, évaluée en comptant le nombre de juvéniles pondus par *P. antipodarum* et le nombre d'œufs éclos chez *V. piscinalis*.

b. Analyses histologiques et immunohistologiques

L'histopathologie est un outil intéressant permettant l'identification plus spécifique des dangers. En effet, en permettant l'identification des **tissus cibles**, elle peut donner une indication des mécanismes d'action en jeu. Les méthodes histologiques apparaissent plus sensibles que les tests écotoxicologiques classiques lorsque les effets au niveau tissulaires sont visibles à des concentrations inférieures. Cela augmente la capacité discriminative des schémas expérimentaux. De plus, l'utilisation d'espèces de **petite taille** présente un avantage certain lors de l'application de cette technique. Elle permet l'observation rapide de nombreux organes simultanément, facilitant le « screening » (Najle *et al*., 2000; Wester *et al*., 2002). En revanche, l'histologie ne

permet pas de traiter un grand nombre d'échantillons, et présente un temps de mise en œuvre non négligeable.

En complément, l'immunohistologie permet la mise en évidence de protéines dans des coupes histologiques. Elle peut être utilisée pour évaluer la **distribution** et un niveau d'expression d'un certain type de protéine dans des organes ou types cellulaires d'intérêt. Cette technique présente cependant des limites. En effet, elle est basée uniquement sur la reconnaissance des protéines par un **anticorps**. Cela implique de disposer d'un anticorps spécifique de la protéine recherchée. Or, les anticorps communément disponibles peuvent être peu nombreux, car ils sont développés contre des protéines issues d'espèces particulières (homme, animaux de laboratoires…). Cela implique qu'ils ne présentent pas nécessairement une antigénicité croisée avec la protéine cible de l'espèce étudiée. Il convient donc d'interpréter avec prudence les résultats obtenus avec cette technique, s'ils ne sont pas issus d'anticorps spécifiques de l'espèce. En revanche, dans le cas de protéines très conservées au plan phylogénétique, des anticorps produits pour des espèces éloignées peuvent très bien reconnaître la protéine dans une autre espèce.

2. Sub-individu

a. *Réserves énergétiques*

Les réserves énergétiques sont d'une importance considérable dans la reproduction et le stockage saisonnier d'énergie chez les mollusques. Leur utilisation est liée de près aux conditions environnementales et au **cycle gamétogénique**. L'énergie est stockée avant la gamétogenèse, quand la nourriture est abondante sous forme de glycogène, de lipides et de protéines. L'importance relative de ces substrats (glycogène ou triglycérides majoritaires) varie en fonction des espèces (Ojea *et al*., 2004 et références citées).

Les **Triglycérides** (TG) représentent la forme de **réserve énergétique** lipidique majeure, très liée au cycle reproductif. La deuxième forme de réserve énergétique très importante est le **glycogène** (Berthelin *et al*., 2000).

Les stérols, tels que le **cholestérol**, ont surtout un rôle structural important (Pazos *et al*., 2003; Ojea *et al*., 2004), puisque sa forme libre lui permet de jouer sur la fluidité des **membranes**. Ce sont aussi des **précurseurs des hormones stéroïdiennes**. Le cholestérol est

présent sous deux formes : estérifié et libre (forme majoritaire). Le cholestérol estérifié est une forme de stockage représentant un pool métabolique immédiat (Abad *et al*., 1995)

Les **protéines** sont principalement une composante **structurale**, notamment des gonades et des structures alentour impliquées dans la gamétogenèse. Elles sont liées de près à la maturation gonadique et sont le reflet de l'accumulation des protéines dans les oocytes. Elles ne rentrent dans le statut énergétique que lors de périodes de ressource alimentaire réduite (Berthelin *et al*., 2000; Serdar et Lok 2009). A ces protéines structurales s'ajoutent les protéines des œufs, telle la vitelline (Gagné *et al*., 2001).

b. Vitelline et vitelline-like

Un des effets les plus connus des EDCs est l'induction de la vitellogénine (Vtg) chez les mâles, la protéine précurseur des **protéines des œufs**, la vitelline (Vn). Cette mesure a été beaucoup utilisée pour mesurer l'impact des EDCs chez les vertébrés aquatiques et les bivalves (revues dans Porte *et al*., 2006; Matozzo *et al*., 2008). La Vn est une protéine peu conservée au plan phylogénétique. Elle est principalement un support énergétique du développement embryonnaire chez les organismes ovipares. Ce sont des protéines de haut poids moléculaire (300-600 kDa), riches en glucose, lipides, phosphates et contenant du Ca et du Zn comme ligands. Chez les femelles vertébrées la Vtg est synthétisée dans le foie et transportée, par le sang, dans les ovaires (Nagler *et al*., 1987). Depuis une dizaine d'années, leur mesure est effectuée chez les bivalves comme marqueur de la perturbation endocrinienne (Li *et al*., 1998; Gagné *et al*., 2001). Chez le poisson, les méthodes traditionnelles sont immunologiques (Jobling *et al*., 2003), mais, ces méthodes sont difficilement réalisables chez les mollusques du fait de la faible réactivité croisée des anticorps, conséquence notamment de la faible conservation phylogénétique (Li *et al*., 1998). En conséquence, des méthodes indirectes de dosage biochimique ont été développées (Gagné *et al*., 2004).

c. Stéroïdes sexuels de type vertébré

Le chapitre précédent a fait le point sur l'état actuel des connaissances concernant les liens entre les stéroïdes sexuels et la reproduction des mollusques. De nombreux éléments sont en faveur de leur rôle dans le contrôle de la reproduction, notamment les hypothèses concernant le mécanisme d'action présumé du TBT (modulation de leur synthèse). En conséquence, la mesure des principaux stéroïdes sexuels (E2, T et P) a été développée chez les deux espèces

étudiées au cours de ce travail. Les travaux réalisés dans ce domaine sont présentés dans un chapitre individualisé (Chapitre 3).

d. Expression de gène (ER-like)

Chez les vertébrés, l'E2 agit principalement par l'intermédiaire du récepteur aux œstrogènes (ER), dont il existe deux isoformes, l'ERα et l'ERβ. Pendant longtemps la présence de ce récepteur n'a été mise en évidence que chez les vertébrés. Depuis ces dernières années, des « ER-like » ont été trouvés chez de nombreuses espèces de mollusques (Thornton *et al*., 2003; Kajiwara *et al*., 2006; Keay *et al*., 2006; Puinean *et al*., 2006; Bannister *et al*., 2007; Castro *et al*., 2007b; Matsumoto *et al*., 2007). Cependant, des études fonctionnelles de ce récepteur nucléaire n'ont pas permis de mettre en évidence une activation par la liaison avec l'E2. Il se comporte comme un récepteur orphelin possédant une activité transcriptionnelle forte. La question de son implication dans les voies de biosynthèse des stéroïdes reste entière. Néanmoins, une étude réalisée chez *N. lapillus* a montré que des **effluents œstrogéniques** étaient susceptibles de moduler l'expression de cet « ER-like », faisant de celui-ci un marqueur potentiel de perturbation endocrinienne (Castro *et al*., 2007b). Dans ce contexte, il nous est apparu intéressant d'explorer cette hypothèse.

B / METHODOLOGIE DE MESURE

Les travaux présentés ont été réalisés chez deux espèces de gastéropodes. Cependant, *P. antipodarum* a été très largement favorisé par rapport à *V. piscinalis*, pour des raisons de disponibilité d'organismes. Ainsi, la plupart des marqueurs présentés dans ce travail, ont été développés et validés chez *P. antipodarum*, puis appliqués lors des expérimentations spécifiques chez *V. piscinalis*.

Les animaux utilisés proviennent de l'élevage du laboratoire pour les expositions en laboratoire, ou bien directement d'une population naturelle pour les expérimentations *in situ*. La provenance des organismes sera précisée pour chaque expérimentation. A l'origine, les escargots ont été prélevés dans une population naturelle du Rhône, à Creys-Malleville (Ain, France). Les individus choisis sont de jeunes adultes, de taille homogène, chez les deux espèces (de 4 à 5 mm). Ici encore, les tailles de départ seront précisées au cas par cas.

Quel que soit le marqueur étudié, la validation de la méthodologie de mesure, ou de dosage a été réalisée selon le même processus. Nous avons développé ou adapté une méthode de dosage, en définissant les limites de quantification, la précision (coefficients de variation (CV) intra et inter-essai) et l'exactitude (erreur relative). La linéarité de dosage a été évaluée par des dosages sur une gamme d'individus (1, 2, 4, 6 ou 8 individus). Ces dosages donnaient une droite de valeurs croissantes et nous avons déterminé le R^2 correspondant. Enfin, nous avons vérifié la pertinence du dosage par une exposition témoin. Par exemple, dans le cas des réserves énergétiques, nous avons mis les individus à jeun, et vérifié que les réserves diminuaient.

1. Suivi de reproduction

Du fait des cycles de vie relativement longs des espèces d'étude, le suivi des effets sur la reproduction a été réalisé obligatoirement lors d'expositions de plusieurs semaines. Ainsi, à 16°C, il faut compter des expérimentations d'un minimum de **4 semaines** pour voir apparaître les effets sur la reproduction au niveau de l'individu chez *P. antipodarum* (Gust *et al*., 2011b).

a. *Suivi de reproduction chez* P. antipodarum

Le suivi de reproduction de *P. antipodarum* peut se faire à deux niveaux. Il est possible de compter les **juvéniles** nés toutes les semaines dans les béchers lors d'expérimentations au laboratoire. Il faut vider l'eau des béchers à travers une maille suffisamment fine pour retenir les juvéniles (300 µm). Leur nombre est ensuite compté sous loupe binoculaire et rapporté au nombre d'individus vivants. Ce comptage correspond à la **fertilité**.

Depuis que cette espèce est utilisée en laboratoire, il a été proposé de compter les **embryons** dans la poche embryonnaire pour suivre la reproduction (Watton et Hawkes 1984). Leur coquille est cassée avec une pince et la poche embryonnaire ouverte délicatement. Les embryons présents sont comptés, en distinguant ceux présentant une coquille formée (embryons avec coquille, prêts à être expulsés) et ceux qui en sont dépourvus 'embryons sans coquille). Ces derniers apparaissent donc comme les plus récemment formés (embryons néoformés). Ainsi, le nombre total d'embryons correspond aux embryons avec coquille additionnés aux embryons sans coquille (Duft *et al*., 2003b). Ce comptage correspond à la **fécondité**.

Le suivi de ces deux paramètres permet une appréciation des effets, plus ou moins précoces, des polluants sur l'embryogenèse,. Seule la fécondité est évaluée lors des expérimentations *in situ*.

b. *Suivi de reproduction chez* V. piscinalis

Le suivi de reproduction de *V. piscinalis* a été mis au point par V. Ducrot au sein du laboratoire d'écotoxicologie (Ducrot *et al*., 2006). Lors des expositions de laboratoire, le **nombre de masses** et d'**œufs par masse** de *V. piscinalis* ont été comptés une fois par semaine. Cela correspond à la fécondité de cette espèce.

Le **taux d'éclosion** des œufs de *V. piscinalis* a également été suivi après incubation en chambre thermostatée à 20°C pendant 14 jours. Ce comptage correspond à la fertilité.

Ces suivis n'ont pu être mis en place que lors des expérimentations de laboratoire, mais n'ont pas été réalisés lors de celles *in situ*.

c. Effets sur la deuxième génération

Il est possible de déterminer la **taille et l'âge de la première reproduction** de la deuxième génération lors d'expositions au laboratoire. Ce travail rallonge fortement la durée d'expérimentation, et peut être fait soit en milieu non contaminé, soit en milieu contaminé.

La dernière semaine d'exposition, les jeunes de *P. antipodarum* et les masses de *V. piscinalis* ont été récupérés. Ils ont été mis en eau d'élevage avec ou sans toxique et nourris *ad libitum*. La croissance a été contrôlée régulièrement toutes les semaines le premier mois, puis toutes les deux semaines. L'expérimentation est arrêtée lorsque la reproduction a été observée dans tous les béchers. L'objectif est de déterminer, d'une part si la croissance est affectée, et d'autre part s'il y a des retards à la première ponte, en lien ou non avec un retard éventuel de croissance, chez les individus issus de parents exposés et eux même exposés pendant leur développement embryonnaire (*P. antipodarum*), ou issus de parents intoxiqués seulement (*V. piscinalis*).

2. Histologie et immunohistologie

a. Histologie conventionnelle

Les échantillons ont été laissés 48 heures dans du liquide de Bouin (75 % de solution saturée d'acide picrique, 20 % de formaldéhyde, 5 % d'acide picrique). Les échantillons ont été ensuite ils sont rincés à l'eau courante et déshydratés en commençant par l'alcool 70° régulièrement renouvelé. Après déshydratation par passage dans des bains successifs d'éthanol 90° (3 x 90 min) et 100° (3 x 45 min), les organismes ont été placés dans un bain de butanol (24 h), puis d' « HistoChoice® clearing agent » (Sigma) (3-4 h) afin d'assurer la transition entre le butanol et le milieu d'inclusion. Les échantillons ont alors été inclus dans du « Paraplast X-tra® » (Sigma-Aldrich) liquide par différents bains successifs à 55 °C (3 x 2 h et 1 x 12 h) et mis en bloc à l'aide de barres de Leuckart.

Des coupes sériées transversales et/ou longitudinales de 5 µm d'épaisseur ont été obtenues au moyen d'un microtome RM 2245 (Leïca). Les coupes ont été étalées et collées à chaud sur des lames de verre préalablement traitées avec de la poly-L-lysine. Après séchage à l'étuve (24 h à 37 °C), déparaffinage (bains successifs d' « HistoChoice® clearing agent », 2 x 10 min, et de butanol, 1 x 5 min) et réhydratation (bains successifs de 5 min d'éthanol 100°, 95° et

75°), les lames ont été colorées à l'hémalum éosine, puis recouvertes d'une lamelle enduite du liquide de montage « HistoChoice® mounting medium » (MicromFrance).

Les observations histologiques et les photographies ont été réalisées au moyen d'un microscope DM 2500® (Leïca) équipé d'une caméra numérique Infinity2-1C® (Lumenera).

b. *Immunohistologie*

Le début de la procédure est le même que pour l'analyse histologique conventionnelle. Les échantillons ont été laissés 48 heures dans du liquide de Bouin, puis rincés et déshydratés dans des concentrations croissantes d'alcool à 70%. Ils sont ensuite inclus dans du « Paraplast X-tra® » (Sigma-Aldrich). Des coupes longitudinales de 4 µm d'épaisseur ont été faites et la paraffine enlevée de la même manière que précédemment. Les coupes ont été réhydratées dans des bains successifs de 5 min d'éthanol 100°, 95° et 75°, puis l'activité peroxydase endogène et le marquage non spécifique ont été éliminés en les incubant dans 3% d'H_2O_2 et 1% de Bovine Serum Albumin (BSA) associés à 1% de sérum de chèvre préparé dans du tampon Tris-HCl (pH 7.4). Les coupes ont alors été successivement incubées en présence d'un anticorps primaire, puis un anticorps secondaire conjugué avec une peroxydase et spécifique de l'anticorps primaire. Chaque incubation a duré 1 heure à température ambiante avec une étape de rinçage au tampon Tris-HCl (pH 7.4) entre chaque. Des coupes incubées exclusivement avec des anticorps secondaires ont été utilisées en tant que contrôles. L'activité peroxydase spécifique a été visualisée avec 0.05% diaminobenzidine (DAB®, Dako, Carpinteria, USA), puis les lames ont été colorées à l'hémalum éosine, puis recouvertes d'une lamelle enduite du liquide de montage HistoChoice® mounting medium (MicromFrance).

3. Réserves énergétiques

Au cours de notre travail, les dosages de réserves énergétiques ont été réalisés grâce à un automate de dosage clinique, le **Konelab®** (ThermoScientific), présent dans le laboratoire d'endocrinologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL). Cet appareil est utilisé dans les centres hospitaliers humains et vétérinaires pour doser en routine toute une gamme de paramètres biochimiques par spectrophotométrie. Il présente l'avantage de pouvoir doser simultanément plusieurs paramètres et de pouvoir gérer un grand nombre d'échantillons. Son mode d'utilisation est simple, il suffit de mettre l'échantillon dans une cupule spécifique, et de

programmer l'automate. Il procède alors au dosage sur un volume très réduit (3-15 µL), en se chargeant de l'ajout des réactifs, de l'incubation, de la lecture à la bonne longueur d'onde, et de la dilution de l'échantillon s'il s'avère être trop concentré. Les avantages de l'utilisation du Konélab® pour sa transposition en écotoxicologie, sont nombreux. Il permet de doser simultanément **plusieurs paramètres**, et ce jusqu'à 84 échantillons en parallèle. Du fait de l'automatisation, la **variabilité** est extrêmement basse (5%). Il est donc possible de doser de très **grandes quantités d'échantillons** en un minimum de temps. Enfin, les résultats sont directement émis sous forme de fichier excel. Les limites sont celles des kits de dosages disponibles. Cet appareil est en effet fabriqué pour doser en routine dans les liquides biologiques (sang, urine, liquide céphalorachidien) les paramètres usuellement nécessaires en milieu hospitalier. Le glycogène, par exemple, est un paramètre habituellement dosé dans le muscle et ne peut être dosé directement, mais uniquement après sa digestion en glucose, qui lui est dosé dans les liquides biologiques.

Dans tous les cas, les échantillons ont été préparés avant le dosage suivant le même protocole. Deux *P. antipodarum* et un *V. piscinalis* disséqués ont été broyés manuellement avec un piston téflon dans 200 µL de PBS. Le volume de dosage minimum dans le Konelab® était de 80 µL. Nous avons choisi d'effectuer les dosages sur deux *P. antipodarum* pour limiter la variabilité, bien que les limites de quantification auraient pu permettre de doser sur un seul individu en bonne condition physiologique.

a. Dosage des triglycérides

Le principe du dosage des triglycérides par méthode spectrophotométrique repose sur l'hydrolyse par une lipase en **glycérol** et acides gras. Le glycérol est phosphorylé en glycérol-3-phosphate, lequel est ensuite oxydé en dihydroxyacétone-phosphate et H_2O_2. L'oxydation de l'H_2O_2 en présence du donneur d'électrons 4-aminoantipyrine entraîne par sa condensation avec le 4-chlorophénol la naissance d'un colorant quinoneimine. L'absorbance de la coloration formée est mesurée à 510 nm (Burtis et Ashwood 2001). Dans nos conditions de dosage utilisées, la limite de détection est de **4 nmol/individu**. Le coefficient de variation (CV) intra-essai est inférieur à 2% et inter-essai inférieur à 3%. L'erreur relative (ER) intra et inter essai est inférieure à 3%.

Les dosages ont été réalisés sur 1, 2, 4 et 6 individus. La gamme obtenue était linéaire et présente un R^2 de **0,97**. Notre dosage est donc dynamique et sensible. Des dosages ont été effectués sur des individus différents de taille similaire (10 dosages sur 2 individus différents), le CV entre individus était de 20%. La variabilité de cette mesure est donc limitée.

b. Dosage des protéines totales

Des complexes rouges de pyrogallol-molybdate se lient aux protéines. Cette liaison se traduit par une réaction colorée. La densité optique mesurée à 600 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon (Burtis et Ashwood 2001). La limite de détection est de **3 µg/individu**. Le coefficient de variation (CV) intra-essai est inférieur à 2% et inter-essai inférieur à 3%. L'erreur relative (ER) intra-essai est inférieure à 10% et inter-essai inférieure à 6%.

Ici encore le dosage était dynamique (R^2 de **0,95** sur 1, 2, 4 et 6 escargots). Le CV entre individu était de 7%. Nous avons comparé les dosages de protéines obtenus par le Konelab®, et ceux obtenus par la méthode de Bradford (Bradford 1976), sur les mêmes individus. Les résultats étaient très comparables, avec une différence de valeurs obtenues entre les deux méthodes de 2% en moyenne.

c. Dosage du cholestérol

Les esters de cholestérol sont hydrolysés enzymatiquement par une cholestérol estérase en cholestérol et acides gras libres. Le cholestérol libre, dont celui présent à la base, est ensuite ionisé par une cholestérol oxydase en cholest-4-en-3one et H_2O_2. L'oxydation de l'H_2O_2 en présence de 4-aminoantipyrine entraîne la condensation de ce dernier avec l'HBA, formant ainsi un chromogène quinonéimine, qui peut être quantifié à 500-550 nm (Allain *et al*., 1974). La limite de détection est de **15 nmol/individu**. Le CV intra et inter essai est inférieur à 2%. L'ER intra-essai est inférieure à 6% et inter-essai inférieure à 8%.

Le dosage était dynamique (R^2 de **0,96** sur 1, 2, 4 et 6 escargots). Le CV entre individu était de 12%.

d. Dosage du glycogène

Le dosage du glycogène n'a pas pu être réalisé directement sur les individus broyés dans du PBS. Nous avons ajouté une étape de digestion enzymatique au préalable, afin de doser

le glucose. Pour se faire, les protéines ont été précipitées par l'ajout de 50 µL de TCA (acide trichloroacétique) aux 200 µL de broyat d'escargot. Les échantillons ont été centrifugés, et le glycogène du surnageant précipité par l'ajout d'1 mL d'éthanol. Les échantillons ont ensuite été mis à –20°C pendant 30 minutes, puis centrifugés à 13 000*g* pendant 20 minutes. Le culot a alors été solibilisé dans 100 µL de tampon citrate (pH 5, 100 mM), et incubé 1 heure à 55°C, après ajout de 2,5 unités d'amylologlucosidase. Le gluocose libéré a ensuite été dosé.

Le glucose a été oxydé en D-gluconate par la glucose-oxydase avec formation équimolaire de péroxyde d'hydrogène. Ce dernier a oxydé la 4-aminoantipyrine et le phénol, en présence péroxydase, ce qui permet la formation d'un chromogène quinonéimine de couleur rouge, dont la densité optique est mesurée à 510 nm (Burtis et Ashwood 2001). La limite de détection est de **15 nmol/individu**. Le CV intra et inter essai est inférieur à 3%. L'ER intra et inter-essai est inférieure à 15%.

Le dosage était dynamique (R^2 de **0,94** sur 1, 2, 4 et 6 escargots).

e. Variations après une période de jeûne

Afin de valider la pertinence de la mesure du statut énergétique, nous avons voulu vérifier que les paramètres mesurés étaient bien sensibles à la mise à jeun.

Des adultes de 4.5 ± 0.2 mm ont été mis à jeun pendant 21 jours pour en évaluer les conséquences sur leur statut énergétique. Les quantités de TG et protéines diminuent dès 7 jours de jeun (Figure II-2). A partir de 14 jours, elles semblaient se stabiliser. Dès la deuxième semaine d'exposition, il n'y avait plus d'embryons dans la poche embryonnaire. La diminution avec le jeun est en faveur de la pertinence des dosages, qui sont donc bien en relation avec le statut énergétique des organismes et leur reproduction. Il est intéressant de noter que les protéines totales diminuent en cas de jeûne, ce qui peut induire en erreur lors de l'expression des biomarqueurs est rapportée aux protéines. En conséquence, dans la suite de l'exposé, nous exprimerons donc les **biomarqueurs par individu dont la taille est standardisée** (et plus rarement suivant leur poids).

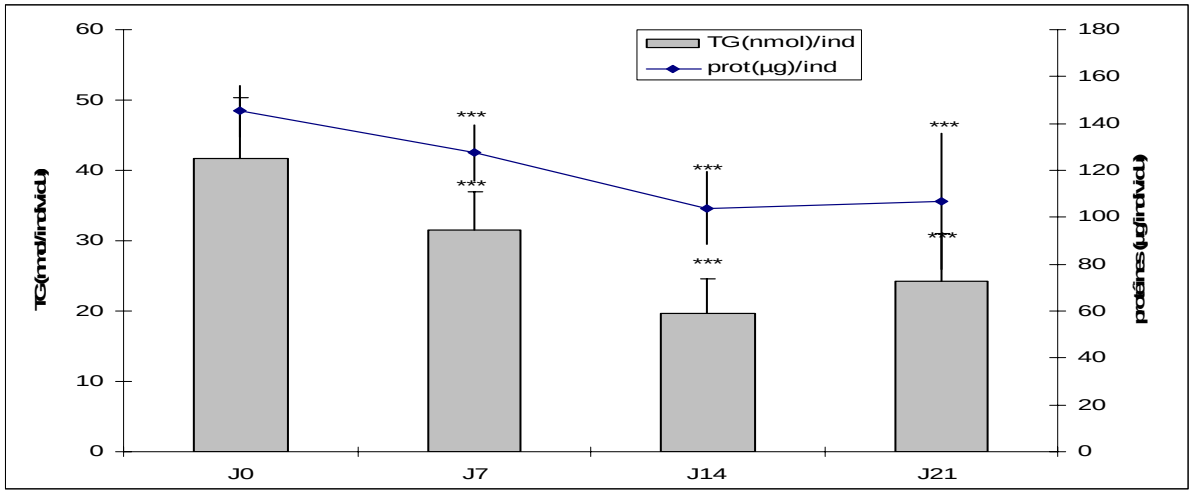


Figure II-2 : Niveaux de TG et protéines (moyenne et écart-type) lors d'une mise à jeun d'individus issus du laboratoire

De plus des mesures ont été réalisées simultanément sur des individus issus du laboratoire et d'une population de terrain. Les niveaux de base de TG et de protéines étaient significativement (test de Dunnett) plus élevés chez des individus provenant d'une population de terrain que sur des individus issus de l'élevage (Tableau II-1). Cela suggère que la nutrition en condition de laboratoire pourrait être améliorée.

	TG (nmol/ind)	Protéines (µg/ind)
Laboratoire	41.70 (8.56)	145.20 (10.81)
Creys-Malville	60.83* (12.13)	160.50* (14.28)

Tableau II-1 : Niveaux de TG et de protéines (moyenne et écart-type) chez des individus du laboratoire et d'une population naturelle

Enfin, les individus issus du terrain soumis au même jeun que les individus de laboratoire ont exprimé le même type de réponse (diminution de TG et de protéines). Cependant, la diminution de statut énergétique a été plus lente à se mettre en place (au bout de 2 semaines et non pas d'une seule), suggérant que ces individus débutaient la période de jeun avec une réserve supérieure.

4. Vitelline et « vitelline-like »

Les méthodes de dosage présentées ici ont été développées chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis* par B. Gagnaire au sein du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref de Lyon, en collaboration avec F. Gagné d'Environnement Canada. Les trois mesures (ALL, ALP et

électrophorèse) sont réalisées sur 3 pools de 10 individus disséqués (et sans embryons pour *P. antipodarum*). Ils ont été préalablement broyés avec un poter téflon dans un tampon d'homogénéisation : 25 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, contenant 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithriothreitol et 1 $\mu g.mL^{-1}$ d'aprotinine (6000 KIU/mg; Sigma). Ils ont ensuite été centrifugés à 1 000g pendant 10 min à 4°C et le surnageant récupéré et conservé à -80°C. Les protéines de haut poids moléculaire ont été précipitées par l'ajout de 35% d'acétone et le culot protéique récupéré après centrifugation à 10 000 *g* pendant 5 min à 4°C. Le culot a ensuite été dissout dans 10 mM Tris-acetate (pH 8.0, contenant 1 mM EDTA). Toutes les mesures sont ensuite réalisées dans c*et al*iquot.

a. ALP et alL

Cette mesure consiste à doser les phosphates et lipides labiles issus de la Vg après hydrolyse en conditions alcalines. Cela consiste en l'addition dans l'aliquot d'un volume équivalent de NaOH 2 M chauffé à 60°C pendant 30 minutes. Les phosphates et lipides libérés ont ensuite été dosés par méthodes colorimétriques (Stanton 1968; Frings *et al*., 1972). Les étalons utilisés étaient du phosphate inorganique (KH_2PO_4) et du Triton X-100 pour l'ALP et l'ALL respectivement.

b. Electrophorèse

La Vn a aussi été mesurée par méthode directe. Les protéines ont été dosées par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide, en utilisant des gels haute-résolution (Invitrogen, USA). Le tampon d'électrophorèse était composé de tampon MOPS 50 mM, pH 7.2, contenant 50 mM Tris Base, 1 mM EDTA et 0.2% SDS. Les échantillons ont été dilués avec du tampon MOPS 50 mM, pH 7.2, pour obtenir une concentration en protéines de 10 µg.m/L. Un volume équivalent de loading buffer (Invitrogen, USA) a été ajouté aux protéines diluées et les tubes sont chauffés à 70°C pendant 10 min. Ensuite 10 µL (50 ng) ont été mis dans les puits et les gels sont soumis à 150 volts pendant 60-90 minutes. Après l'électrophorèse, les gels ont été colorés à l'argent avec le kit SilverXpress (Invitrogen, USA). Les gels ont été scannés et la densité des différentes bandes déterminées avec le logiciel Un-Scan-It version 6.1 (USA). Des marqueurs de poids moléculaires et de l'aprotinine ont été utilisés pour la calibration.

c. Validation

B. Gagnaire a montré que chez *P. antipodarum* la Vg se présentait sous forme de deux bandes de 30 et 100 kDa environ, et chez *V. piscinalis* sous la forme d'une bande de 250-300 kDa. La mesure des ALL semble être la plus représentative de la Vg chez *P. antipodarum* et le ratio ALL/ALP chez *V. piscinalis*. Des expositions à du BPA, de l'OP et du TBT ont montré que ces mesures pouvaient être potentiellement utilisées lors d'exposition à des EDCs (Gagnaire *et al*., 2009).

5. Récepteur aux œstrogènes

Nous avons cherché à obtenir le gène codant pour l'ER homologue chez *P. antipodarum*. Une stratégie de RT-PCR basée sur la définition d'amorces dégénérées ou non dans les secteurs les plus conservés de la séquence du récepteur œstrogène de différentes espèces de Gastéropodes a été utilisée. Après clonage et séquençage, cette approche a permis d'obtenir un fragment de 600 pb environ présentant une homologie de séquence de 74% avec la séquence du récepteur ER de *Marisa cornuarietis*. Cette forte homologie nous incite à penser que nous avons un fragment de la séquence du récepteur ER homologue de *P. antipodarum*. A partir de cette information, deux étapes auraient pu être mises en oeuvre de façon simultanée. La première consisterait à obtenir les parties 5' et 3' manquantes ainsi que l'ensemble du cDNA. Ce travail aurait permis de caractériser plus avant ce récepteur dans cette espèce animale. La seconde orientation résiderait dans la validation d'un dosage de RT-PCR quantitative qui devrait permettre de suivre, au niveau transcriptionnel, ce marqueur de façon à évaluer sa pertinence en tant que marqueur de reprotoxicité. Par manque de temps, nous ne sommes pas en mesure de présenter des résultats plus aboutis.

C / METHODOLOGIES D'EXPOSITION

1. Exposition en laboratoire

Les expositions de laboratoire ont toujours été réalisées en renouvellement continu d'eau. Quelque soit le type d'exposition (eau seule, eau contaminée avec un toxique hydrosoluble, eau contaminée avec un toxique préalablement solubilisé dans un solvant), le principe reste le même.

Chaque réplicat est placé dans un bêcher de 600 mL, l'ensemble des béchers étant situé dans un bain-marie à température régulée. L'eau provient du circuit d'eau du laboratoire et des pompes péristaltiques permettent l'apport d'eau à un débit contrôlé dans chaque bécher. Les béchers sont percés, pour permettre l'évacuation de l'eau en continu (Figure II-3).

En cas de présence de toxique, une solution mère est diluée avec l'eau du laboratoire pour faire la plus forte concentration, qui est elle-même diluée de nouveau au tiers pour faire la deuxième concentration. Celle-ci est également diluée au tiers, pour faire la concentration suivante… Ces dilutions successives se font également grâce à des pompes péristaltiques. Les bouteilles sont placées sur un agitateur afin d'assurer l'homogénéité de la solution (Figure II-4). Le renouvellement de chaque bêcher est complet toutes les 6 heures.

Figure II-3 : Exposition de laboratoire typique

Figure II-4 : Système de dilution typique

Le pH, la conductivité de l'eau, la température et le niveau d'oxygénation de l'eau son ont été suivis quotidiennement, ainsi que le taux d'ammonium et de nitrites (mesures réalisées toutes les semaines). L'éclairage était artificiel, par cycle de 16 h de jour/8 h de nuit. Les organismes ont été nourris les jours ouvrés, une fois par jour (0,64 mg/*P. antipodarum* et 0,9 mg/*V. piscinalis* de Tetramin®).

Les expérimentations ont été réalisées sur des individus adultes, triés suivant leur taille. Leur origine a pu varier et est précisée à chaque exposition. Ils ont pu provenir directement du laboratoire, ou de la population de terrain d'où est issue l'élevage de laboratoire, après une période de stabulation.

Une semaine avant le début de l'expérimentation, les individus ont été mis en béchers de manière à ce qu'ils s'acclimatent.

	P. antipodarum	*V. piscinalis*
Milieu d'essai	Eau naturelle (forage)	
Renouvellement	Continu (4fois/jour)	
Aération	Continue	
Volume d'essai ml	600	
Illumination	16 h jour/ 8h nuit	
T° C	16-21	
pH	7,5-8,0	
O_2	> 80% saturation	
Conductivité	300-600 µS/cm	
Dureté mg/L $CaCO_3$	250 mg/L	
Paramètres de milieu suivis	pH et conductivité, température, niveau d'oxygénation quotidien Ammonium et nitrites 1 fois par semaine	
Nombre de réplicats	6-12 suivant expérimentation	
Nombre d'individus par réplicat	10-100 suivant expérimentation	10-50 suivant expérimentation
Nourriture Tetramin ®	0,64 mg/ind./jour	0,9 mg/ind/jour
Fréquence apport de nourriture	1 fois/jour ouvré	
Fréquence des mesures	Hebdomadaire	
Taille des organismes au départ	3,9 à 4,5 mm	3,5 à 4,5 mm
Durée d'acclimatation en condition d'essai avant exposition	15 jours sélection d'individus de taille homogène pour n'avoir que de jeunes adultes lors de l'exposition	
Durée de l'exposition	28-56 jours	

Tableau II-2 : Conditions d'exposition générales lors d'expérimentations de laboratoire

2. Exposition sur d'organismes encagés *in situ*

Les expositions *in situ* ont été réalisées en amont et en aval de points localisés de pollution (rejets d'effluent de station d'épuration par exemple). Les organismes ont été placés dans des pots plastiques transparents en polypropylène dont les deux extrémités ont été remplacées par de la maille fine (300-500 µm) pour permettre la circulation d'eau. Ces pots ont ensuite été disposés dans des caisses en polyéthylène lestées avec des cailloux et blocs rocheux et attachées aux berges. Les organismes ont été nourris soit avec des cailloux couverts de biofilms insérés dans les pots, soit avec des épinards (Figures II-5 et 6).

Figure II-5 : Systèmes terrain

Figure II-6 : Installation de systèmes terrain

Les expérimentations ont été réalisées sur des adultes pour le suivi de la reproduction ou des juvéniles issus de l'élevage du laboratoire ou de la population du Rhône. Dans tous les cas, les organismes ont été mis dans les systèmes la veille de l'expérimentation.

D / VARIABILITE DES MARQUEURS

Nous avons développé et validé des méthodes de mesures des marqueurs. Cependant, des informations quant à leur variabilité naturelle sont nécessaires pour une meilleure compréhension et interprétation des variations observées lors d'expérimentations de laboratoire et surtout de terrain. La réponse normale d'un organisme pour conserver son homéostasie doit être distinguée de celle provoquée par un stress (Jemec *et al*., 2010). De nombreux facteurs confondants (température, nourriture, état physiologique des organismes…) peuvent induire des variations dans les réponses observées, sans pour autant être de nature toxique.

Dans le cadre de nos expérimentations, les principaux facteurs de variabilité sont (d'après Jemec ert al., 2010) :

1. **Historique des animaux** : origine (laboratoire, terrain, quel site, durée de stabulation), clone dans le cas de *P. antipodarum*.
2. **Conditions abiotiques lors de l'exposition** : température et saison (influence sur le cycle de reproduction), type de nourriture, matière organique présente.
3. **Physiologie** : taille ou age, stade reproductif.
4. **Expression du marqueur** : individu, taille, poids, protéine

Nous n'avons pas pu définir l'ensemble des causes non toxiques de variation des paramètres mesurés. Nous avons travaillé uniquement sur le cycle annuel et la température d'exposition. Les objectifs des deux expérimentations présentées dans cette section étaient d'acquérir une meilleure connaissance sur les **niveaux physiologiques** des marqueurs testés et de pouvoir appréhender les **conséquences** des différentes **températures d'exposition** lors d'expérimentations de terrain et de laboratoire.

Un suivi annuel du nombre d'embryon dans la poche embryonnaire de *P. antipodarum* sur la population naturelle de terrain servant à fournir nos élevages a été réalisé. En parallèle, les niveaux d'E2 et de T et le statut énergétique (TG, glycogène, protéines, cholestérol) ont été suivis.

Une expérimentation au laboratoire a également été effectuée. Nous avons exposé *P. antipodarum* à trois températures réalistes lors d'expositions *in situ* (8, 16 et 24°C) pour étudier l'effet de la température d'exposition sur la reproduction, les niveaux de stéroïdes, le statut énergétique et les niveaux de protéines Vn-like.

1. Suivi annuel dans une population de naturelle

Publication n°1 :

Natural variability and response interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroid levels and energy status in a natural population of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)

M. Gust, J. Mouthon, H. Queau, T. Buronfosse, J. Garric

Des organismes adultes (4.2-5 mm) ont été collectés mensuellement dans la population du Rhône qui sert à approvisionner les élevages du laboratoire de novembre 2008 à octobre 2009. Le but de ce travail a été double. D'une part nous voulions connaître la **gamme de variation physiologique** des marqueurs mesurés (fécondité, stéroïdes sexuels et statut énergétique). D'autre part, nous voulions essayer de mettre en **relation** les variations des niveaux de stéroïdes sexuels ou du statut énergétique avec la **reproduction**.

La fécondité de *P. antipodarum* est plus faible pendant tout l'hiver et le printemps, comparé à l'été et l'automne, ce qui est à mettre en relation avec la température de l'eau. Les niveaux d'E2 et de T varient au cours du cycle, et sont respectivement corrélés avec les embryons dans la poche embryonnaire et le pourcentage d'embryons coquillés. L'E2 est plus élevé en période de reproduction, tandis que la T l'est en période de repos. Il semblerait que l'**E2** soit en lien avec la **fécondité**, tandis que la **T** le soit avec la **ponte** de juvéniles. Ces résultats sont assez consistants avec les observations faites chez d'autres mollusques (principalement bivalves). Concernant les réserves énergétiques mesurées, les TG sont la réserve énergétique majoritaire en relation avec la reproduction, et le glycogène semble la ressource énergétique précoce. Le cholestérol et les protéines sont structuraux et ne rentrent dans le métabolisme énergétique qu'en cas de ressource alimentaire trop faible au regard des demandes. Les niveaux de base obtenus pour la fécondité, sont à comparer avec la fécondité des témoins dans les publications, qui est généralement bien plus faible. Les niveaux d'E2, de T, de TG, de protéines et de cholestérol sur cette population, sont, eux, très informatifs par rapport à ceux mesurés dans les expérimentations, de terrain notamment.

Mots clés : *Potamopyrgus antipodarum*, cycle reproductif, stéroïdes sexuels, statut énergétique

Soumise à *General and Comparative Endocrinology*

Natural variability and response interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroids levels and energy status in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)

M. Gust[a,b], J. Mouthon[c], H. Queau[a], T. Buronfosse[d], J. Garric[a*]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[b] AgroPariTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris, France.

[c] Cemagref, UR MALY, Laboratoire DYNAM, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[d] Université de Lyon. Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France.

* Corresponding author.

Present address: Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3bis quai Chauveau CP 220 69336 Lyon cedex 09, France

Tel.: +33 472208905 ; Fax: +33 478477875

E-mail address: Jeanne.garric@cemagref.fr

Abstract

Potamopyrgus antipodarum is a promising test organism often used in ecotoxicology, both in laboratory and field exposures. As no data is available on physiological variation range of its life-traits and used biomarkers, we studied the variation of fecundity, steroid levels and energy reserves during a whole year in a field population. The reproductive cycle was described and showed seasonal activity during summer and autumn. Steroid levels (17β-estradiol and testosterone) varied significantly during the year and were correlated to the reproductive cycle. It suggested a potential role of sex-steroid in *P. antipodarum* reproduction. Energy status also showed seasonal variations. Triglycerides seemed the main energy storage lipid, whereas cholesterol appeared mostly a structural lipid. Proteins were also involved in the reproductive cycle, but as cholesterol, only when TG were not enough to support the reproductive strain. We defined the range of variation of the measured parameters, allowing a better understanding of their levels in laboratory or *in situ* exposures. Issues were raised about low fecundity observed in control snails under laboratory experiments.

Keywords: *P. antipodarum*, reproductive cycle, steroid levels, energetic status, baseline values

1. Introduction

The New Zealand mudsnail *P. antipodarum* (Gray) is an invasive parthenogenetic ovoviviparous gastropod , today common in the European countries, which inhabits all kind of brackish and freshwater systems, soft and hard waters, in mud and sand, on rocks, gravel and aquatic plants (Fretter et Graham 1994). It has been proposed as a suitable test species to assess the impact of endocrine disrupters compounds (EDCs) on invertebrates and has been recommended for use in the development of reproduction tests within the OECD guideline "Ad hoc Expert Group on Invertebrate Testing" (Duft *et al*., 2007; OECD 2010). It is considered to be a promising species for use in partial life cycle testing (Matthiessen 2008). It has already been used in laboratory testing and experimental stream (Duft *et al*., 2003b; Jobling *et al*., 2003) and proved to be well adapted to *in situ* caging (Gust *et al*., 2010b). Fecundity, as the number of embryos in the brood pouch is usually monitored. Recently, biomarkers as steroid levels or energy status have been developed in this species to better characterize impact of anthropogenic stressors (Gust *et al*., 2010a). However natural variability of baseline values of both fecundity and biomarkers have to be specified in order to improve interpretation of variations when exposed to pollutants. Indeed, interpretation of biomarker responses requires good knowledge of the effect of biotic factors (sex, age, stage of development), as well as the description of the seasonal variations for appropriate characterization of normal ranges. Studies are essential to assess the physiological and biological status of animals in field and to control deviations from this standard value (Li *et al*., 2009; Jemec *et al*., 2010). As *P. antipodarum* is extensively used in field and laboratory studies, a need to characterize physiological variations of fecundity, steroid and energy reserves levels in a natural population has arisen.

Biological relevance of steroids are still debated, but many observations support a physiological role of vertebrate-like sex steroids in mollusk reproduction, particularly in *P. antipodarum* (Matthiessen 2008; Gust *et al*., 2010c). In previous studies, we observed modulation of their levels, under laboratory conditions (Gust *et al*., 2010c), but also in field exposures (2010a; Gust *et al*., 2010b). The magnitude of E2 bioaccumulation in snails downstream of waste water treatment plant effluent can be better assessed when baseline levels are described. Moreover, some temporal variations in steroid levels have been linked to the reproductive cycle in bivalves (reviewed in Lafont et Mathieu 2007) and gastropods (Sternberg *et al*., 2008a). Energy reserves are of considerable importance in reproduction and seasonal energy storage and utilisation are closely linked to environmental conditions and annual gametogenic cycle. Energy is stored prior to gametogenesis when food is abundant, in

various forms. The particular importance of these substrates varies among mollusc species and populations of the same species (Ojea *et al*., 2004 and cited references). To our knowledge, no studies have yet simultaneously described fecundity, energy reserves and steroid levels in natural population of gastropod species.

Thus the aims of this paper are (i) to assess the annual variation of fecundity, energy status and steroid levels of *P. antipodarum* and their connection; (ii) and to propose a physiological variation range for these parameters to further improve their interpretation.

2. Material and Methods

2.1 Snails collection

Snails were sampled monthly from October 2008 to October 2009 in a natural populations in the upper Rhone river (Villeboir reservoir, Creys-Malville, France), in a well described site (Mouthon 2001a). The total surface area was of 1 m^2, with four samples, 0.25 m^2 each, taken at four stations at a depth from 0.50 (depth at which wake effects lessen) to 1.5 m, using a rectangular hand-net (25x18 cm, 315 µm mesh size), allowing to collect and sort snails of different size (neonates, juveniles and adults).

2.2. Fecundity measurement

All measurement (fecundity, steroid levels and energy status) were performed on a mean 25 snails of the same class (4.2-5 mm), corresponding to animals usually used in field and laboratory experimentations in our laboratory. To assess snail's fecundity, the embryos in the brood pouch were counted on alcohol-preserved snails using a technique adapted from Duft *et al*.(2003b): the number of embryos shelled or unshelled (new embryos) was counted under a binocular microscope.

2.3.Energy status measurement

The levels of triglycerides (TG), glycogen, proteins and cholesterol were measured monthly on 7 pools of 2 dissected and embryos-emptied *P. antipodarum*, stored at -21°C until measurements were performed. Snails were homogenized in 200µL PBS 1x and energy status directly measured using a Konelab® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise). This device is a robot commonly used for the clinical analysis of biochemical parameters. Measurements were based on colorimetric methods (Burtis et Ashwood 2001). Briefly, TG were hydrolysed by a lipase and glycerol measured at 510 nm. The bond between proteins and red pyrogallol-molybdate complexes was measured at 600 nm. Cholesterol esters were enzymatically hydrolysed and total cholesterol was oxidized and measured at 500-550 nm.

For glycogen measurement, glycogen was extracted and digested by an amiloglucosidase (CAS 9032-08-0, Sigma Aldrich, France). Glucose was then measured after oxidation by a glucose-oxydase, leading to a chromogen, which concentration was measured at 510 nm. Glycogen concentrations were calculated using oyster glycogen (CAS 9005-683-8, Sigma-Aldrich, France). Repeatability and linearity of the reactions were assayed for each parameter. Intra-assay variability was less than 5%. Limits of quantification were 4 nmol TG for, 0.3 µg glycogen, 3 µg protein and 15 nmol cholesterol per snail.

2.4. Vertebrate-like sex steroid levels

The levels of total testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) using a radioimmunoassay (RIA) technique were measured monthly on 8 pools of 2 *P. antipodarum* directly frozen at -21°C after sampling. We used the same technique as previously published (Gust *et al*., 2010c). Briefly, snails were homogenized in 1% (v/v) trifluoro acetic acid and were extracted twice with methylene chloride. After a saponification step, steroids were extracted twice with methylene chloride and resuspended in 80 µL 1% steroid free Bovine Serum Albumin (BSA). The samples were assayed using commercial RIA kits for E2 (Orion Diagnostic, Espoo, Finland) and T (Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA).

2.5. Statistical analysis

Normality distribution and homogeneity of variance of the data were tested. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by LSD test for *post hoc* comparisons of groups, with Bonferroni adjustments. Correlation were assessed using a Pearson test. All statistical analyses were performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results and discussion

The annual monitoring of fecundity, steroid levels and energy status showed marked variations. Water temperature (Fig 1) ranged from 4 to 22°C during the study, and was lowest during December to March and highest during June to September.

3.1. Reproductive cycle

3.1.1. Fecundity

In the studied population, fecundity (as total number of embryos in the brood pouch, Fig 2) was lowest during winter (December to March) and maximum in summer and autumn (July to November). The annual variations of fecundity were closely linked to water temperature of

the previous month (0.84, $P<0.05$). The percentage of shelled embryos was higher during winter months, rising to 84% in January. This suggests that embryos were kept in the brood pouch, as implied by the very few neonates found in the samples. The drop of percentage of shelled embryos appears an early marker of embryo laying. Two generations were found when counting the neonates, the first in July-August and the second in October-November 2009 (data not shown). From December 2008 to May 2009, the population was in a rest phase. These observation are consistent with published records, indicating that *P. antipodarum* has a seasonal reproduction in temperate countries, with two generations (Fretter et Graham 1994).

3.1.2. Vertebrate-like sex-steroids levels

Vertebrate-like sex-steroids levels varied significantly during the seasonal cycle of *P. antipodarum* (Fig 3). E2 levels were significantly ($P<0.001$) lower during the winter and higher during the reproductive period. E2 monthly levels were correlated to both fecundity (0.87, $P<0.05$) of the following month, and percentage of shelled embryos (-0.72, $P<0.05$) of the following month, but not of the corresponding month. It suggests a possible role of this steroid in fecundity and laying control. Variations of E2 levels with the reproductive cycle have been described in gastropod (Sternberg *et al*., 2008a) and bivalves (Matsumoto *et al*., 1997; Osada *et al*., 2004a; Gauthier-Clerc *et al*., 2006; Mouneyrac *et al*., 2008). In *Ilyanassa obsoleta* E2 levels were higher during the rest phase and no link could be made between E2 levels and the reproductive cycle (Sternberg *et al*., 2008a). In bivalves, E2 levels were highest at the beginning of vitellogenesis (Gauthier-Clerc *et al*., 2006; Ketata *et al*., 2007a), and are suggested to have a role in the development of gametes (Matsumoto *et al*., 1997; Osada *et al*., 2004b). Thus, E2 levels were generally higher during the reproductive period in bivalves, as with *P. antipodarum* in our study.

Contrary to E2, T levels were significantly ($P<0.001$) higher during the rest phase and lower during the reproductive phase (except for July). They were significantly correlated (0.98, $P<0.05$) to the percentage of shelled embryos of the following month, probably linking T levels to embryo laying in *P. antipodarum*. These observations are consistent with what is described in the literature, where T levels are linked to some stage of the reproductive cycle in molluscs. In *I. obsoleta* temporal changes in T levels in males were consistent with a positive role in recrudescence (Sternberg *et al*., 2008a) and in *Mya arenaria* T levels increased during the spawning stage in both sexes (Gauthier-Clerc *et al*., 2006). However no trend was observed in *Scorbicularia plana* (Mouneyrac *et al*., 2008). Thus our study is in favour of a

relationship between the reproductive cycle of a natural population of gastropods and their steroid levels.

3.1.3. Energy status

We also report the annual variation of energy status in a natural population of gastropods. The levels of TG, glycogen, proteins and cholesterol showed the same pattern during the annual cycle (Fig 4A-D) and were significantly correlated between them ($P<0.05$). The observed patterns were similar to those described in bivalves (Abad *et al*., 1995; Berthelin *et al*., 2000; Pazos *et al*., 2003; Ojea *et al*., 2004; Dridi *et al*., 2007; Mouneyrac *et al*., 2008; Li *et al*., 2009), but literature on gastropods is very poor. Briefly, energy status decreased during the rest phase, corresponding to winter and probably scarce food in the environment. As spring began, it increased until June and high reproduction, and thereafter decreased sharply during the summer months when reproduction was at its highest intensity. This situation may not reflect low food abundance, but rather extensive energetic demand: not only is the ingested food consumed, but also the stored reserves are mobilised (Berthelin *et al*., 2000).

In *P. antipodarum*, the variation of TG levels were the most significant whereas those of cholesterol levels were limited. TG appeared to be a major lipid energetic reserve in *P. antipodarum*, closely linked to the reproductive cycle, whereas sterols such as cholesterol, seemed to have a predominant structural role as in bivalves as structural component of cell membranes (Pazos *et al*., 2003; Ojea *et al*., 2004). In membranes cholesterol is mainly present in an uncombined state, while esterified state represent storage form or metabolic pools (Abad *et al*., 1995). In bivalves lipid reserves are considered to be used principally in gametogenesis and lost during spawning. Lipids reserves are probably built up in early winter and constitute a wintering form of energetic reserves (Berthelin *et al*., 2000). The lower levels of cholesterol observed only during the highest reproductive period could be due to its incorporation into oocytes, as described in the bivalve *Ostrea edulis* (Abad *et al*., 1995).

Glycogen variation were more important than for TG during spring (decrease from April to June), suggesting a more early reserve. Indeed, when reproduction is beginning to increase, glycogen seems the preferential reserve to support the energy cost. This is further supported by the lowest levels observed during the summer months compared to late fall (November), in contrast to TG.

Protein levels also varied significantly ($P<0.05$) during the year, but in a lesser extend than TG in *P. antipodarum*. It suggests that they are the major structural material of the gonad and are closely related to gonad maturation and reflect protein accumulation in oocytes, in

addition to their contribution to energetic maintenance in period of reproductive strain, as in bivalves (Berthelin *et al*., 2000; Serdar et Lok 2009).

3.2. Definition of physiological variation ranges and meaning in experiments

The mean number of embryos in the brood pouch was of 21 throughout the year and ranged from 14 in March to 28 in July, which is consistent with what has been previously described in this species in natural populations (Fretter et Graham 1994). The number of unshelled embryos during the same period ranged from 3 to 14 and shelled embryos from 6 to 16. The observed fecundity was far higher than what is generally described in control conditions of laboratory and field experiments, where fecundity range from 2 to 17 embryos per snail (Table 1). Different diets also influence reproduction in *P. antipodarum* (Dorgelo *et al*., 1995). *P. antipodarum* is a parthenogenetic species, with several clones and the reproductive output varies depending on the clone (Jensen *et al*., 2001) which likely partly explains the huge range of variation which can be found in the literature, even if all results are supposedly obtained on morphotype A. Definition of physiological variation of fecundity in the different populations should be performed. Nonetheless, it raises issues about the relevance of identification of fecundity induction when the control's fecundity is too low. Indeed our results suggest that an induction of fecundity from 4 embryos per snails to 10 described by Schmitt *et al*. (2010a), appears more physiological than toxicological. To improve the use of *P. antipodarum* as an OCDE biotest, as proposed (OECD 2010), it appears necessary to define a minimal fecundity in control snails, to assess the variability in different populations of the same clone and to standardize exposure protocols.

Interestingly, in field exposures, fecundity seems generally higher than in laboratory, which could be linked to the influence of diet on *P. antipodarum* reproduction (Dorgelo *et al*., 1995). TG levels in *P. antipodarum* during the year, ranged from 50 to 120 nmol/snails (mean value 79 nmol/snails), cholesterol levels from 43 to 65 nmol/snails (mean value 56 nmol/snails) and protein levels from 240 to 360 µg/snails (mean value 300 µg/snails). Starvation experiments in our laboratory showed that unfed snails had low energy status and fecundity (unpublished results). Thus low fecundity could be related to inappropriate feeding. Additional measurement of energy status, when assessing *P. antipodarum* fecundity would help to understand the meaning of fecundity variations. This is especially true in field studies, when feeding might not be *ad libitum*.

E2 levels ranged from 0.78 to 1.86 pg per snail and T levels from 2.65 to 7.19 pg per snail. As adults *P. antipodarum* of 4.7 mm weight around 10 mg (personal observation), these levels were in accordance with those previously published in mollusc species (Janer et Porte 2007).

Definition of these physiological levels allows a better interpretation of measured steroid levels during *in situ* exposures. Indeed, we observed high levels of E2 in snails exposed downstream of waste water treatment plant effluent containing steroid compounds. Although E2 levels were similar to those observed in this study at the beginning of the exposures, they rose up to 14 pg per snail (Gust *et al*., 2010b), which is far higher than what was observed in the natural population. These steroid levels in the snails were correlated to measurements of estrone in the river, suggesting bioaccumulation.

Conclusion

We described the annual cycle of a natural population of *P. antipodarum* in the Rhone river, France. This population exhibited variations of its steroid levels, which seem linked to its fecundity. The information presented here also showed that energetic status of *P. antipodarum* played an important role in reproductive fuel and supported the metabolic maintenance cost in period of food shortage. The physiological levels of fecundity, energy status and steroid levels were defined and can be further used in laboratory and field experiment to assess a toxic response. However more work is needed to confirm these trends by monitoring other natural population, or performing several years follow-up.

Acknowledgments

The present work was partly funded by ONEMA and a French national program on endocrine disruptors (PNRPE). The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon (Prof. F. Garnier) for the financial grant of the RIA and biochemical analysis. Solange Couturier, Céline Dussard and Claire Plantarose are gratefully acknowledged for their technical help.

References

Abad M, Ruiz C, Martinez D, Mosquera G, Sánchez JL (1995) Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from san cibran (galicia, spain). Comp Biochem Physiol C 110 (2):109-118

Berthelin C, Kellner K, Mathieu M (2000) Storage metabolism in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of france). Comp Biochem Physiol B 125 (3):359-369

Burtis CA, Ashwood ER (2001) Tietz fundamentals of clinical chemistry. 5th edition edn. W. B. Saunders Company, Philadelphia

Dorgelo J, Meester H, vanVelzen C (1995) Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (smith) (gastropoda: Hydrobiidae). Hydrobiologia 316 (3):199-210

Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M (2007) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the bizert lagoon, tunisia. Aquaculture 263 (1-4):238-248

Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik C, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J (2007) Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals - an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Ecotoxicology 16 (1):169-182

Duft M, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J (2003a) Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. Environ Toxicol Chem 22 (1):145-152

Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003b) Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aq Toxicol 64 (4):437-449

Fretter V, Graham A (1994) British prosobranch molluscs. Their fonctional anatomy and ecology. Ray Society, London

Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard JC (2006) Estradiol-17[beta] and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. Gen Comp Endocrinol 145 (2):133-139

Gerard C, Poullain V (2005) Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. Environ Pollut 138 (1):28-33

Gust M, Buronfosse T, Geffard O, Coquery M, Mons R, Abbaci K, Giamberini L, Garric J (2010a) Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the new zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (gray). Aq Toxicol doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.007

Gust M, Buronfosse T, Geffard O, Mons R, Queau H, Mouthon J, Garric J (2010b) In situ biomonitoring of freshwater quality using the new zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (gray) exposed to waste water treatment plant (wwtp) effluent discharges. Water Res 44 (15):4517-4528

Gust M, Buronfosse T, Giamberini L, Ramil M, Mons R, Garric J (2009) Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. Environ Pollut 157 (2):423-429

Gust M, Garric J, Giamberini L, Mons R, Abbaci K, Garnier F, Buronfosse T (2010c) Sensitivity of gastropod *Potamopyrgus antipodarum* to a specific aromatase inhibitor. Chemosphere 79 (1):47-53

Gust, M., Vulliet, E., Giroud, B., Garnier, F., Couturier, S., Garric, J., Buronfosse, T., 2010d. Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch molluscs. J Chrom B- 878, 1487-1492.

Janer G, Porte C (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. Ecotoxicology 16 (1):145-160

Jemec A, Drobne D, Tisler T, Sepcic K (2010) Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione s-transferase and cholinesterase in two crustacean species. Environ Sc Pollut Res 17 (3):571-581

Jensen A, Forbes VE, Parker ED (2001) Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*: Linking toxicant effects on individuals to the population level. Environ Toxicol Chem 20 (11):2503-2513

Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aq Toxicol 65 (2):205-220

Ketata I, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A (2007) Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: A one year study in the gulf of gabes area. Comp Biochem Physiol - A: 147 (2):424-431

Lafont R, Mathieu M (2007) Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology 16 (1):109-130

Li Y, Qin JG, Li XX, Benkendorff K (2009) Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in stansbury (south australia). Aquaculture 286 (1-2):64-71

Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K (1997) Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. Comp Biochem Physiol B 118 (4):811-817

Matthiessen P (2008) An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. Integr Environ Asses Manag 4 (3):ISSN 1551-3777(print)|1551-3793(electronic)

Mazurova E, Hilscherova K, Jalova V, Kohler HR, Triebskorn R, Giesy JP, Blaha L (2008) Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* in vivo and in the cell bioassays in vitro. Aquat Toxicol 89 (3):172-179

Mouneyrac C, Linot S, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Métais I, Durou C, Minier C, Pellerin J (2008) Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. Gen Comp Endocrinol 157 (2):133-141

Mouthon J (2001) Life cycle and population dynamics of the asian clam *Corbicula fluminea* (bivalvia : Corbiculidae) in the rhone river at creys-malville (france). Archiv Fur Hydrobiologie 151:571-589

Nentwig G (2007) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part ii: The antidepressant drug fluoxetine. Arch Environ Contam Toxicol 52 (2):163-170

OECD (2010) Detailed review paper (drp) on molluscs life-cycle toxicity testing. OECD Series on Testing and Assessment No. 121. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris

Oetken M, Nentwig G, Loffler D, Ternes T, Oehlmann J (2005) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part i. The antiepileptic drug carbamazepine. Arch Environ Contam Toxicol 49 (3):353-361

Ojea J, Pazos AJ, Martinez D, Novoa S, Sanchez JL, Abad M (2004) Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. Aquaculture 238 (1-4):451-468

Osada M, Harata M, Kishida M, Kijima A (2004a) Molecular cloning and expression analysis of vitellogenin in scallop, *Patinopecten yessoensis* (bivalvia, mollusca). Mol Repro Dev 67 (3):273-281

Osada M, Tawarayama H, Mori K (2004b) Estrogen synthesis in relation to gonadal development of japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: Gonadal profile and immunolocalization of p450 aromatase and estrogen. Comp Biochem Physiol B 139 (1):123-128

Pazos AJ, Sánchez JL, Román G, Luz Pérez-Parallé M, Abad M (2003) Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. Comp Biochem Physiol B 134 (2):367-380

Schmitt C, Balaam J, Leonards P, Brix R, Streck G, Tuikka A, Bervoets L, Brack W, van Hattum B, Meire P, de Deckere E (2010a) Characterizing field sediments from three european river basins with special emphasis on endocrine effects - a recommendation for *Potamopyrgus antipodarum* as test organism. Chemosphere 80 (1):13-19

Schmitt C, Oetken M, Dittberner O, Wagner M, Oehlmann J (2008) Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used uv screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. Environ Pollut 152 (2):322-329

Schmitt C, Vogt C, Van Ballaer B, Brix R, Suetens A, Schmitt-Jansen M, de Deckere E (2010b) *In situ* experiments with *Potamopyrgus antipodarum* - a novel tool for real life exposure assessment in freshwater ecosystems. Ecotoxicology and Environmental Safety In press

Serdar S, Lok A (2009) Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet shell clam tapes *Decussatus, linnaeus* 1758 in sufa (homa) lagoon, izmir, turkey. Aquaculture 293 (1-2):81-88

Sternberg RM, Hotchkiss AK, LeBlanc GA (2008) The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. Gen Comp Endocrinol 156 (1):15-26

Wagner M, Oehlmann J (2009) Endocrine disruptors in bottled mineral water: Total estrogenic burden and migration from plastic bottles. Environ Sc Pollut Res 16 (3):278-286

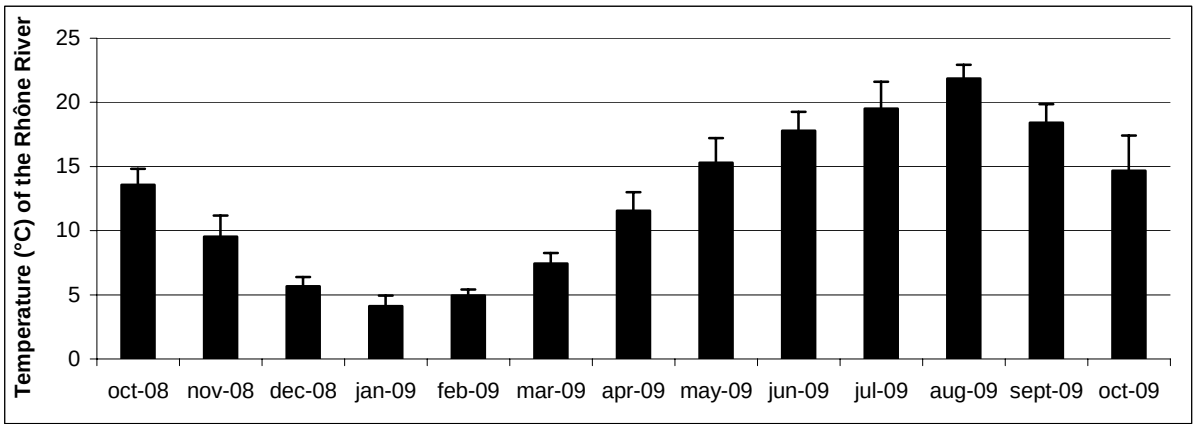
405 Table 1: Fecundity in control *P. antipodarum* depending on the experimentation conditions.
406 Figure 1: Temperature (mean values and standard deviation) of the Rhone River over the
407 year.
408 Figure 2: Fecundity (as the number of embryos in the brood pouch, mean value and standard
409 deviation) and embryo composition in *P. antipodarum* over the year.
410 Figure 3: 17β-œstradiol (E2, 10pg/snail) and testosterone (T, pg/snail) levels (mean values
411 and standard deviation) in *P. antipodarum* jointly with fecundity of snails of the same length
412 over the year (a<b<c<d; $P<0.001$, LSD test).
413 Figure 4: Energy status (mean values and standard deviation) in *P. antipodarum* jointly with
414 fecundity of snails of the same length over the year (a<b<c<d; $P<0.001$, LSD test). A:
415 Triglycerides (TG, nmol/snail) levels; B: Glycogen (µg/snail); C: Cholesterol levels
416 (nmol/snail), D: Protein levels (µg/snail).

Experimental conditions						Unshelled embryos[a]	Shelled embryos	Total embryos	Reference
Exposition type		**Size of organisms**	**Origin of organisms**	**T°C**	**Food**				
Laboratory	**Sédiment**	>3.6mm	Culture	15±1°C	Tetraphyll + Fish Tamin				(Duft *et al*., 2003a; Duft *et al*., 2003b)
			Culture	15.6°C		3-6 (14-56d)	3-8 (14-56d)	8-14 (14-56d)	(Mazurova *et al*., 2008)
		4±0.5mm	Culture	16°C	Leaves	1 (56d)			(Schmitt *et al*., 2008)
		3.8±0.5mm	Culture	15±1°C	Leaves			2-5 (28-56j)	(Schmitt *et al*., 2010a)
	Water		Culture		Lettuce	1-2 (14-42d)		10-12 (14-42d)	(Jobling *et al*., 2003)
		4.6±0.2	Culture	20°C	Lettuce			7.5 (35d)	(Gerard et Poullain 2005)
		4.1±0.1	Culture	20°C	Lettuce			2.5 (35d)	(Gerard et Poullain 2005)
		>3.7mm	Culture	16±1°C	Tetraphyl	7 (28d)	7 (28d)	14 (28d)	(Oetken *et al*., 2005)
		>3.7mm	Culture	16±1°C	Tetraphyl	6 (28-56d)	11 (28-56d)	17 (28-56d)	(Nentwig 2007)
			Culture	16±1°C	Tetraphyl	4 (56d)			(Wagner et Oehlmann 2009)
		4.4±0.3mm	Culture	21°C	Tetramin	4 (42d)	9 (42d)	13 (42d)	(Gust *et al*., 2009)
Field		3.3-4.3mm	Culture		Sediment			4-10 (28d)	(Schmitt *et al*., 2010b)
		4.2±0.2mm	Field		Biofilm	3-10 (7-28d)	6-10 (7-28d)	10-17 (7-28d)	(Gust *et al*., 2010b)
		4.4±0.4mm	Field		Biofilm	3-9 (21-28d)	5-16 (21-28d)	9-25 (21-28d)	(Gust *et al*., 2010a)

Table 1: Fecundity in control *P. antipodarum* depending on the experimentation conditions.

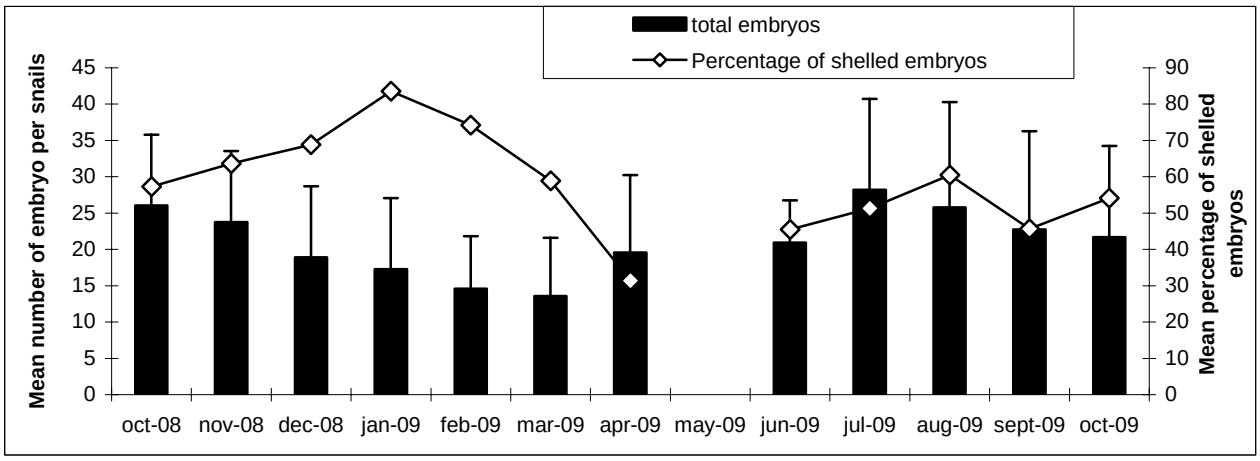
[a] Mean values obtained in control snails at different measurement time during the experiment (the time of the different measurements are given within brackets).

419 Figure 1: Temperature (mean values and standard deviation) of the Rhone River over the
420 year.
421



422
423

423 Figure 2: Fecundity (as the number of embryos in the brood pouch, mean value and standard
424 deviation) and embryo composition in *P. antipodarum* over the year.
425



426
427
428

Figure 3: 17β-estradiol (E2, 10pg/snail) and testosterone (T, pg/snail) levels (mean values and standard deviation) in *P. antipodarum* jointly with fecundity of snails of the same length over the year (a<b<c<d; $P<0.001$, LSD test).

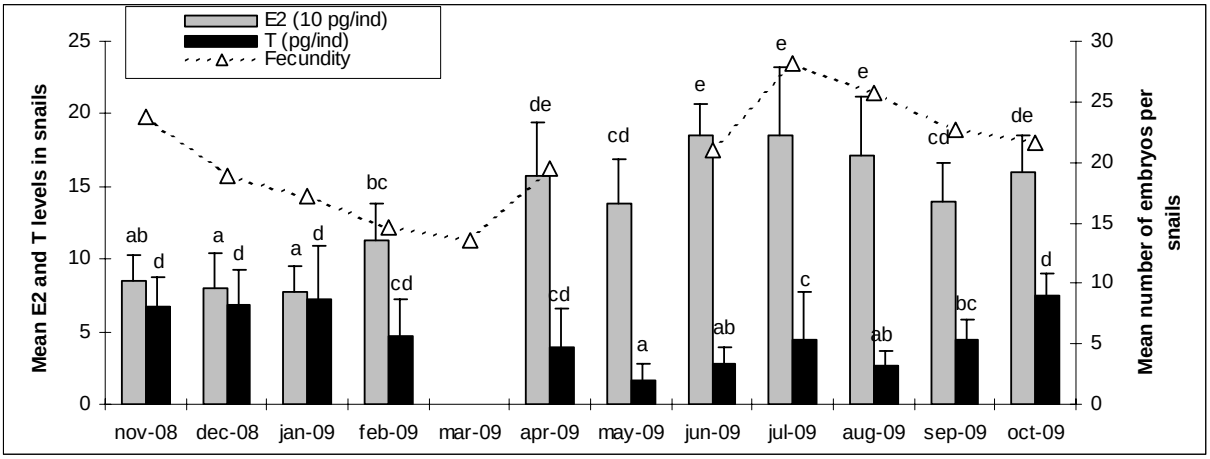
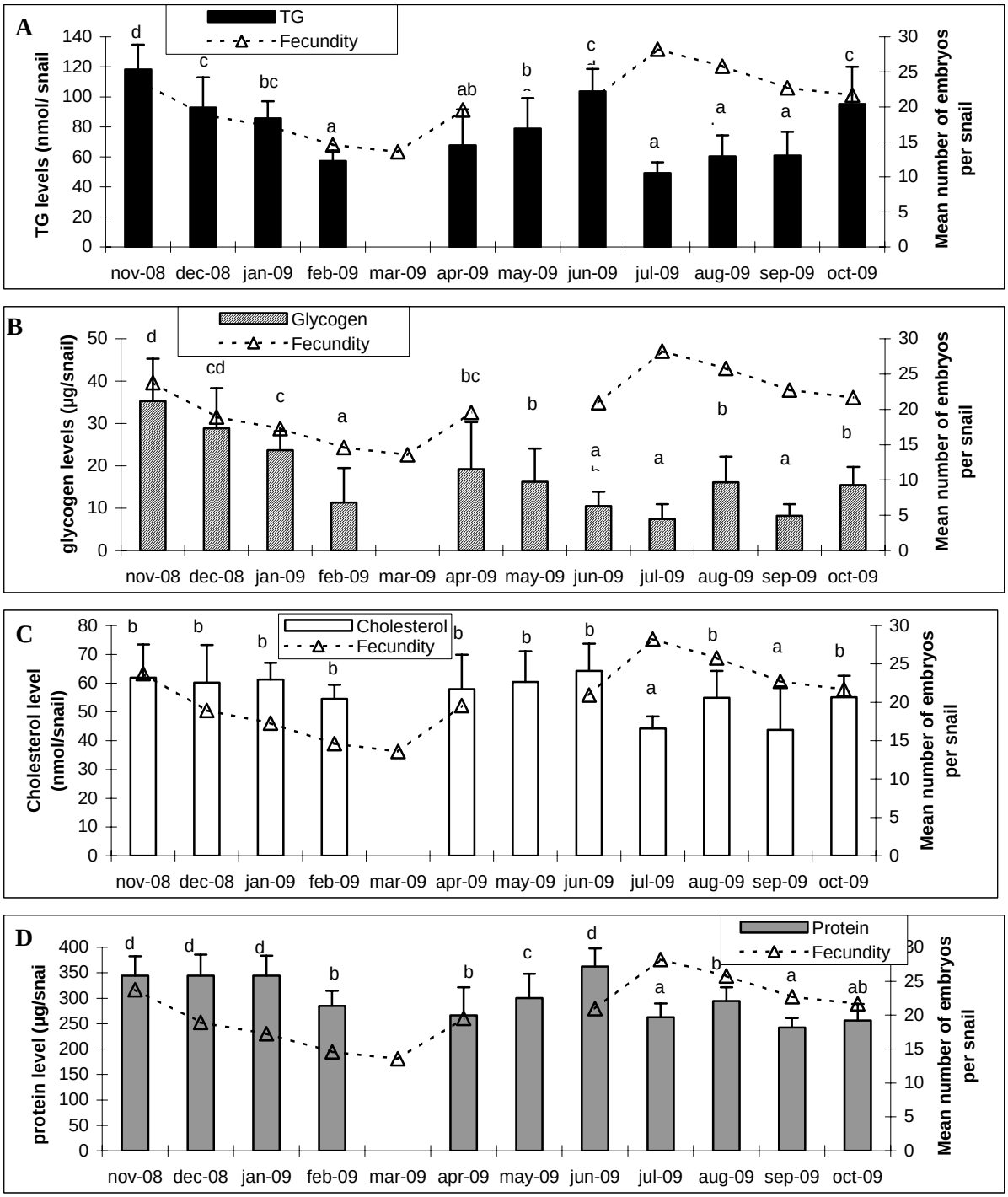


Figure 4: Energy status (mean values and standard deviation) in *P. antipodarum* jointly with fecundity of snails of the same length over the year (a<b<c<d; $P<0.001$, LSD test). A: Triglycerides (TG, nmol/snail) levels; B: Cholesterol levels (nmol/snail), C: Protein levels (µg/snail).



2. Effet de la température

Publication n°2:

Is temperature of exposure a confounding factor for assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)?

M. Gust, T. Buronfosse, C. André, R. Mons, F. Gagné, J. Garric

Bien que proposé à l'OCDE, comme biotest de reprotoxicité, *P. antipodarum* est exposé à différentes températures au laboratoire. Son utilisation pour des encagements *in situ* se développe et les températures peuvent varier de manière importante sur le terrain, aussi bien entre les sites que durant l'exposition. Ainsi il s'est avéré important d'évaluer les effets de différentes températures d'expositions sur la reproduction de *P. antipodarum* et également sur les marqueurs de suivi de cette reproduction. Une exposition à une gamme de température reflétant celles potentiellement rencontrées sur le terrain (8, 16 et 24°C) a été réalisée.

La température d'exposition a un effet marqué sur la reproduction. La reproduction est quasiment stoppée à 8°C et les individus s'épuisent rapidement à 24°C. A 16°C, la capacité reproductive est la plus importante. La **durée de développement embryonnaire** est également affectée par la température d'exposition. Elle est très longue à 8°C, entre 4 et 5 semaines à 16°C et 2 à 3 semaines à 24°C. Nous avons pu exprimer la durée de développement des embryons non coquillés et des juvéniles en degrés-jours. Ces informations sont importantes pour déterminer la **durée des expositions** sur le terrain suivant la température de l'eau. De plus elles montrent qu'il est inutile d'exposer *P. antipodarum* en hiver pour évaluer un effet reprotoxique, du fait du fort ralentissement du développement embryonnaire.

Les marqueurs mesurés (E2, T, statut énergétique, protéines Vn-like) ont été peu ou pas affectés par la température d'exposition. Les variations observées sur les niveaux de stéroïdes et le statut énergétique peuvent être mises en relation avec les observations faites lors du suivi du cycle annuel. Cette faible sensibilité de nos marqueurs aux températures d'exposition est en faveur d'une **utilisation aisée sur le terrain**, puisque peu sensibles aux variations de températures entre sites.

Mots clés : *Potamopyrgus antipodarum*, température d'exposition, reproduction, stéroïdes sexuels, statut énergétique, protéines Vn-like

Aquatic Toxicology 2011, 101, 306-404

Aquatic Toxicology 101 (2011) 396–404

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Is exposure temperature a confounding factor for the assessment of reproductive parameters of New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)?

M. Gust[a,b], T. Buronfosse[c], C. André[d], R. Mons[a], F. Gagné[d], J. Garric[a,*]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau, 69009 Lyon, France
[b] AgroParisTech ENGREF, 19 Avenue du Maine, F 75732 Paris, France
[c] Université de Lyon, Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France
[d] River Ecosystem Research, Aquatic Ecosystem Protection Division, Environment Canada, 105 McGill Street, Montréal, Quebec, Canada H2Y 2E7

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 September 2010
Received in revised form
15 November 2010
Accepted 23 November 2010

Keywords:
Potamopyrgus antipodarum
Exposure temperature
Reproduction
Steroid levels
Energy status
Vn-like proteins

ABSTRACT

Potamopyrgus antipodarum is a promising test organism often used in ecotoxicology testing, both in laboratory and in field exposure experiments. It has been recommended for use in the development of an OECD reproduction test. However, exposure temperature is important to take into account when assessing reproduction and related biomarkers, because it can act as a confounding factor inducing variability in physiological values. The effect of three environmentally realistic exposure temperatures (8, 16 and 24 °C) was examined with respect to the number of neonates born, the number of embryos in the brood pouch and the duration of embryonic development. We also measured additional markers likely to be related to the modulation of reproductive performance, such as vertebrate-like sex steroid, energy status and vitellin-like proteins. Exposure temperature had a significant effect on reproduction in *P. antipodarum*, on both the duration of embryonic development and the quantity of embryos and neonates. The consequences of these observations must not be neglected when using this species in laboratory and field experiments. This study determined suitable temperatures for field experiments and a mean duration for embryonic development independent of temperature. In addition to steroid levels, energy status and Vn-like protein levels were only slightly modified by exposure temperature between 8 and 24 °C. Thus, they can be easily implemented and their variations related to anthropogenic factors during field exposure of mudsnails.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) is an invasive parthenogenetic ovoviviparous gastropod, today common in European countries, which inhabits a variety of types of brackish and freshwater systems, soft and hard waters, in mud and sand, as well as on rocks, gravel and aquatic plants (Fretter and Graham, 1994). It has been proposed as a suitable test species to assess the impact of endocrine disrupting compounds (EDCs) on invertebrates and has been recommended for use in the development of reproduction tests within the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guideline "Ad hoc Expert Group on Invertebrate Testing" (OECD, 2010). It is considered a promising species for use in partial life cycle testing (Matthiessen, 2008). Indeed, mollusk species have been shown to be sensitive to various known vertebrate EDCs at environmentally relevant concentrations (Duft et al., 2003b; Oehlmann et al., 2006). *P. antipodarum* is a sensitive test organism already used in laboratory testing, experimental streams and *in situ* experiments (Jobling et al., 2003; Duft et al., 2007; Matthiessen, 2008; Gust et al., 2010a).

Temperature can fluctuate considerably over both annual cycles and exposure sites in the natural environment. It is also a very important regulatory factor of reproduction in poikilotherms and can modify pollutant toxicity. Indeed, Moller et al. (1994) showed that exposure temperature affected acute toxicity of cadmium in *P. antipodarum*. Performing toxicity tests in standard conditions enhances reproducibility, which is essential when comparing biological responses obtained from laboratory or field exposures. In particular, the influence of exposure temperature is important to take into account when assessing reproduction and related biomarkers, because it can act as a confounding factor inducing variability in physiological values (Moller et al., 1994; Jemec et al., 2010; OECD, 2010).

However, the effects of toxicants on *P. antipodarum* reproduction have been studied under laboratory conditions with different exposure temperatures ranging from 15 to 21 °C (Jensen et al., 2001; Duft et al., 2003a,b; Schmitt et al., 2008; Gagnaire et al., 2009; Gust et al., 2009, 2010b; Pedersen et al., 2009). As *P. antipodarum* seems to be a promising species in *in situ* experiments measuring toxic impact (Gust et al., 2010a), it is important to assess the impact of

* Corresponding author. Tel.: +33 472208905; fax: +33 478477875.
E-mail address: jeanne.garric@cemagref.fr (J. Garric).

0166-445X/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aquatox.2010.11.013

exposure temperature on its reproduction and associated biomarkers to properly interpret fecundity variations. Temperature can affect reproduction directly, both quantitatively and qualitatively. Therefore, the aims of this study were (i) to assess the effect of realistic exposure temperatures on the reproduction and reproductive parameters of *P. antipodarum* and (ii) to draw up recommendations on its use in laboratory and field studies depending on the exposure temperature.

To meet these goals, the effect of three realistic environmental and laboratory exposure temperatures (8, 16 and 24 °C) were examined with respect to the number of neonates born, the number of embryos in the brood pouch and the duration of embryonic development. Indeed, *P. antipodarum* is ovoviparous, and juveniles are continuously laid, while embryos are always present in the brood pouch when the mudsnails are in favorable conditions. Consequently, the assessment of the effect of stressors on fecundity requires that the entire embryonic development occurs during exposure (Pedersen et al., 2009). The duration of the experiment must be chosen accordingly. The duration of embryonic development was determined by blocking the early embryonic development of *P. antipodarum* and measuring time necessary to observe a decrease and/or disappearance of new embryos.

Additional markers likely to be linked to the modulation of the reproductive performance were also measured. Current evidence supports a physiological role of vertebrate-like sex steroids in mollusk reproduction, particularly in *P. antipodarum* (Matthiessen, 2008; Gust et al., 2010b). Variations have been measured in both laboratory (Gust et al., 2009, 2010b) and field studies in *P. antipodarum* (Gust et al., 2010a, 2011).

Energy reserves are of considerable importance in reproduction, and seasonal energy storage and utilization are closely related to environmental conditions (Ojea et al., 2004). Measurements of egg-yolk precursor protein vitellogenin (Vg)-like and egg-yolk proteins were also proposed as potential markers of endocrine disruption in *P. antipodarum* (Gagnaire et al., 2009).

2. Materials and methods

P. antipodarum organisms originated from a natural population collected in the Rhone River. They were collected in September 2009, with water temperature around 20 °C. They were kept 6 weeks at 20 ± 1 °C in 20 L in stainless glass aquaria filled with clean[1] water and fed with Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) before the experiments.

2.1. Exposure to different temperatures

Adult reproducing snails, with a shell height of 4.4 mm (±0.2), were used at the start of the experiments. We aimed at measuring the effects of temperature on both the reproductive output (i.e., number of neonates born weekly and the number of embryos in the brood pouch) and the duration embryonic development.

Two simultaneous exposures were conducted to achieve these goals. To determine the effect of temperature on snail fecundity, we exposed adult snails to three different temperatures (8, 16 and 24 °C) in clean water. The effect of temperature on the duration of embryonic development was assessed by comparing control (clean water-exposed) snails to fluoxetine-exposed snails (100 μg/L). Fluoxetine was used because it is a selective serotonin reuptake inhibitor that has been suggested to block the transition of oocytes into unshelled embryos in *P. antipodarum* (Gust et al., 2009). The oocytes of this species usually become unshelled embryos, then shelled embryos and finally neonates. In fluoxetine-exposed snails, no new shelled embryos were formed, but the other steps of embryonic development still occurred (Fig. 1). A decrease in neonate or embryo count was observed compared to controls when the duration of embryonic development was achieved in fluoxetine-exposed snails.

Twenty 600-mL test beakers filled with 500 mL water were placed in three water baths maintained at 8, 16 and 24 ± 1 °C with a 16:8 h light:dark photoperiod. For each temperature, ten beakers were filled with clean water and the ten others with fluoxetine-spiked water. Six of the ten beakers were used in a weekly count of the neonates born and contained ten snails each. The other four beakers with 60 snails each were used for the embryo count and biomarker measurements. Clean water and the fluoxetine solution were continuously renewed (four renewals a day) using a flow-through system employing a continuous pumping system. The stock of the fluoxetine-spiked solution (CAS number 59333-67-4, purchased from Interchim, Montluçon, France), was renewed every 3 days and kept at ambient temperature (18 °C) in darkness.

Conductivity, temperature and pH were monitored daily in the beakers. Temperature monitor probes were used to continuously check each water bath. Organisms were fed *ad libitum* with 0.6 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per working day.

2.2. Biological measurements

For each of the six exposure conditions (clean water and fluoxetine-spiked exposed snails at three temperatures), the number of neonates born was counted weekly using a binocular microscope. Developmental abnormalities, if observed, were noted. Embryos in the brood pouch were counted on days 0 (n = 50), 14, 28, 42 and 56 on adults randomly taken in the four remaining beakers, in the clean water exposure (n = four pools of 12 snails) and fluoxetine-spiked exposure (n = four pools of eight snails). The technique was adapted from Duft et al. (2003b). The shell length was measured and then the shell was cracked using a vice. After carefully opening the brood pouch, the number of unshelled and shelled embryos were counted under a binocular microscope.

2.3. Biomarker measurements

Biomarkers were measured only in clean-water-exposed organisms at 8, 16 and 24 °C.

2.3.1. Energy reserves

On days 0, 14, 28, 42 and 56, the energy status was measured in ten pools of two dissected and embryo-emptied *P. antipodarum* exposed at 8, 16 and 24 °C in clean water, as previously described (Gust et al., 2011). Briefly, snails were homogenized in 200 μL PBS and the levels of cholesterol, proteins and triglycerides (TGs) were directly measured using a Konelab® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France), a robot commonly used for clinical analysis of biochemical parameters. TGs were hydrolyzed by a lipase and released glycerol measured at 510 nm. The bond between proteins and red pyrogallol–molybdate complexes was measured at 600 nm for protein determination. Cholesterol esters were enzymatically hydrolyzed and total cholesterol was oxidized and measured at 500–550 nm. The repeatability and linearity of the reactions were assayed for each parameter and intra- and interassay variability was less than 5%. The limits of quantification were 4 nmol TGs for 3 μg protein and 15 nmol cholesterol per snail.

2.3.2. Vitellin-like protein measurements

On days 0, 14, 28, 42 and 56, vitellin-like proteins were analyzed in acetone fractionated proteins for alkali-labile phosphates

[1] Mixture of natural spring water and deionized water.

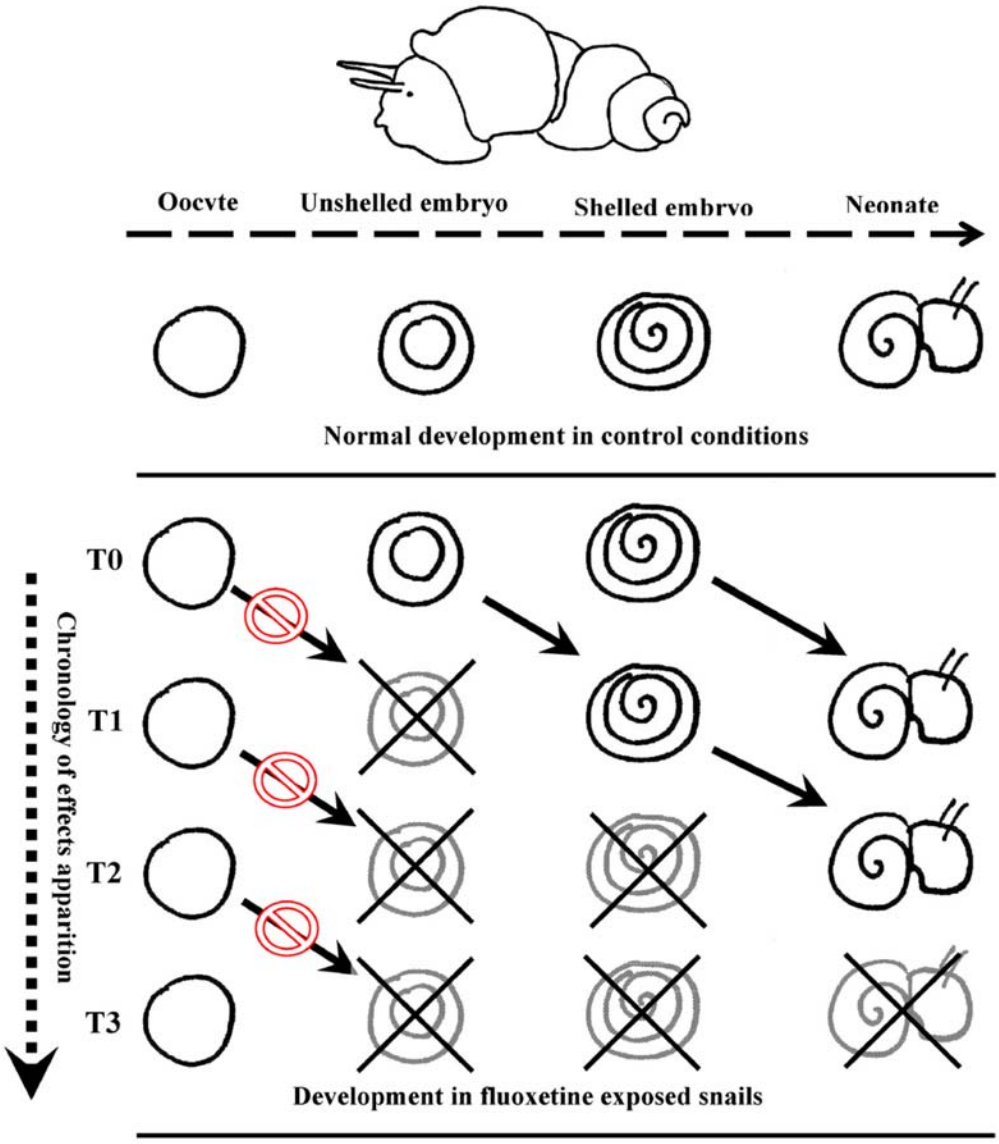


Fig. 1. Chronology of embryonic development in *P. antipodarum* under control conditions and during fluoxetine exposure. In the beginning of the exposure (T0), snails were exposed to fluoxetine, which blocked early embryonic development, but late development continues. During the exposure in the fluoxetine-exposed snails, compared to controls, first a decrease in unshelled embryo was observed (T1: duration of development from oocyte to unshelled embryo), then that of both shelled and unshelled embryos (T2: duration of development from oocyte to shelled embryo), and finally that of neonates (T3: duration of development from oocyte to neonate).

(ALP) and protein-bound lipids (PBL) (Gagne et al., 2005; Gagnaire et al., 2009) in three pools of ten dissected and embryo-emptied snails exposed at 8, 16 and 24 °C in clean water. Briefly, tissue homogenates were prepared on ice in 25 mM Hepes-NaOH, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol and 1 μg mL^{-1} aprotinin (protease inhibitor at 6000 KIU/mg; Sigma) using a Teflon pestle tissue grinder. The homogenates were centrifuged at 1000 × *g* for 10 min at 4 °C and the supernatant was carefully collected from the pellet and stored at −80 °C.

High-molecular-weight proteins in the supernatant were precipitated by adding 35% acetone and the protein pellet obtained by centrifuging at 10,000 × *g* for 5 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 100 μL of 10 mM Tris-acetate, pH 8.0, containing 1 mM EDTA. The alkali treatment consisted of adding one volume of NaOH 2 M heated at 60 °C for 30 min. The phosphates and lipids released were determined by colorimetry as described elsewhere (Stanton, 1968; Frings et al., 1972). They were calibrated with inorganic phosphate (KH_2PO_4) and Triton X-100 for ALP and ALL, respectively.

Gagnaire et al. (2009) showed that the levels of PBL and the PBL/ALP ratio could be used to estimate Vn-like proteins in *P. antipodarum*. The data were expressed as micrograms of ALP or PBL per snail.

2.3.3. Steroid measurements

Using a radioimmunoassay (RIA) technique, the levels of total testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) were measured on days 0,

28 and 56 on ten pools of two *P. antipodarum* randomly taken in clean-water-filled beakers at 8, 16 and 24 °C, as previously published (Gust et al., 2010c). Briefly, snails were homogenized in 1% (v/v) trifluoro acetic acid and were extracted twice with methylene chloride. After a saponification step, steroids were extracted twice with methylene chloride and resuspended in 80 µL 1% steroid-free bovine serum albumin (BSA). The samples were assayed using commercial RIA kits for E2 (Orion Diagnostic, Espoo, Finland) and T (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA).

2.3.4. Fluoxetine measurements

On days 14, 28, 42 and 56, fluoxetine was measured at each temperature in water samples randomly collected in control (water) and fluoxetine-spiked beakers. Samples were then stored in glass vessels at −21 °C for less than 30 days before chemical analysis.

The system used was an HP 1100 Series (Agilent) coupled to a triple-stage quadrupole mass 3200 QTrap spectrometer (Applied Biosystem) equipped with a TurbolonSpray source. Data were processed with Analyst 1.5.

The chromatographic separation was performed on a Synergi Hydro RP (50 mm × 2 mm, 4 µm) (Phenomenex) column with the corresponding guard column. The column's oven temperature was set at 30 °C; the injection volume was 100 µL; the flow rate was 300 µL/min. Samples were analyzed in positive mode with the mobile phase (A) water with ammonium acetate 10 mM and (B) methanol, with the following elution program: start at 40% (A), from 40 to 0% in 8 min and from 8 to 13 min, 100% (B). The column was re-equilibrated 5 min between runs.

The multiple reaction monitoring (MRM) mode was chosen for quantification. Fluoxetine was identified by its retention time, two characteristic ion transitions (310 > 148 and 310 > 91) and specific ratios of the responses of the transitions (deviation <20% with respect to analytical standards ratios). The limit of quantification (LOQ) for fluoxetine in water samples was 1 ng L^{-1}.

2.4. Statistical analysis

Normality distribution and homogeneity of variance of the data were tested. One- and two-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by the LSD test for *post hoc* comparisons of groups, with Bonferroni adjustments. When necessary a Kruskal–Wallis test and a Mann–Whitney *U*-test were performed. All statistical analyses were performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

During the entire experiment, pH (7.50 ± 0.02) and conductivity (370 ± 10 µS/cm) remained relatively constant. The measured exposure temperatures were 7.8 ± 0.2 °C, 15.8 ± 0.2 °C and 24.3 ± 1.1 °C for the 8, 16 and 24 °C temperatures, respectively. Mortality values were lower than 5% at the end of exposure in all beakers.

3.1. Measured water concentration

The measured concentrations of fluoxetine are presented in Table 1. Globally, fluoxetine concentrations were similar at all three temperatures, except on day 56, when they were higher at 8 °C than at 16 and 24 °C.

Table 1
Fluoxetine concentrations (µg/L) in water during the exposure (Nd: not detected).

	Day 14	Day 28	Day 42	Day 56
Control	Nd	Nd	Nd	Nd
8 °C	45.3	80.8	107.5	73.1
16 °C	45.6	72.5	103.2	60.8
24 °C	43.3	72.8	79.9	48.6

3.2. Effect of temperature on reproduction

3.2.1. Fecundity and fertility

The quantitative effects of exposure temperature on reproduction (number of neonates born weekly and number of embryos in the brood pouch) were assessed in the control (clean-water-exposed) snails. Exposure time and temperature had a significant effect ($P < 0.05$) on mudsnail fertility and fecundity, expressed as the number of embryos in the brood pouch (unshelled, shelled and total) and the cumulate number of neonates, respectively. From day 7 to 56, the weekly cumulate number of neonates in each temperature group was significantly ($P < 0.001$) different, indicating a significant effect of temperature on mudsnail fecundity (Fig. 2A). The number of embryos in the brood pouch was also affected by exposure temperature (Fig. 2B).

Overall, at 8 °C, reproduction was low, with very few embryos in the brood pouch and neonates laid. However, a significantly ($P < 0.001$) higher number of unshelled embryos was observed on day 56 compared to day 0, indicating that the production of embryos was slowed down but not totally stopped. On the contrary, at 16 °C neonates were born constantly, even with an acceleration from day 35. The number of embryos also increased at this temperature, compared to the other temperatures at almost all times. Compared to colder temperatures, we observed quicker reproduction kinetics at 24 °C (Fig. 2A) with the cumulate number of neonates reaching a plateau on day 35. This could indicate exhaustion of snail reproduction at this temperature. The number of embryos in the brood pouch was relatively constant over time at this temperature and lower than at 16 °C.

3.2.2. Embryonic development

The effect of temperature on the duration of embryonic development was assessed by comparing the control snails to the fluoxetine-exposed snails. We used the clean-water-exposed snails as controls. For each temperature, the number of embryos per fluoxetine-exposed snails as a percentage of the corresponding controls was calculated (Fig. 2C). When the number of unshelled embryos decreased, the development duration from oocytes to unshelled embryos was completed. When both embryo types decreased in fluoxetine-exposed snails, the duration of development from oocyte to shelled embryo was determined. Finally, the duration of development from oocyte to neonate was determined when the number of embryos and neonates decreased.

No significant ($P > 0.05$) difference was observed at 8 °C between the cumulate number of neonates in the control group and the fluoxetine-exposed snails throughout exposure (Fig. 2A). At higher temperatures, the effect of fluoxetine exposure was clearly observable, with the cumulate number of neonates at 16 °C and 24 °C significantly ($P < 0.001$) lower compared to controls. This effect was observed earlier at 24 °C (after 21 days of exposure) than at 16 °C (35 days, Fig. 2A). Earlier responses were also observed when the embryo count was considered: the higher the exposure temperature was, the faster the embryo count decreased (Fig. 2C). At 8 °C, all embryos types were significantly ($P < 0.001$) fewer from day 42 compared to snails not exposed to fluoxetine. At 16 °C and 24 °C, the total number and the unshelled number of embryos significantly ($P < 0.001$) decreased beginning on day 28 and 14, respectively, and the same was true for all embryo types beginning on day 42 and 28, respectively.

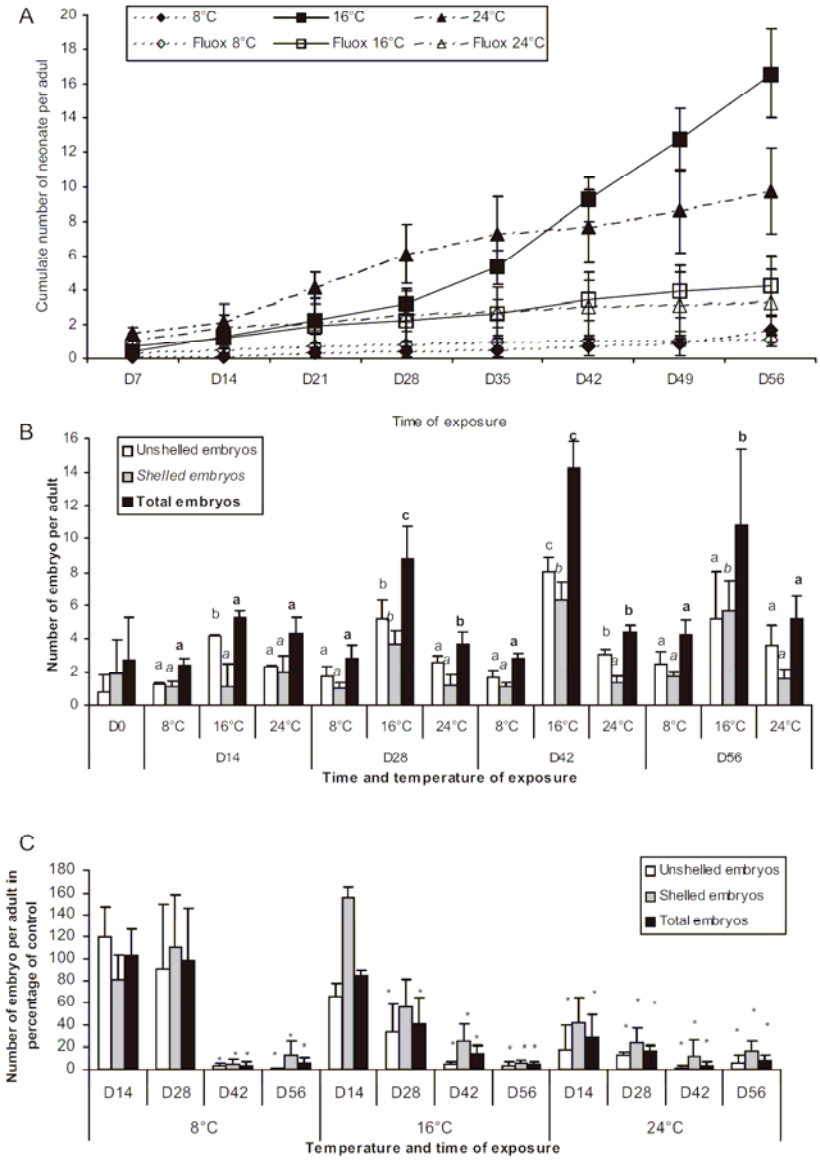


Fig. 2. Effect of temperature on *P. antipodarum* reproduction (mean value and standard deviation). A. Cumulate number of neonates per snail in clean and fluoxetine-spiked water as a function of time of exposure. n = six pools of ten snails. B. Number of embryos in the brood pouch per adult in clean water as a function of exposure time and temperature ($a < b < c$; $P < 0.001$, Mann–Whitney U-test or LSD test; characters represent significant effects of temperature on embryos for a specific time, D14, 28, 42 or 56; italics represent shelled embryos; bold, total embryos, nonbold, unshelled embryos). n = four pools of 12 snails. C. Number of embryos in the brood pouch per adult in fluoxetine-spiked water as a percentage of controls in relation to exposure temperature and time (*significant difference compared to snails not exposed to fluoxetine at the corresponding temperature, $P < 0.001$, Mann–Whitney U-tests or LSD test). n = four pools of eight snails.

3.3. Effect of temperature on energy status of clean-water-exposed snails

Exposure time and temperature had a significant effect ($P < 0.05$) on TG levels in snails, but only exposure time had a significant effect ($P < 0.05$) on cholesterol and protein levels (Fig. 3). At 24 °C, TG levels were significantly ($P < 0.001$) higher on days 42 and 56 compared to lower temperatures.

3.4. Effect of temperature on Vn-like protein levels of clean-water-exposed snails

Given that the total protein content of snails increased with exposure time, for all three temperatures (Fig. 3), we expressed Vn-like protein levels per snail and not per milligram of protein. Only exposure time had a significant effect ($P < 0.05$) on PBL levels and the PBL/ALP ratio in *P. antipodarum*, whereas exposure temper-

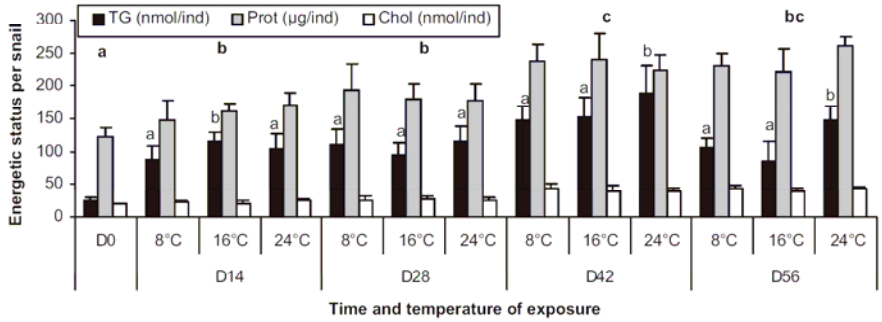


Fig. 3. Effects of temperature on *P. antipodarum* energy status (mean value and standard deviation) as a function of exposure temperature and time ($a < b < c$; $P < 0.001$, LSD-test, bold, significant effects of time on TG, protein and cholesterol levels; nonbold, significant effects of temperature on TG levels for a specific time, D14, 28, 42 or 56). n = ten pools of two snails.

ature did not. PBL levels and the PBL/ALP ratio were significantly ($P < 0.001$) increased on day 56 compared to days 0–42 (Fig. 4).

3.5. Effect of temperature on steroid levels of clean-water-exposed snails

Overall only exposure at the highest tested temperature led to a modification of the E2 level, with a significant ($P < 0.001$) increase after 56 days compared to 8 and 16 °C. T levels were significantly ($P < 0.001$) lower on day 28 at 24 °C and significantly ($P < 0.001$) higher on day 56 compared to lower temperatures (Fig. 5).

4. Discussion

These results confirm that *P. antipodarum* can live in a wide temperature range without notable mortality (Dorgelo, 1987; Roth, 1987; Quinn et al., 1994). However, exposure temperature significantly impacts both the clutch size and the duration of embryonic development.

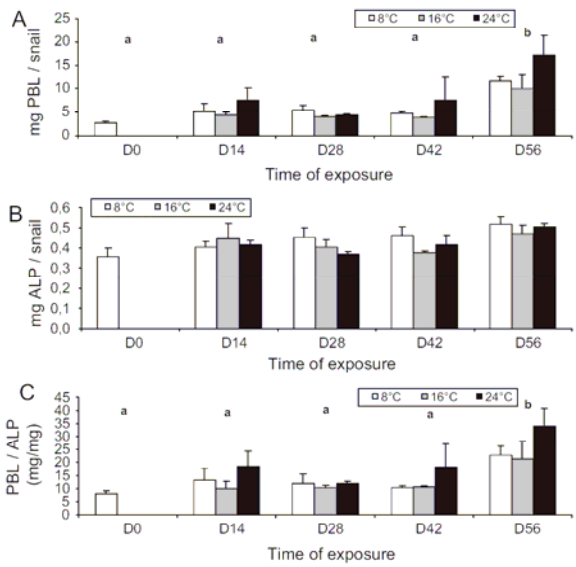


Fig. 4. Effects of temperature on *P. antipodarum* vitelline-like parameters (mean value and standard deviation) as a function of exposure time. A. Mean PBL levels (mg) per snail; B. Mean ALP levels (mg) per snail; C. ALP/PBL ratio ($a < b$; $P < 0.05$, Mann–Whitney U-tests; bold, significant effects of time). n = three pools of ten snails.

Fluoxetine concentrations were only 55% of the nominal concentration on day 14, but still within the range of the concentration blocking embryo development. This certainly results from adsorption on the exposure system implemented, as previously described (Gust et al., 2009).

4.1. Quantitative effects of exposure temperature on reproduction

At the start of the experiment, embryo production was low compared to our previous results, but within published levels for this species (Jobling et al., 2003; Gerard and Poullain, 2005; Schmitt et al., 2008). Exposure temperature has a quantitative effect on reproduction, with high fecundity and fertility at 16 °C, exhaustion at 24 °C and very low reproduction at 8 °C. At 16 °C, fecundity and fertility are in accordance with what has been previously published in control snails of this species for temperatures around 15–17 °C in laboratory waterborne experiments. Indeed, the number of neonates counted here at 16 °C is consistent with what different authors have described (Jensen et al., 2001; Pedersen et al., 2009). The unshelled embryo count per snail ranged from one to seven depending on the authors (Jobling et al., 2003; Oetken et al., 2005; Schmitt et al., 2008), while the total number of embryos per snail ranged from three to 17 (Jobling et al., 2003; Gerard and Poullain, 2005; Oetken et al., 2005; Nentwig, 2007; Wagner and Oehlmann, 2009) after 42–56 days of exposure. At 16 °C, we counted a mean of six to eight unshelled embryos and 11–15 total embryos per snail on days 42 and 56. As different diets influence fecundity (Dorgelo et al., 1995), the substantial range of variation that can be found in the literature is likely explained by the different diets provided during the experiments, at least in part.

4.2. Effects of exposure temperature on duration of embryonic development

The drop in embryonic and neonate count observed in fluoxetine-exposed snails at 16 and 24 °C compared to control snails confirmed the interruption of early embryonic development by fluoxetine, as previously described in this species (Gust et al., 2009). Due to the decrease in reproduction at 8 °C, no differences were observed in the cumulate number of neonates between control and fluoxetine-treated animals. At this temperature, the embryos appear to be kept in the brood pouch, which is consistent with what is observed in this species during winter when embryos are present in the brood pouch without any neonates observed until spring and warmer temperatures (M. Gust, unpublished data).

The decline in reproduction kinetics in fluoxetine-exposed snails at 16 and 24 °C allows us to propose a duration of embryonic development, given that fluoxetine blocks embryonic

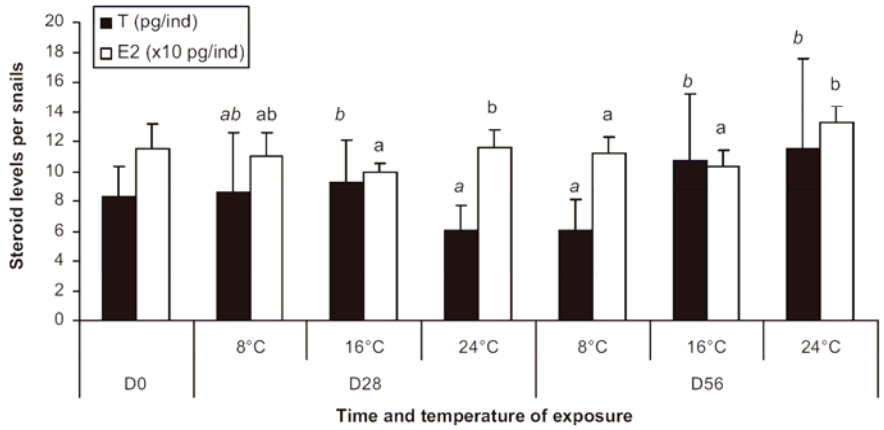


Fig. 5. Effect of exposure temperature on testosterone (T in pg per snail) and 17β-oestradiol (E2 in 10 pg per snail) levels in snails (mean value and standard deviation) as a function of exposure time and temperature ($a < b$; $P < 0.001$, LSD-tests, italics, significant effects on T levels for a specific time, D28 or 56, nonitalics parameters are for E2 levels). n = ten pools of two snails.

development in *P. antipodarum* before development of unshelled embryos.

The higher the exposure temperature, the faster the embryonic development is. It is very likely that the increase in neonates born in unexposed snails at 16 and 24 °C can be explained by this quickened development. These results concerning the duration of embryonic development are consistent with previous studies. In this species Dorgelo (1991) described embryonic stage development lasting 30–35 days at 15 °C. From the present results, a 28-day duration seems necessary to observe embryonic development at 16 °C in *P. antipodarum* from oocyte to unshelled embryo, and 35 days from oocyte to neonate. At 16 °C, the cumulate number of neonates in the fluoxetine-exposed snails dropped beginning day 35, while the number of unshelled embryos decreased starting day 28.

The same type of phenomenon occurred at 24 °C: a decrease in unshelled embryos followed by a drop in the number of neonates. The embryonic development at this temperature is faster than at 16 °C, around 14 days for the unshelled embryos and 21 days for the neonates. In both temperatures, the decline in the cumulate number of neonates was recorded before the decline in the number of shelled embryos. This is certainly due to the 2-week time-span between each embryo count, whereas neonates were counted weekly.

4.3. Recommendations for experimentation

Following the experimental design, which only allowed us to measure embryos every 2 weeks, we can roughly calculate a range of development duration from oocytes to unshelled embryos in degree days (DD) for each exposure temperature. The thermal constant (expressed as the number of degree (in °C) days) is widely used as a predictor of developmental patterns in plants and poikilothermic organisms. Such a thermal constant requirement for a developmental process provides a measure of the physiological time required for the completion of that process and have been recognized as a reliable predictor of growth and development (Trudgill et al., 2005). The use of the degree-day sum is widespread because of its simplicity and is based on the fact that many developmental processes take place under seasonal conditions that resemble each other. It varied from 336 °C days at 8 °C and 24 °C to 448 °C days at 16 °C. These results led to suggesting a mean duration for embryonic development of around 373 °C days. The duration of oocyte to neonate development ranged from 504 °C days at 24 °C to 560 °C days at 16 °C. It was greater than 448 °C days at 8 °C and could not be measured after 56 days of exposure. Nevertheless, these values are relatively equivalent and give good insight into the duration of unshelled embryo and neonate development in *P. antipodarum*.

These observations are very important to consider when using *P. antipodarum* in laboratory and field experiments. They can be used to determine the optimal experiment duration for the expected effects to appear. Reprotoxicity cannot be properly measured in the field at cold temperatures because the laying of neonates is blocked. Therefore, field experiments cannot be conducted during winter months when the water temperature is below 10 °C. Experiments can be conducted at high temperatures (24 °C) given that no mortality was observed and this temperature is below the upper lethal temperature of *P. antipodarum* (LC50 after 96 h: 32.4 °C; Quinn et al., 1994). The effects on reproduction appear very quickly. In both field and laboratory experiments, temperatures around 16–20 °C are suitable and the effects on the number of unshelled embryos can be detected around 14–28 days as well as on the cumulate number of neonates around 35 days.

The combined use of shelled and unshelled embryo and neonate counts allows the assessment of the type of reproductive impairment: the effect on embryonic survival or development. Some authors observed modifications of the numbers of neonates at 16 and 17 °C from day 28 or 35 in snails exposed to pollutants (Pedersen et al., 2009; Gust et al., 2010b), in accordance with the present study. In toxicant-exposed snails, at 15 or 16 °C the number of unshelled embryos was usually significantly different than in controls on day 28 (Duft et al., 2003a,b; Oetken et al., 2005; Nentwig, 2007; Gust et al., 2010b) as measured in this study. However, effects have also been described as early as day 14 around 16 °C (Mazurova et al., 2008; Schmitt et al., 2008). Earlier modification of the number of unshelled embryos could be explained by a specific mechanism of toxicity (impairment of embryo survival rather than development).

4.4. Effect of temperature on reproductive parameters

No temperature effects were observed on Vn-like parameters. The relation between reproduction and Vn-like protein levels is unclear because temperature affected reproduction but not PBL levels or the ALP/PBL ratio. However, this could be explained by Vn-like proteins being measured on embryo-emptied snails. Thus, the Vn-like measurements represented the quantity of oocytes present in

the gonad at the time of the measurement. Our results suggest that whatever the temperature, the number of oocytes in the gonad is quite similar, and that temperature modifies the rate of embryonic development while the number of oocytes engaged in the reproductive process remains relatively constant. These oocytes become embryos and later neonates at different rates depending on the temperature, inducing variation in the number of embryos in the brood pouch and the number of neonates born.

Like Vn-like proteins, energy status was only slightly affected by exposure temperature, except for higher TG levels at 24 °C after 42 and 56 days. This is consistent with what was observed during seasonal variations of these parameters in molluscs. The rise of TG levels at the higher temperature under *ad libitum* feeding seems coherent since temperature is an important controlling factor of metabolism (Moller et al., 1994). TGs appeared to be a major energy reserve in *P. antipodarum*, closely linked to the reproductive cycle (M. Gust, unpublished results), whereas sterols such as cholesterol and proteins show lesser variations as they seemed to have a predominant structural role (Abad et al., 1995; Berthelin et al., 2000; Ojea et al., 2004).

As for TG levels, higher E2 levels were measured at 24 °C than at 8 and 16 °C. This is consistent with the seasonal variations of E2 measured during summer months in this species in a field population (data not shown). T levels also varied with temperature, but no consistent trend was observed. E2 levels cannot be easily linked to the offspring output in *P. antipodarum*, but were related to the duration of embryonic development. The higher the E2 levels, the quicker the embryonic development is.

The selected biomarkers showed low variation with exposure temperature, which excludes temperature as a major confounding factor when field experiments are conducted and upstream/downstream sites are compared. Neither Vn-like proteins nor cholesterol or protein levels are likely to be greatly impacted by site temperature differences. When measuring steroids and TG levels in field experiments, caution must be taken in interpreting the variation in levels when the temperature of the different exposure sites is very dissimilar. However, the variations between sites are generally less than 3 °C (Gust et al., 2011), and the range of variation of steroid and TG levels observed in this study was low even though we explored a huge range of temperature.

5. Conclusions

Exposure temperature has a clear effect on reproduction in *P. antipodarum*, both on the duration of embryonic development and on the quantity of embryos and neonates. The consequences of these differences must not be neglected when using this species in laboratory and field experiments. This study determined suitable temperatures for field experiments and a mean duration for the embryonic development, independent of temperature. Moreover, since steroid levels, energy status and Vn-like protein levels are not impacted by exposure temperature between 8 and 24 °C, they can be easily implemented and interpreted independently of temperature during field exposure of mudsnails.

Acknowledgments

This study was partly funded by ONEMA and the French Research Program on Endocrine Disrupters (PNRPE). The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon (Prof. F. Garnier) for the financial grant of the RIA and biochemical analysis, Environment Canada for the vitellin measurements, and the Service Central d'Analyse of CNRS for the fluoxetine measurements. Solange Couturier, Céline Dussard and Claire Plantarose are gratefully acknowledged for their technical help.

References

Abad, M., Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Sánchez, J.L., 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibran (Galicia, Spain). Comp. Biochem. Physiol. C 110, 109–118.

Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). Comp. Biochem. Physiol. B 125, 359–369.

Dorgelo, J., 1987. Density fluctuations in populations (1982–1986) and biological observations of Potamopyrgus jenkinsi in two trophically differing lakes. Hydrobiol. Bull. 21, 95–110.

Dorgelo, J., 1991. Growth, food and respiration in the prosobranch snail *Potamopyrgus jenkinsi* (E.A. Smith) (Hydrobiidae, Mollusca). Verhand. Int. Ver. Theor. Ang. Limnol. 24, 2947–2953.

Dorgelo, J., Meester, H., vanVelzen, C., 1995. Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae). Hydrobiologia 316, 199–210.

Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals – an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Ecotoxicology 16, 169–182.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2003a. Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. Environ. Toxicol. Chem. 22, 145–152.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003b. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aquat. Toxicol. 64, 437–449.

Fretter, V., Graham, A., 1994. British Prosobranch molluscs. Their Functional Anatomy and Ecology. Ray Society, London, pp. 820.

Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. Clin. Chem. 18, 673–674.

Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier, M.-H., Garric, J., 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. Aquat. Toxicol. 92, 155–167.

Gagne, F., Andre, C., Blaise, C., 2005. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 beta. Fresenius Environ. Bull. 14, 861–866.

Gerard, C., Poullain, V., 2005. Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. Environ. Pollut. 138, 28–33.

Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Coquery, M., Mons, R., Abbaci, K., Giamberini, L., Garric, J., 2011. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Aquat. Toxicol. 101, 100–108.

Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Mons, R., Queau, H., Mouthon, J., Garric, J., 2010a. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. Water Res. 44, 4517–4528.

Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J., 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. Environ. Pollut. 157, 423–429.

Gust, M., Garric, J., Giamberini, L., Mons, R., Abbaci, K., Garnier, F., Buronfosse, T., 2010b. Sensitivity of gastropod *Potamopyrgus antipodarum* to a specific aromatase inhibitor. Chemosphere 79, 47–53.

Gust, M., Vulliet, E., Giroud, B., Garnier, F., Couturier, S., Garric, J., Buronfosse, T., 2010c. Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch molluscs. J. Chromatogr. B. 878, 1487–1492.

Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Sepcic, K., 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. Environ. Sci. Pollut. Res. 17, 571–581.

Jensen, A., Forbes, V.E., Parker, E.D., 2001. Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*: Linking toxicant effects on individuals to the population level. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2503–2513.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquat. Toxicol. 65, 205–220.

Matthiessen, P., 2008. An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. Integr. Environ. Assess. Manage. 4, 1551-3777 (print)|1551-3793 (electronic).

Mazurova, E., Hilscherova, K., Jalova, V., Kohler, H.R., Triebskorn, R., Giesy, J.P., Blaha, L., 2008. Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* in vivo and in the cell bioassays in vitro. Aquat. Toxicol. 89, 172–179.

Moller, V., Forbes, V.E., Depledge, M.H., 1994. Influence of acclimation and exposure temperature on the acute toxicity of cadmium to the fresh-water snail *Potamopyrgus-Antipodarum* (Hydrobiidae). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1519–1524.

Nentwig, G., 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 163–170.

OECD, 2010. Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. OECD Series on Testing and Assessment No. 121. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, pp. 182.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oetken, M., Bachmann, J., Lutz, I., Kloas, W., Ternes, T.A., 2006. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gasteropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. Environ. Health Perspect. 114, 127–133.

Oetken, M., Nentwig, G., Loffler, D., Ternes, T., Oehlmann, J., 2005. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 49, 353–361.

Ojea, J., Pazos, A.J., Martinez, D., Novoa, S., Sanchez, J.L., Abad, M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of Ruditapes decussatus in relation to the gametogenic cycle. Aquaculture 238, 451–468.

Pedersen, S., Selck, H., Salvito, D., Forbes, V., 2009. Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in Potamopyrgus antipodarum. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1190–1199.

Quinn, J.M., Steele, G.L., Hickey, C.W., Vickers, M.L., 1994. Upper thermal tolerances of 12 New-Zealand stream invertebrate species. N. Z. J. Mar. Freshwater Res. 28, 391–397.

Roth, G., 1987. Zur Verbreitung und Biologie von *Potamopyrgus jenkinsi* (E. A. Smith, 1889) i Rhein-Einzugsgebiet (Prosobranchia: Hydrobiidae). Arch. Hydrobiol. 1, 49–68.

Schmitt, C., Oetken, M., Dittberner, O., Wagner, M., Oehlmann, J., 2008. Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates Potamopyrgus antipodarum and Lumbriculus variegatus. Environ. Pollut. 152, 322–329.

Stanton, M.G., 1968. Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. Anal. Biochem. 22, 27–34.

Trudgill, D.L., Honek, A., Li, D., Van Straalen, N.M., 2005. Thermal time – concepts and utility. Ann. Appl. Biol. 146, 1–14.

Wagner, M., Oehlmann, J., 2009. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 16, 278–286.

Des marqueurs de suivi de la reproduction au niveau de **l'individu** (fécondité, fertilité), **tissulaires** et **biochimiques** (réserves énergétiques, protéines Vn-like, stéroïdes) ont été mis en place chez *P. antipodarum* (et parfois *V. piscinalis*).

Le **cycle annuel** de *P. antipodarum* a été sommairement décrit sur une population naturelle, en relation avec le **statut énergétique** et les **stéroïdes sexuels**. Des **niveaux de base** de ces marqueurs ont été définis. Les données publiées sur cette espèce ont été remises en perspective.

L'effet de la **température d'exposition** sur l'importance de la descendance de *P. antipodarum* et le temps de développement embryonnaires ont été évalués. Les niveaux de stéroïdes, de protéine Vn-like et de réserves énergétiques sont peu affectés. Ces données sont importantes pour déterminer les **durées et périodes d'exposition** des organismes sur le **terrain**, et interpréter leurs **variations** indépendamment de la température.

CHAPITRE 3

LES STEROÏDES SEXUELS DE TYPE VERTEBRE : UN MARQUEUR DE PERTURBATION DE LA REPRODUCTION CHEZ *P. ANTIPODARUM* ?

Une grande partie des EDCs étudiés en écotoxicologie a des actions agonistes ou antagonistes des récepteurs aux hormones stéroïdiennes de type vertébré, et notamment l'ER. L'affinité relative pour l'ER de ces composés est en général bien inférieure à celle de l'E2. De plus, la plupart de ces polluants, à l'exception des dérivés halogénés, présentent une bioaccumulation faible dans l'environnement. Les effets biologiques potentiellement induits sont donc assez faibles, et apparaissent, dans la plupart des cas, improbables aux concentrations environnementales retrouvées (Sanderson 2006).

Cependant, d'autres mécanismes d'interférence avec les fonctions endocriniennes sont possibles, tels que des **perturbations des voies de synthèse des stéroïdes sexuels**. Les cytochromes P450 permettent des réactions hautement spécifiques lors de la synthèse des stéroïdes, et sont donc des cibles potentielles, du fait de leur rôle clef dans la formation de stéroïdes très actifs. Il est possible que certains polluants induisent des perturbations hormonales et des effets sur la reproduction liés, en interférant avec ces enzymes clefs. Ces interférences peuvent se faire par inhibition réversible ou non de l'activité catalytique ou par la régulation de l'expression du gène codant pour l'enzyme.

Par exemple, l'aromatase (enzyme convertissant la T en E2) peut être affectée par de nombreux polluants tels que des pesticides (DDT et divers métabolites organochlorés, fongicides azolés, triazines…) et les organoétains (Sanderson 2006). Dans ce cas, la mesure de variations de stéroïdes sexuels dans les individus peut être informative de perturbations de la fonction endocrinienne. Cela sous-entend cependant que les stéroïdes jouent un rôle dans le contrôle de la reproduction.

Nous avons vu dans le chapitre 1, les informations bibliographiques disponibles relatives au contrôle de la reproduction chez les mollusques. Le contrôle neuroendocrinien est incontestable, et de nombreux éléments concordants sont en faveur d'un rôle fonctionnel des stéroïdes sexuels de type vertébré mais des démonstrations univoques manquent encore. Nous proposons donc, dans ce chapitre, de nous concentrer sur les stéroïdes sexuels. Les objectifs sont d'**améliorer les connaissances** sur leur rôle potentiel dans le contrôle de la reproduction et de déterminer leur pertinence éventuelle comme **marqueurs de la perturbation endocrinienne** chez nos espèces modèles.

Afin de préciser si les stéroïdes sexuels de type vertébrés jouent un rôle dans la reproduction de *P. antipodarum*, nous avons adopté une démarche en plusieurs étapes, basée sur ce qui est connu de leur rôle chez les vertébrés :

1. Mise en évidence de la **présence** de stéroïdes sexuels de type vertébrés chez *P. antipodarum* ;
2. **Inhibition des voies de synthèse** et évaluation des conséquences sur la fécondité et les titres de stéroïdes ;
3. **Inhibition** de l'action des stéroïdes sexuels au niveau de leur **récepteur** et conséquences sur la fécondité.
4. Mise en relation des variations physiologiques des stéroïdes sexuels avec la fécondité au cours d'un **cycle annuel.**

A / MISE AU POINT D'UNE METHODOLOGIE DE DOSAGE

La première étape de notre travail a consisté à la mesure dans nos organismes de laboratoire, de stéroïdes sexuels de type vertébrés (T, E2 et P). Pour se faire, une méthode de dosage hautement sensible et spécifique était nécessaire.

Les **quantités** de stéroïdes retrouvées dans les mollusques sont très faibles, de l'ordre du ng/g ou moins (Porte *et al*., 2006; Janer et Porte 2007), ce qui implique des méthodes de dosage extrêmement sensibles. De plus la **taille** des organismes de travail est également peu importante (quelques mm), ce qui augmente la difficulté. Enfin, les mollusques présentent une **matrice analytique** complexe (matrice mucopolysaccharidique notamment), qui peut interférer avec le dosage. En conséquence, le dosage des stéroïdes sexuels dans nos organismes est un défi analytique. Les méthodes immunologiques ELISA couramment utilisées chez les bivalves n'ont pu être appliquées du fait de leur sensibilité insuffisante. Une méthode en **RadioImmunoAssay** (RIA) a donc été développée en collaboration avec la plate-forme d'endocrinologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL). Pour cela nous nous sommes basés sur les méthodes précédemment publiées (Tableau III-1).

La procédure suit le principe de base d'un immunodosage selon lequel des antigènes radioactifs et non radioactifs entrent en compétition pour un nombre fixe et limité de sites actifs représentés par un anticorps spécifique. La quantité d'isotope marqué (125I) lié aux anticorps est alors inversement proportionnelle à la concentration du réactif dosé présent et suit une loi logit. La séparation des antigènes libres et liés s'effectue facilement et rapidement au moyen d'un système de double anticorps et de précipitation élective, suivie de centrifugation. Le complexe traceur lié aux anticorps reste dans le tube et peut être mesuré par un compteur gamma après décantation du surnageant. Cette méthode est très sensible et spécifique, avec des limites de détection de l'ordre de 1 pg de T par individu et de 0,006 pg d'E2 par individu.

Cependant, les anticorps utilisés sont ceux des kits de dosage développés pour une espèce animale donnée, généralement l'homme. Dans ces conditions, un manque de spécificité du dosage ne peut être exclu. Une **confirmation** de la présence des stéroïdes sexuels par une méthode non discutable, utilisant la **spectrométrie de masse** a donc été nécessaire. Celle-ci a été réalisée par le Service Central d'Analyse du CNRS de Solaize, avec une méthode alliant la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Espèce		Broyage	Extraction	Purification	Milieu de dosage
Echinodermes (Hines *et al*., 1990)		0.1g échantillon 0.4ml HCl (0.025M) chaud 1.25ml Na_2HPO_4 (0.07M)	3x7ml CH_2Cl_2 Rdt P 66-87%, T 87-94%, E2 78 à 94%	Dissolution 0.5ml MeOH Sep-Pak activée 10ml MeOH, 10ml eau, 5ml NaCl (0.15M) Lavée 5ml NaCl, 10ml eau Elution 5ml MeOH Rdt P 56-72%, T 79-90%, E2 71-88%	
Mytilus galloprovincialis	Stéroïdes libres (Janer *et al*., 2005a)	1-2g PV Ethanol congelé 24h	diethyl ether 2x diethyl ether:ethanol (4:1). Evaporation Dissolution MeOH 80%	Dissolution 4ml eau milliQ C18 (isolute) lavées 8ml eau milliQ et connectée cartouche NH2. Lavées avec 8ml hexane Elution 9ml CH_2Cl_2: EtOH (7:3) Rdt 95-97%	50mM tampon phosphate pH 7.6 (0.1%gélatine)
	Stéroïdes totaux (Janer *et al*., 2005a)		Ethyl actetate (3x2ml) Dissolution 1ml MeOH (0.1% KOH) 45°C, 3h (saponification). 4ml eau milliQ Extraction 3x3ml CH2Cl2		
	(Morcillo *et al*., 1999)		6ml diethyl ether 2x10ml diethyl ether:ethanol (4:1). Evaporation Dissolution 2ml MeOH 80% Lavage des résidus au petroleum ether Rdt T 74±3% et E2 : 80±3%	Dissolution ethyl acetate :cyclohexane (1 :1) GPC colonne Elution 1ml/min CH_2Cl_2: ethyl acetate :cyclohexane (1 :1) Rdt T 91±2%et E2 102±36%	
Ruditapes decussatus (Ketata *et al*., 2007a; Ketata *et al*., 2007b)		0.1g gonade 0.5 ml eau pure	400µl HCl 20nM chaud (15min 40°C) 1.25ml Na_2HPO_4 (0.07M) Extraction 7ml CH_2Cl_2		250µl BSA
Helix aspersa		Tris-HCl	10ml ether-ethanol (4:1)		

(Le Guellec *et al*., 1987)					
Nucella lapillus et *Hinia reticulata* (Bettin *et al*., 1996)		2ml EtOH congelé 24h	8ml diethyl ether, 2x10ml diethyl ether:ethanol (4:1). Evaporation Dissolution 2ml MeOH 80% Lavage des résidus 2x avec 5ml de petroleum ether		1ml tampon borate T 69.2±5.04% E2 : 84.3±5.84%
Ilyanassa obsoleta (Gooding et LeBlanc 2004)	Stéroïdes libres	0.2g PV 1ml EtOH congelé 24h	Ethyl actetate (3x1ml) Rdt >93%		250µl (50mM) tampon phosphate
	Stéroïdes totaux		Ethyl actetate (3x1ml) Dissolution 1ml MeOH (1% KOH) 45°C, 3h (saponification). 4ml eau milliQ Extraction 3ml CH_2Cl_2		
Marisa cornuatis (Janer *et al*., 2006b; Lyssimachou *et al*., 2008)	Stéroïdes libres	0.3-3.5g PV EtOH congelé 24h	Ethyl actetate (3x2ml) Lavage des résidus au petroleum ether	Dissolution eau milliQ C18 (isolute) lavées 8ml eau milliQ et connectée cartouche NH2. Lavées avec hexane Elution CH_2Cl_2: methanol (7:3)	50mM tampon phosphate pH 7.6 (0.1%gélatine)
	Stéroïdes estérifiés		Ethyl actetate (3x2ml) Lavage des résidus au petroleum ether Dissolution MeOH (0.1% KOH) 45°C, 3h (saponification). 4 mL eau milliQ Extraction 3x3ml CH_2Cl_2		

Tableau III-1 : Méthodes d'extraction publiées des stéroïdes en RIA

Rdt : rendement ; MetOH : méthanol, EtOH : éthanol, CH_2Cl_2 : dichlorométhane, BSA : bovine serum albumine, PV : poids vif.

Nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés lors de la validation du dosage des stéroïdes sexuels chez *P. antipodarum*. L'effet matrice était très important et ne permettait pas de doser convenablement en RIA. Le signal spécifique était perdu très rapidement, dès que le nombre d'organisme sur lequel le dosage était effectué était supérieur à 4. Nous nous sommes donc basés sur les méthodes décrites dans le tableau III-1 et avons ajouté une étape de saponification. Cette étape a plusieurs conséquences. La première est que l'effet matrice est mieux contrôlé (dosage linéaire jusqu'à 8 individus, non testé au delà). La seconde est que nous dosons uniquement la **fraction totale** des stéroïdes. Nous avons, en effet, décrit dans le premier chapitre de ce travail que l'E2 et la T étaient présents majoritairement sous forme estérifiée chez les mollusques. Le rôle biologique de la fraction estérifiée semble être le stockage et l'inactivation biologique des stéroïdes, alors que la concentration de la fraction non estérifiée, qui est biologiquement active, reste constante (Gooding et LeBlanc 2001; Janer *et al*., 2005a; Fernandes *et al*., 2010). Nous n'avons pas été en mesure de doser uniquement la fraction libre en RIA, malgré l'utilisation de cartouches SPE.

En revanche, l'étape de saponification n'a pas pu être introduite dans l'extraction des stéroïdes en vue du dosage par LC-MS/MS, du fait de l'augmentation de la ligne de base. Seule la fraction liée aux protéines ainsi que celle non conjuguée ont alors été dosées.

En résumé, sauf indication contraire, nous dosons en RIA la **fraction totale** des stéroïdes (liée aux protéines, non conjuguée et conjuguée). Cette limite méthodologique a des conséquences importantes sur l'interprétation et sur la pertinence biologique, puisque nous n'avons pas accès à la fraction biologiquement active.

Le développement, la validation et la comparaison de ces deux méthodes de dosage chez *P. antipodarum* a fait l'objet d'une publication.

Publication n°3:

Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like sex-steroids in prosobranch molluscs

M. Gust, E. Vuillet, B. Giroud, F. Garnier, S. Couturier, J. Garric, T. Buronfosse

Le dosage des stéroïdes sexuels chez les mollusques pourrait être un marqueur pertinent de perturbation de leur fonction de reproduction. Deux méthodes, en RadioImmunoAssay (**RIA**) et en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (**LC-MS/MS**), ont été mises au point et comparées pour le dosage de la testostérone (T), la progestérone (P), et le 17β-œstradiol (E2) chez un mollusque gastéropode d'eau douce, *P. antipodarum*. Les principales difficultés rencontrées ont été les faibles quantités de stéroïdes présents, la petite taille des organismes et la matrice de dosage complexe.

Seules la T et la P **non conjuguées** ont pu être dosées par LC-MS/MS, tandis que la RIA a permis le dosage des trois composés, mais seulement sous leur forme totale, c'est-à-dire **non conjuguée et conjuguée** (après une étape de saponification). Les deux méthodes présentent des **rendements**, **précisions** et **exactitudes** compatibles avec leur utilisation en routine. Cependant, la RIA nécessite beaucoup moins d'organismes (2) que la LC-MS/MS (4x20), ce qui rend cette technique plus intéressante pour du « **screening** ». Par ailleurs, le dosage de la P en RIA présente une sensibilité assez faible, ce qui le rend peu, voire pas discriminant. Il est donc préférable d'utiliser la LC-MS/MS pour le dosage de ce composé. Bien que mesurée chez de nombreux mollusques, la présence d'E2 détectée en RIA chez *P. antipodarum* n'a pas été confirmée par la LC-MS/MS, qui n'était pas suffisamment sensible.

Les deux méthodes ont été comparées sur des organismes exposés en amont et aval de rejet d'effluents de station d'épuration. La comparaison des résultats obtenus par ces deux méthodes, est compliquée car les fractions dosées (non-conjuguées ou totale : conjuguées et non conjuguées) diffèrent suivant la méthode. Toutefois, il apparaît que la T et l'E2 ont été bioaccumulés en aval de la STEP.

Bien que la LC-MS/MS soit la référence pour le dosage des stéroïdes, la RIA est une méthode alternative qui semble robuste pour comparer des **variations de quantités** de stéroïdes. Cette méthode peut donc être appliquée en **routine**.

Mots clés : *Potamopyrgus antipodarum*, stéroïdes sexuels, RIA, LC-MS/MS

Journal of Chromatography B, 2010, 878, 1487-1492

Author's personal copy

Journal of Chromatography B, 878 (2010) 1487–1492

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Development, validation and comparison of LC–MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch molluscs

M. Gust[a,b], E. Vulliet[c,*], B. Giroud[c], F. Garnier[d], S. Couturier[d], J. Garric[a], T. Buronfosse[d]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 3b Quai Chauveau 69009, Lyon, France
[b] Agroparitech, ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris, France
[c] Service Central d'Analyse du CNRS - USR59, Chemin du Canal, 69360 Solaize, France
[d] Université de Lyon, Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat 69280, Marcy l'Etoile, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 September 2009
Accepted 25 March 2010
Available online 1 April 2010

Keywords:
RIA
LC–MS/MS
Comparative analysis
Steroids
Potamopyrgus antipodarum

ABSTRACT

The role of vertebrate-like sex-steroids (testosterone, T, progesterone, P, and 17β-estradiol, E2) in molluscs is still debated, but they could represent potential biomarkers of endocrine disruption. A radioimmunoassay (RIA) and a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) methods have been developed and compared to measure their levels in a gastropod snail *Potamopyrgus antipodarum*. Both methods showed a good reproducibility despite the complex matrix and the very low levels of vertebrate-like sex-steroids. Only T and P were detected using the LC–MS/MS method, while the RIA method reached lower detection limits and enabled the detection of all three steroids. Results indicated that T and P were mainly present as unconjugated forms. Both methods were compared in the analysis of snails exposed to waste water treatment plant effluents and led to the same conclusions concerning the modulation of steroids levels. Moreover, they both were in agreement concerning T measurements. On the other hand, LC–MS/MS appeared to be more suitable when analyzing P levels due to a low sensitivity of the RIA method. As E2 was not measured using the LC–MS/MS method because of a higher detection limit compared to the other steroids, the results obtained with the RIA method should be interpreted with caution. LC–MS/MS remains the gold standard for sex-steroid determinations, however a relevant and alternative method based on RIA was developed, requiring fewer organisms. RIA seems a promising method as a screening tool for experimental use, allowing comparison of sex-steroid levels in the mudsnail both in laboratory and in field experiments.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Vertebrate-like steroids (testosterone, T, progesterone, P, and 17β-estradiol, E2) have been found in several molluscs, bivalves or gastropods. Their origin (exogenous or endogenous) remains a question, although the main steps of their synthesis have been described [1–7]. Temporal variations of some of their levels have been linked to the reproductive cycle in bivalves [8–12] and gastropods [13]. Molluscs also seem able to accumulate high quantities of steroids in conjugating them with fatty acids [14]. These observations seem to point toward a physiological role of sex-steroids in mollusc reproduction.

Among the large number of chemicals released into the environment, endocrine disruptors (EDs) represent a structurally diverse group of compounds that may adversely affect the health of wildlife and fisheries by interaction with their endocrine system. The New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidea, Smith 1889) is a sensitive test organism, frequently used as an ecotoxicology biotest, recommended for use in the development of a reproduction test within the OECD guideline "*Ad hoc* Expert Group on Invertebrate Testing" [15,16]. As the main sex-steroids have been identified in *P. antipodarum* [17], their measurement in this organism could represent good biomarkers of endocrine disruption [18].

Quantification of the main vertebrate-like sex-steroids in such a complex matrix and with very low concentrations could be achieved by different techniques including radioimmunoassay (RIA) and gas or liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS or LC–MS). Steroid measurements based on RIA methods are generally rapid and inexpensive, and usually exhibit satisfactory precision and accuracy while requiring little sample preparation. Nevertheless, GC–MS and LC–MS are considered the gold standard methods for sex-steroid identification and quantification. Especially LC–MS/MS methods have been shown to be suitable for investigating steroids with a relatively low quantity of sample but with time consuming sample preparation step [19].

* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 02 22 22; fax: +33 4 78 02 71 87.
E-mail address: e.vulliet@sca.cnrs.fr (E. Vulliet).

1570-0232/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.046

Author's personal copy

These methods are considered more specific and allow the simultaneous detection of several metabolite or compounds in a single assay while, in RIA-based methods, accuracy and specificity can be limited by cross-reactivity or subjected to interferences induced by the organic matrix in which steroids are included. The comparison of RIA with the reproducible and highly specific LC–MS/MS technique in the measurement of E2 in gonadal tissues of a mussel [20] has shown higher values with the RIA technique as compared to liquid chromatography analysis, due to the possible existence of a second estradiol immuno-reactive product [20] or interactions with the matrix.

The objectives of the present work were to develop and compare RIA and LC–MS/MS methods in regard of their advantages and drawbacks in the quantification of T, P and E2 in *P. antipodarum* in order to use these methods in large-scale experimental fields.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All solvents (HPLC grade) and chemicals were purchased from Sigma–Aldrich, except the deuterated testosterone-1,2-d2 and progesterone-2,2,4,6,6,17α,21,21,21-d9 from CDN Isotopes. The degree of purity was at least 98% for all the standards; they were used without any further purification. Pure water was obtained from a Milli-Q device from Millipore.

For the LC–MS/MS experiments, individual stock solutions of 200 mg/L were prepared in methanol and stored at −23 °C. Composite working solutions were prepared by diluting suitable aliquots of each individual solution in Milli-Q water and were used within a week.

2.2. Experimental animals

P. antipodarum used for the validation of the RIA analysis were obtained from long-term cultures established in our laboratory (Cemagref, Lyon, France). These cultures were initiated with snails that originated from natural populations collected in clean sediment in a canal close to the Rhône river. The snails were kept at 16 ± 1 °C in 20 L stainless aquaria filled with reconstituted water (mixture of natural spring and deionised waters) and fed with Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany). The snails used for the validation of the LC–MS/MS analysis were directly collected in the Rhône river. To compare RIA and LC–MS/MS techniques, an *in situ* exposure of caged *P. antipodarum* was conducted upstream and downstream of a waste water treatment plant (WWTP) effluent discharge of Bourgoin-Jailleu, on the Bourbre river, France. As soon as collected, organisms were frozen at −23 °C until extraction.

2.3. Sample preparation

2.3.1. Preparation for LC–MS/MS analyses

Pools of 20 whole organisms were used. Each pool was first homogenized in 1 mL of water with UltraTurrax for 1 min. In order to prepare a range of standard additions, 4 pools were spiked with 50 μL of standard solutions of respectively 0, 3, 6 and 9 μg/L. To enhance the dissolution of steroids from binding proteins, 250 μL of 0.1 N HCl was added and the fractions were submitted to 10 min of sonication (125 W). To neutralize homogenates, 0.5 mL of 0.28 M Na_2HPO_4 was added. Methylene chloride (3× 3 mL) was used to extract the steroids. After centrifugation at 10,000 × *g* for 10 min, organic phase was removed, pooled and dried under nitrogen gas at 40 °C. Fractions were dried and reconstituted in 5 mL heptane–ethyl acetate (60/40, v/v). Each fraction was applied to aminopropyl SPE columns (200 mg/3 mL) from JT Baker, previously conditioned with 4 mL heptane and 4 mL heptane–ethyl acetate (60/40, v/v). In these conditions, the steroids were not retained by the stationary phase and elution was completed with the addition of 6 mL volume of heptane–ethyl acetate (60/40, v/v). The purified extract was dried and reconstituted in 250 μL methanol.

As it has been shown that molluscs conjugate steroids with fatty acids [14], the determination of total steroids (free + conjugated) was performed: methanol containing 2% KOH was added after neutralization with Na_2HPO_4 and the pools were kept at 45 °C for 3 h. After the saponification step, 3 mL of Milli-Q water was added, and the samples were extracted with methylene chloride (3× 3 mL).

2.3.2. Preparation for RIA analyses

To remove the interfering substances, a simple extraction procedure was performed, adapted from Gooding and LeBlanc [21], to measure the levels of total T, P and E2 (free and conjugated). Pools of 2 whole frozen *P. antipodarum* were manually homogenized with Teflon pester in 1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) for 3 min. Homogenates were extracted twice with methylene chloride (2× 2 mL) and centrifuged at 1000 × *g* for 10 min. The organic extract was evaporated and then underwent a saponification step (1 mL methanol containing 2% KOH for 3 h at 45 °C). Following saponification, 4 mL of reverse-osmosed water was added to each tube. Steroids were extracted twice with methylene chloride (2× 2 mL) and resuspended in an adequate volume of steroid-free bovine serum albumin 1% (BSA).

2.4. LC–MS/MS

Chromatography was performed using a Waters 2695 HPLC system including a vacuum degasser, binary pump and well-plate. The separation was performed on Zorbax Eclipse XDB C18 column (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) with the corresponding pre-column. Two gradient elution programs were applied, both with a 0.2 mL/min flow-rate. For the analyses of P and T, the mobile phase was (A) pure water and (B) acetonitrile, with a linear gradient from 35 to 75% (B) in 15 min. For E2 analysis, the mobile phase was (A) pure water and (C) methanol, with the following gradient: from 30 to 100% (C) in 10 min.

Characterization and quantification were performed with a mass spectrometer Waters Quattro Micro in the positive (analyses of T and P) or negative (analysis of E2) electrospray ionisation mode, using multiple reaction monitoring (MRM). Precursor and product ion masses as well as the individual cone and collision energy voltages are presented in Table 1.

2.5. RIA

Sex-steroid measurements were performed using different commercial kits for E2 (Orion Diagnostica, Espoo, Finland or DiaSorin, Saluggia, Italy), P and T (Diagnostic Systems Laboratories, TX, USA). Samples were read on a RIA Star Packard® gamma counter. For P and T, measurements were made according to the protocols provided with the RIA kits. For E2 measurements, modifications were performed, including 40 μL 1% steroid-free BSA incubation overnight at room temperature before performing competition with the tracer for 1 h at 37 °C. The E2 assay was performed in a non-equilibrium state assay in order to significantly increase the sensitivity of the test, as it has been described by Paulson et al. [22].

3. Results and discussion

Because of the complexity of the matrix and the low detection limits required to establish the presence of traces of steroids in tissue samples, very sensitive analytical procedure should be developed, including extraction and purification steps, with acceptable recovery and reproducibility. Since steroids have been reported

Author's personal copy

Table 1
Precursor and product ions, cone voltage (V_{cone}), collision energy (E_{col}), limits of detection (LOD) of the LC–MS/MS method, and intra-assay precision (CV) for T and P.

	Precursor ion (*m/z*)	Product ions (*m/z*)	V_{cone}–E_{col}	LOD (μg/L)	CV (%)
T	289	109	25 V–20 eV	0.50	Lab.: 2.4
		97	25 V–20 eV		Upstream: 6.7 Downstream: 13.7
P	315	109	25 V–20 eV	0.40	Lab.: 0.4
		97	25 V–25 eV		Upstream: 5.2 Downstream:8.4
E2	271	183	40 V–-40 eV	nd	nd
		145	45 V–45 eV		

nd: not determined.

to be present mainly as fatty acid-derived conjugates in molluscs, we tried to determine their respective levels with and without a saponification step, by both LC–MS/MS and RIA methods. Since the saponification step induces complete hydrolysis of fatty acid-derived steroids, the use of both preparation steps should allow on one hand the quantification of total steroids after total hydrolysis step and, on the other hand, only of the free fraction of steroids when this step was omitted. However, the LC–MS/MS method only allowed the identification of free forms of T and P while the RIA method was reliable only after the saponification step for P and E2, thus measuring the total levels of T, P and E2.

3.1. LC–MS/MS and RIA method developments

3.1.1. LC–MS/MS optimization

For the LC–MS/MS method, in order to optimize the MRM, full scan and product ion spectra, acquisition in positive and negative ion modes were performed by the infusion of standard solutions at 10 mg/L of each analyte. The base peak selected for quantification of E2 (m/z = 271) corresponded to the deprotonated molecule $[M-H]^-$. The major product ions corresponded to the A–B ring moiety (m/z = 145) and to the opening of C ring together with the loss of D ring (m/z = 183). On the other hand, T and P were detected as protonated molecules $[M+H]^+$ respectively m/z = 289 and m/z = 315. In MS/MS spectra of T and P, main product ions were m/z = 109 and m/z = 97, deriving respectively from the cleavage of the B- and C-ring as observed by several authors [23–25].

3.1.2. Sample preparation

3.1.2.1. Extraction of samples. Given the small size of organisms, in order to ensure a representative sample, tests with LC–MS/MS method were carried out from pools of 20 individuals. Various strategies such as freeze-drying, acidification of the sample, or the need for ultrasonication have been tested from samples spiked with sex-steroids (50 μL of a 100 μg/L spiked solution). The freeze-drying increased the amount of extracted steroids, but this step exhibited a poor reproducibility and was finally not adopted. Addition of chlorhydric acid permitted to enhance the dissociation of steroids from binding proteins, and extraction was increased by a few minutes under ultrasounds

For the preparation of samples for RIA analysis, several solutions were tested (SDS 1%, Tris–HCl 1%, Nonidet NP40 1%, Triton X-100 1%, HCl 1N, PBS 1X, TFA 1%) to homogenize the snails. Only TFA 1% did not induce a background noise. Moreover this acid enhanced the dissociation of sex-steroids from binding proteins.

A variety of organic solvents (methylene chloride, ethyl acetate, ether/ethanol 4/1, diethylether) were tested for their ability to extract T, P and E2. Methylene chloride was proved as the best universal solvent for extracting these steroids from lipid-rich tissues, as previously shown in other invertebrate tissues [26]. This solvent extraction was consequently used for both sample preparations in LC–MS/MS and RIA analyses.

3.1.2.2. Purification for LC–MS/MS analyses. In order to purify the extracted samples and reduce interferences during the subsequent analyses by LC–MS/MS, SPE has been chosen being a technique of choice for sample clean-up. Indeed it is easy to use, adapted to small sample volume and the wide variety of sorbents commercially available offers many interaction possibilities. To find an efficient method of clean-up limiting the loss of steroids, different protocols have been tested from standard solutions of T and P (2 μg/L) and E2 (200 μg/L), based on the principle that unwanted interferences remain on the solid phase and the compounds of interest are eluted. Thus the silica gel SiOH, Florisil, and the bonded phase aminopropyl cartridges were tested with different elution solvents alone or in combination (ethyl acetate, heptane, methylene chloride, acetone). Aminopropyl cartridges used with the mixture heptane–ethyl acetate (60/40, v/v) allowed best recovery rate while minimizing interferences. All recoveries were above 80%.

3.1.2.3. Purification for RIA analyses. Snail extracts of snails induced strong matrix interference, leading to lower precision and accuracy when measuring sex-steroids in RIA. To circumvent this problem, we tried to further isolate steroids using SPE C18 cartridge (Waters) and acetonitrile as elution solvent. However this process did not strongly diminish matrix interferences and SPE methods were discarded for RIA analysis. To control these interferences we added a saponification step, which actually resulted in a significant reduction and allowed a complete hydrolysis of complex lipids and conjugated steroids. Initially, RIA methods for E2 measurements were based on DiaSorin kits. However, this kit proved unsuitable to measure this steroid after the saponification step. Consequently, another highly sensitive kit (Orion Diagnostic coated kit) was used for determining E2 levels in *P. antipodarum*.

3.1.3. Quantification of the LC–MS/MS method

Deuterated analogues of the analytes represent ideal internal standards, as their identical chemical properties make them behave exactly as the analytes during the preparation steps, but the mass difference makes them easily identifiable with MS/MS detection.

At first, these standards were used to quantify steroids in snail extracts. However, we observed problems during the ionisation of deuterated in samples having undergone a saponification step. Indeed, the molecular ions $[M+H]^+$ = 291 and $[M+H]^+$ = 324 corresponding respectively to deuterated T-d2 and P-d9, present in the majority in the mass spectrum of the non-saponified samples (Fig. 1a), decreased by a factor 10 in saponified samples (Fig. 1b). It is worth noting that the peak $[M+H]^+$ = 324 disappeared completely in favour of masses centered on m/z = 318. It is likely that hydrogen–deuterium exchange takes place in the electrospray source, but so far we can make no assumptions about the nature of the mechanisms involved in this transformation. Therefore, no quantification of T and P could reliably be performed after saponification step using LC–MS/MS.

Author's personal copy

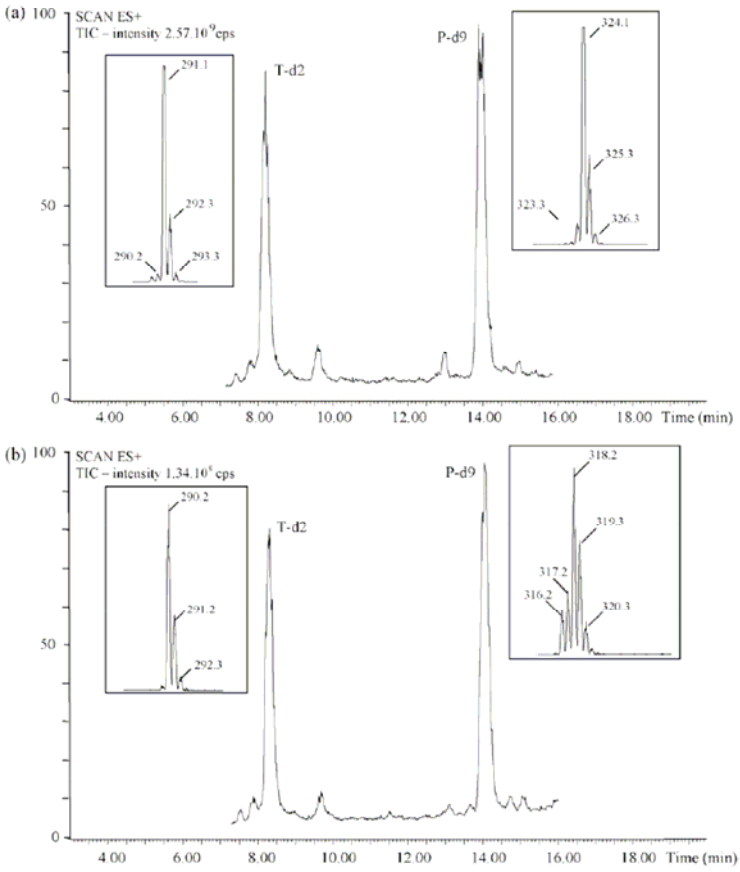


Fig. 1. Chromatograms of standard mixtures of T-d2 and P-d9 and their corresponding mass spectra without saponification (a) and after the saponification step (b).

3.1.4. Methods performances

3.1.4.1. LC–MS/MS. The linearity of the instrumental method was studied by injecting 6 standard concentrations of the target compounds within the range 1–50 μg/L for T and P corresponding to expected levels in organisms [27]. A good linearity was observed over the specified range with correlation coefficients 0.9989 and 0.9993 for T and P, respectively. Linearity of the whole method (preparation and analysis) was evaluated by linear regression of standard additions, which varied between 0.8220 and 0.9997 for T and between 0.7502 and 0.9925 for P. Repeatability of the method was obtained by the determination of T-d2 and P-d9 added in 8 replicates with 20 organisms in each pool (spiking at 40 ng/mL). The intra-assay precision (Table 1) was dependent of the origin of the organisms (from laboratory, upstream or downstream of WWTP) (Fig. 2).

3.1.4.2. RIA. Linearity was evaluated by measuring steroids in 2, 4, 6 and 8 snails. Linearity was very limited in the absence of the saponification step and was not respected beyond 4 snails (data not shown). However, the linearity of the method was confirmed for the range from 2 to 8 snails when this additional saponification step was performed. In this case, correlation coefficients were greater than 0.986. However, the slope of P measurements was lower indicating a very low sensitivity of the assay for this compound (Fig. 3). Concerning T measurements, linearity was achieved with and without saponification step, suggesting that this step could be avoided for this steroid only. For practical reasons, all assays were performed after saponification.

Recoveries were obtained by analyzing 10 replicates of spiked snails homogenates (2.88 ng/mL for T, 109 pg/mL for E2 and 20.44 ng/mL for P). Percent recoveries were calculated by dividing

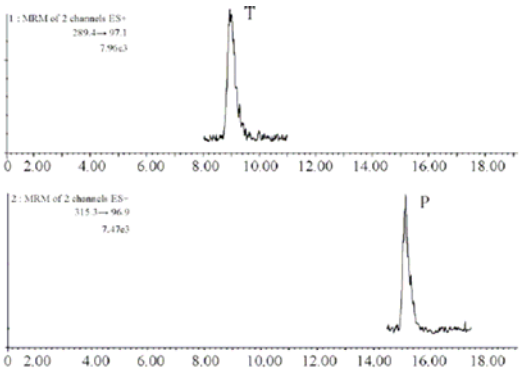


Fig. 2. MRM chromatograms of spiked (0.14 ng T and 0.17 ng P) samples from extraction of 20 snails upstream of WWTP.

Author's personal copy

Table 2
Performances of the RIA technique.

	Mean recovery	Intra-assay CV	Intra-assay ER	Inter-assay CV	Inter-assay ER	LOQ
E2	93 ± 19%	16%	17%	14%	15%	0.14 pg/mL
T	101 ± 12%	11%	1%	12%	1%	0.03 ng/mL
P	84 ± 8%	10%	18%	12%	11%	0.03 ng/mL

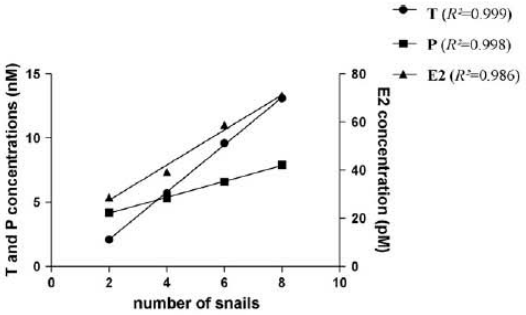


Fig. 3. Linearity of the RIA method in 2, 4, 6 and 8 snails for T (slope = 1.845), P (slope = 0.62) and E2 (slope = 7.281).

Table 3
Levels of T, P, and E2 using LC–MS/MS (organisms collected in a river) and RIA technique (laboratory animals).

Steroid levels	LC–MS/MS (pg/ind)	RIA (pg/ind)
T	3.3 ± 0.1	15.27 ± 6.27
P	2.3 ± 1.2	1.98 ± 1.83
E2	nd	1.58 ± 0.46

nd: not detected.

the measured concentration by the theoretical spiked concentration. Mean recovery values (Table 2) ranged from 84 to 101%. These high recoveries further suggest a good selectivity of the assay, limiting the existence of other endogenous interfering components which could be a potential source for variable results between subjects.

We tried to develop a measurement method which would be reproducible and would generate reliable data suitable for variability interpretation. Intra-assay precision and accuracy were evaluated by determining steroid concentrations in 10 snails equally spiked. Controls (0.66 ng/mL of T, 80 pg/mL of E2 and 1 ng/mL of P) were added in each measurement in order to ascertain inter-assay precision and accuracy. The greater the variability of the assay, the less discriminative the measurement method is. These data (Table 2) suggest that performance of the RIA method was acceptable across the range of measurement based on validation criteria (±20% Coefficient of Variation, CV, and Relative Error, ER). No notable effects of the origin of the snails (laboratory, caging experiments) were observed on these parameters.

3.2. Application of RIA and LC–MS/MS methods

3.2.1. Applications of the LC–MS/MS method

The LC–MS/MS method was successfully applied to the analysis of T and P in organisms collected in the river (Table 3), but did not allow the determination of E2 due to a higher detection limit of the method for this steroid.

3.2.2. Applications of the RIA method

We performed T measurements with or without saponification step of the extract prior RIA analysis successfully. Measured levels were similar (15.3 and 12.3 pg/snail, respectively) suggesting that, in laboratory *P. antipodarum*, conjugated T is not the major form. T is preferentially present as conjugated to fatty acids and this storage form appears to be a mechanism for regulating free levels (considered to be the active fraction) of the steroid in molluscs [28,29]. However the higher level of total T measured downstream of WWTP effluents (Table 4) suggested that *P. antipodarum* is able to bioaccumulate T.

3.2.3. Comparison of the performances of LC–MS/MS and RIA methods

In order to compare RIA and LC–MS/MS methods, an *in situ* exposure of caging *P. antipodarum* was conducted upstream and downstream WWTP effluent discharge for 21 days. Indeed it is now well established that endocrine disruptor compounds can enter the environment mainly through WWTP [30]. Analyses of P, T and E2 were performed simultaneously on 5 or 6 pools of 2 snails with RIA and (4× 20) snails with LC–MS/MS methods.

Detectable levels of vertebrate-like sex-steroids are confirmed in *P. antipodarum* but absolute levels were quite different regarding the method used (Table 4). Nevertheless, steroid levels were in the same order of magnitude when measured by RIA and LC–MS/MS methods. The measured steroid levels with both methods were consistent with those previously described in other molluscs species [27].

The sensitivity of the RIA method was an order of magnitude higher than the one of the LC–MS/MS method (Tables 1 and 2), which enabled the measurement of the steroids in fewer snails. This makes our RIA method more appropriate in experimental survey. The lesser sensitivity of the LC–MS/MS technique did not allow the detection of E2, hence results obtained with the RIA method must be used with caution.

Our RIA method underestimated P levels compared to LC–MS/MS, which could be explained by a residual matrix-dependence or more certainly, by the low sensitivity of the method

Table 4
Steroids levels (in ng/g) in snails exposed to a WWTP effluent discharge using RIA and LC–MS/MS techniques.

	T		P		E2
	RIA	LC–MS/MS	RIA	LC–MS/MS	RIA
Day 0 (n=5)	0.47 ± 0.39	0.60 ± 0.08	0.31 ± 0.17	1.02 ± 0.63	0.18 ± 0.10
Day 21 (n=6)					
Bion upstream	1.92 ± 0.32	0.84 ± 0.11	0.15 ± 0.08	0.92 ± 0.07	0.35 ± 0.15
Bourbre upstream	3.24 ± 1.28	1.25 ± 0.09	1.17 ± 0.52	0.50 ± 0.26	0.53 ± 0.26
Confluence	3.27 ± 0.84	1.78 ± 0.14	0.70 ± 0.49	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.26
Bourbre downstream	3.20 ± 0.92	1.65 ± 0.40	1.35 ± 0.96	1.18 ± 0.06	0.45 ± 0.10

Author's personal copy

used, probably dependent of a low antibodies avidity. These hypotheses would also explain the lower recoveries observed for this compound with the RIA method compared to E2 and T. Moreover in the field survey presented here (Table 4). P levels measured by both methods showed no correlation (Spearman test $P > 0.05$), but comparison could only be made on five measurements performed on different snails issued from the same experimental pool. The very poor dynamic range of the RIA method for P (Fig. 3) seems to indicate that it is not a suitable technique to assess variations of its levels in the mudsnail. The LC–MS/MS analysis should be preferred for P measurements. Our RIA method also generally produces higher values of T levels than the LC–MS/MS method as it was observed in human serum [31].

Spearman correlation coefficient between RIA and the T levels measured by LC–MS/MS, reach 0.9 ($P < 0.05$).

The effluent discharge seemed to modulate some steroids levels. Regardless of the measurement technique, no effects on P levels were observed after the exposure to the effluent discharge. The T and E2 levels were lower at the beginning of the exposure. It is very possible that the higher levels observed after exposure could be attributed to bioaccumulation of compounds discharges by the WWTP effluent and present in the river. Interestingly both methods show similar results in our survey.

4. Conclusions

Both RIA and LC–MS/MS methods enabled to detect sex-steroids in the gastropod snail *P. antipodarum* despite low amounts and complex matrix. They both are in agreement concerning T measurements, but LC–MS/MS should be preferred when analyzing P levels. As E2 was not measured using LC–MS/MS method, levels determined by RIA method must consequently be used with caution. Both methods showed sufficient sensitivity and reproducibility to be used as potential measurement method of endocrine disruptive compounds exposure in the mudsnail *P. antipodarum*. As RIA method requires far fewer snails (2) compared to LC–MS/MS method (4× 20) and is better adapted for numerous samples, it is more useful for screening purposes in courant ecotoxicology testing. RIA method developed in this work is reliable to assess variations of T and E2 levels in the mudsnail. Vertebrate-like sex-steroid measurement is a very promising biomarker to better understand the mode of action of EDs impairing mollusc reproduction.

Acknowledgements

The present work was funded by ONEMA. The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon for the financial grant of the RIA analysis. Particular acknowledgements are addressed to the reviewer whose helpful comments greatly improved this manuscript.

References

[1] H. Gottfried, R.I. Dorfman, Gen. Comp. Endocrinol. 15 (1970) 120.
[2] D. De Longcamp, P. Lubet, M. Drosdowsky, Gen. Comp. Endocrinol. 22 (1974) 116.
[3] C. Lupo Di Prisco, F. Dessi' Fulgheri, Comp. Biochem. Physiol. 50 (1975) 191.
[4] D. Le Guellec, M.C. Thiard, J.P. Remy-Martin, A. Deray, L. Gomot, G.L. Adessi, Gen. Comp. Endocrinol. 66 (1987) 425.
[5] O. Le Curieux-Belfond, S. Moslemi, M. Mathieu, G.E. Seralini, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 78 (2001) 359.
[6] M.J.J. Ronis, A.Z. Mason, Mar. Environ. Res. 42 (1996) 161.
[7] G. Janer, G.A. LeBlanc, C. Porte, Gen. Comp. Endocrinol. 143 (2005) 211.
[8] M.A. Reishenriques, J. Coimbra, Biochem. Comp. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. 95 (1990) 343.
[9] S. Gauthier-Clerc, J. Pellerin, J.C. Amiard, Gen. Comp. Endocrinol. 145 (2006) 133.
[10] T. Matsumoto, M. Osada, Y. Osawa, K. Mori, Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 118 (1997) 811.
[11] M. Osada, H. Tawarayama, K. Mori, Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 139 (2004) 123.
[12] I. Ketata, F. Guermazi, T. Rebai, A. Hamza-Chaffai, Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. 147 (2007) 424.
[13] R.M. Sternberg, A.K. Hotchkiss, G.A. LeBlanc, Gen. Comp. Endocrinol. 156 (2008) 15.
[14] G. Janer, S. Mesia-Vela, C. Porte, F.C. Kauffman, Steroids 69 (2004) 129.
[15] P. Matthiessen, Integr. Environ. Assess. Manage. 4 (2008) 274.
[16] M. Duft, C. Schmitt, J. Bachmann, C. Brandelik, U. Schulte-Oehlmann, J. Oehlmann, Ecotoxicology 16 (2007) 169.
[17] M. Gust, T. Buronfosse, L. Giamberini, M. Ramil, R. Mons, J. Garric, Environ. Pollut. 157 (2009) 423.
[18] M. Gust, J. Garric, L. Giamberini, R. Mons, K. Abbaci, F. Garnier, T. Buronfosse, Chemosphere 79 (2010) 47.
[19] X. Xu, L.K. Keefer, R.G. Ziegler, T.D. Veenstra1, Nat. Protoc. 2 (2007) 1350.
[20] W. Zhu, K. Mantione, D. Jones, E. Salamon, J.J. Cho, P. Cadet, G.B. Stefano, Neuroendocrinol. Lett. 24 (2003) (PII NEL243403A02).
[21] M.P. Gooding, G.A. LeBlanc, Invert. Biol. 123 (2004) 237.
[22] S. Paulson, L. Verhage, D. Mayer, K. Miller, G. Schoenhard, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 32 (1994) 93.
[23] F. Buiarelli, F. Coccioli, M. Merolle, B. Neri, A. Terracciano, Anal. Chim. Acta 526 (2004) 113.
[24] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, Anal. Chem. 75 (2003) 6265.
[25] B. Hauser, T. Deschner, C. Boesch, J. Chromatogr. B 862 (2008) 100.
[26] G.A. Hines, S.A. Watts, S.A. Sower, C.W. Walker, J. Liq. Chromatogr. 13 (1990) 2489.
[27] G. Janer, C. Porte, Ecotoxicology 16 (2007) 145.
[28] M.P. Gooding, G.A. LeBlanc, Gen. Comp. Endocrinol. 122 (2001) 172.
[29] G. Janer, A. Lyssimachou, J. Bachmann, J. Oehlmann, U. Schulte-Oehlmann, C. Porte, Steroids 71 (2006) 435.
[30] C. Desbrow, E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 1549.
[31] A.W. Hsing, F.Z. Stanczyk, A. Belanger, P. Schroeder, L. Chang, R.T. Falk, T.R. Fears, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16 (2007) 1004.

B / INHIBITION DE L'ACTION DES STEROIDES AU LABORATOIRE EN LIEN AVEC LA REPRODUCTION

Nous avons donc développé une méthode fiable et relativement rapide de dosage de l'E2 et de la T chez *P. antipodarum*. Nous avons mis en évidence la **présence** de stéroïdes sexuels chez cette espèce. Cependant, leur présence ne démontre pas leur rôle potentiel dans la reproduction. Il nous faut encore montrer que l'inhibition de leur action a des conséquences sur la reproduction. Ceci peut se faire de plusieurs manières : *via* l'inhibition de leur **synthèse** (inhibiteurs d'enzymes) ou par antagonisation des **récepteurs**, s'ils existent.

Nous avons vu (Chapitre 1) que les enzymes clefs de la stéroïdogenèse étaient l'**aromatase** qui convertit la T en E2, et la **5α-réductase**, qui convertit la T en DHT. Certaines molécules utilisées en tant que médicaments chez les vertébrés ont des actions très spécifiques d'inhibition de ces enzymes, ou bien des propriétés agonistes ou antagonistes des récepteurs nucléaires aux œstrogènes et aux androgènes. Dans cette étude, nous avons donc utilisé différents composés « modèles » (dont le mécanisme d'action est connu, généralement chez les vertébrés), et évalué leurs effets sur la reproduction de *P. antipodarum*. La différence de sensibilité avec *V. piscinalis* n'a pas été évaluée lors de l'ensemble des expérimentations pour les même raisons que précédemment : les organismes n'étaient pas toujours disponibles en quantité suffisante pour permettre les expérimentations.

Il faut noter que les actions des composés que nous avons utilisés (fadrozole, fulvestrant et vinclozoline) sont connues chez les vertébrés principalement, et qu'ils ne présentent pas nécessairement les mêmes mécanismes d'action chez des mollusques. Nous avons choisi des molécules dont les cibles d'action sont relativement conservées au cours de l'évolution, ou dont l'action a déjà été testée chez des espèces apparentées.

En cas d'absence d'effet observé, il est impossible de conclure que l'enzyme ou le récepteur dont nous avons voulu empêcher le fonctionnement, est absent, ou bien qu'il n'est pas fonctionnel. Inversement, en cas d'effet, il est également impossible de conclure de manière univoque que l'effet observé est du au mode d'action attendu. Ces expérimentations n'ont pour seul but que d'apporter un ensemble d'éléments en faveur (ou défaveur) du rôle des stéroïdes sexuels dans le contrôle de la reproduction. Elles ne sont en rien des preuves définitives en elles-mêmes. Un travail spécifique de physiologie fondamentale serait

nécessaire pour définitivement démontrer le rôle réel des stéroïdes dans la reproduction de *P. antipodarum*. Notre objectif dans ce chapitre, est de réunir suffisamment d'éléments sur les stéroïdes chez cette espèce, pour connaître les avantages et les limites de leur utilisation comme marqueur de reprotoxicité ou de perturbation endocrinienne.

1. Inhibition de la synthèse du 17β-œstradiol

Chez les vertébrés, il existe de nombreuses molécules plus ou moins spécifiques qui inhibent les voies de synthèse des stéroïdes sexuels. Par exemple l'aminoglutéthimide bloque principalement la conversion du cholestérol en prégnénolone mais également les hydroxylases et présente des propriétés anti-aromatase. Le kétoconazole inhibe toutes les voies de synthèse des stéroïdes. Il existe aussi des molécules médicamenteuses utilisées en médecine humaine ou vétérinaire, qui inhibent de manière extrêmement spécifique des enzymes de la stéroïdogenèse. Ainsi, l'inhibition de l'activité aromatase est couramment utilisée chez les femmes souffrant de cancers du sein œstrogéno-dépendants. Les inhibiteurs non stéroïdiens de l'aromatase de seconde génération font partie de ces molécules très spécifiques et actives, comme l'anastrozole, l'exemestane et le fadrozole.

Nous avons donc choisi une de ces dernières molécules, n'ayant pas d'autre action connue que l'inhibition de l'aromatase. Les objectifs étaient de mettre en évidence une éventuelle modulation de la synthèse d'E2, en présence de l'inhibiteur, et d'évaluer si elle était associée à des effets sur la reproduction chez *P. antipodarum*. Dans le cas d'une diminution conjointe des titres d'E2 et de la reproduction, il est alors possible de conclure que la reproduction est liée (voire dépendante) à la synthèse d'E2.

La molécule retenue a été le **fadrozole** (4-(5,6,7,8-tetrahydroimidazol[1,5a]-pyridin-5-yl) benzonitrile monohydrochloride; CGS 16949A), qui nous a gracieusement été fourni par la société Novatis Pharma et qui avait déjà été utilisé avec succès pour bloquer la synthèse de l'E2 chez le poisson (Ankley *et al*., 2002).

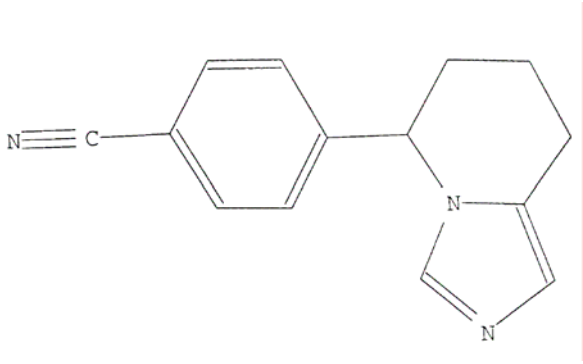


Figure III-1 : Structure du Fadrozole

Publication n°4 :

Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor

M. Gust, J. Garric, L. Giamberini, R. Mons, K. Abbaci, F. Garnier, T. Buronfosse

Nous avons réalisé deux expositions indépendantes de 4 et 6 semaines de *P. antipodarum* adultes au fadrozole (7-200µg/L), un inhibiteur très spécifique de l'aromatase, enzyme qui convertit la testostérone (T) en 17β-œstradiol (E2). Les objectifs étaient de moduler la synthèse de l'E2 et d'en observer les conséquences sur la reproduction (embryons dans la poche embryonnaire, juvéniles nés et histologie des gonades) de cette espèce.

Le fadrozole diminue le ratio E2/T de manière dose dépendante. Les niveaux de T sont diminués de manière significative, et ceux d'E2 non significativement (ce qui peut s'expliquer par la méthode de dosage, qui ne mesure que les formes totales). L'action inhibitrice du fadrozole sur l'aromatase de *P. antipodarum* semble donc avérée. Conjointement, une forte diminution dose-dépendante de la reproduction est observée lors des deux expérimentations. De plus, d'importantes modifications histologiques des gonades sont observées (tissu interstitiel dégénératif, follicules atrétiques). Des anticorps contre l'aromatase humaine ont permis de mettre en évidence un marquage spécifique de cellules pavimentaires de la gonade, pouvant être le lieu de la stéroïdogenèse. Ce marquage disparaît chez les escargots exposés à la plus forte concentration, ce qui est probablement du à une diminution de synthèse de l'aromatase comme décrit chez des vertébrés. La disparition du signal est donc en faveur d'un marquage spécifique de l'aromatase.

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'augmentation des niveaux de T conjointement à la diminution de ceux d'E2 entraînent une **diminution de reproduction** chez *P. antipodarum*. Ceci est en faveur d'un rôle des stéroïdes dans le contrôle de la reproduction des mollusques.

La **mesure des stéroïdes sexuels** semble être intéressante pour **l'évaluation des effets des EDCs** chez *P. antipodarum*. De nombreux **polluants perturbent les voies de synthèse des stéroïdes**, ce qui fait de *P. antipodarum* une espèce d'intérêt pour l'évaluation de leurs effets.

Mots clés : *Potamopyrgus antipodarum*, stéroïdes, aromatase, reproduction, EDCs

Chemosphere, 2010, 79, 1, 47-53

Author's personal copy

Chemosphere 79 (2010) 47–53

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor

M. Gust [a,b,*], J. Garric [a], L. Giamberini [d], R. Mons [a], K. Abbaci [a], F. Garnier [c], T. Buronfosse [c]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France
[b] AgroParisTech ENGREF, 19 Avenue du Maine, F 75732 Paris, France
[c] Université de Lyon, Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France
[d] Laboratoire des interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux 57000 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 July 2009
Received in revised form 15 January 2010
Accepted 15 January 2010
Available online 12 February 2010

Keywords:
EDC
Potamopyrgus antipodarum
Sex-steroids
Reproduction

ABSTRACT

The freshwater prosobranch *Potamopyrgus antipodarum* (Molluska, Hydrobiidea, Smith 1889) has been proposed as a suitable species to assess the impact of endocrine disrupting compounds (EDC) in aquatic ecosystems. Steroid hormone biosynthesis pathway is potentially an important target for EDC, and vertebrate-like sex steroids seem to play a functional role in the control of mollusk reproduction. To assess the response and the sensitivity of *P. antipodarum* to disrupters of the steroid hormone biosynthesis pathway, we have experienced the action of a specific vertebrate aromatase inhibitor, fadrozole, acting on 17β-estradiol synthesis in two separate 28 and 42 d exposures. Fadrozole had effects consistent with the expected mechanism of action. A decrease of the reproduction parameters (such as on the number of neonates and number of embryos in the brood pouch) in a dose-dependant manner was observed. The steroids levels were also impaired with the ratio 17β-estradiol/testosterone decreased by half in exposed snails. This shift of the steroids balance was accompanied by some alteration in the gonads histology and immunohistochemistry in fadrozole-exposed snails. This study highlights the value role of *P. antipodarum* as a test species for assessing EDC effects in aquatic wildlife.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Potamopyrgus antipodarum is a sensitive test organism, which showed a significant increase in embryo production in both a time- and concentration-dependant manner, when exposed to environmentally relevant concentrations of bisphenol A (BPA) and octylphenol (OP) (Duft et al., 2003). This species displays comparable response and sensitivity when compared to fish (Jobling et al., 2003). *P. antipodarum* is an invasive parthenogenetic ovoviviparous freshwater mudsnail (Winterbourn, 1970) which thrives in running waters from small creeks to steams, lakes and estuaries, on mud and sand, on rocks, gravel and aquatic plants (Winterbourn, 1970). This sensitive test organism has recently been recommended for use in the development of a reproduction test within the OECD guideline program by the "*Ad hoc* Expert Group on Invertebrate Testing" (Matthiessen, 2008).

Vertebrate-like steroids, including 17β-estradiol (*E2*) and testosterone (*T*), have been identified in several mollusks bivalves and gastropods. Their origin (exogenous or endogenous) however remains questionable, although the main steps of their endogenous synthesis have been described (reviewed in Janer and Porte, 2007). Moreover, some temporal variations in their levels have been linked to the reproductive cycle in bivalves (reviewed in Lafont and Mathieu (2007)) and gastropods (Sternberg et al., 2008). It also seems that vitellogenesis is under the control of *E2* (Li et al., 1998; Matsumoto et al., 2003; Osada et al., 2003; Gagne et al., 2005), even though some results are contradictory (Puinean et al., 2006; Matozzo and Marin, 2008). In mollusks, particularly in prosobranch gastropod, estrogen receptors (ER) have been identified (Bannister et al., 2007; Castro et al., 2007; Sternberg et al., 2008). They are orthologues of *Octopus vulgaris* ER which is a strong constitutive transcriptional activator, but does not bind *E2* and is unresponsive to vertebrate steroid hormones (Keay et al., 2006). The biological relevance of steroids are still debated, but these observations support a physiological role of sex steroids in mollusk reproduction. As both vertebrate-like steroids have been identified in *P. antipodarum* (Gust et al., 2009a), and the methodology to measure reproductive effects is well developed, we investigated the effects of an aromatase inhibitor on reproductive performance and steroids levels of this gastropod.

* Corresponding author. Present address: Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3bis quai Chauveau CP 220 69336 Lyon cedex 09, France. Tel.: +33 472208905; fax: +33 478477875.
E-mail addresses: marion.gust@cemagref.fr (M. Gust), jeanne.garric@cemagref.fr (J. Garric), giamb@sciences.univ-metz.fr (L. Giamberini), raphael.mons@cemagref.fr (R. Mons), khedidja.abbaci@cemagref.fr (K. Abbaci), f.garnier@vet-lyon.fr (F. Garnier), thierry.buronfosse@inserm.fr (T. Buronfosse).

0045-6535/$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chemosphere.2010.01.030

Author's personal copy

Indeed Cytochrome P450 aromatase (CYP19) is responsible for the conversion of C19 androgens to C18 estrogens (Le Guellec et al., 1987). As such, aromatase activity is an important modulator of *E*2 concentrations and is critical to the regulation of processes controlled by *E*2. Fadrozole (4-(5,6,7,8-tetrahydroimidazol[1,5a]-pyridin-5-yl) benzonitrile monohydrochloride; CGS 16949A) is a reversible nonsteroidal competitive inhibitor of the aromatase (CYP19) altering steroidogenesis and reproduction in *Pimephales promelas* (Ankley et al., 2002).

The aims of this study were (i) to better understand the endocrinology of the mudsnail *P. antipodarum* and the possible links between sex steroids and reproduction in this species, (ii) to determine if this species is promising for effects assessment of endocrine disrupting compounds (EDC) disrupting vertebrate endocrine pathways.

2. Materials and methods

P. antipodarum were obtained from long term cultures established in our laboratory (Cemagref, Lyon, France). These cultures were initiated with snails that originated from natural populations collected in clean sediment in a canal close to the Rhone river. The snails were kept at 16 ± 1 °C in 20 L in stainless aquaria filled with reconstituted[1] water and fed with Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany).

2.1. Fadrozole-spiked water exposure

Two separate exposures were performed, the first lasted 28 d long and the second 42 d. Adult reproducing snails, with a size (shell height) of 4.3 mm (±0.4) were used at the start of the experiments. In the first exposure, 15 snails were placed in test beakers filled with 0.5 L water one week before the beginning of the test. The beakers were set at 16 ± 1 °C with a 16:8 h light and dark photoperiod. We used a flow through system which consisted of beakers filled with continuously renewed test water (four renewals a day) and a continuous pumping system, of clean water and a fadrozole-spiked solution allowing to obtain, for each tested concentration, the required exposure concentrations after mixing. The stock of the fadrozole-spiked solution (fadrozole was generously provided by Novartis Pharma AG, Switzerland), was renewed every three days and kept at an ambient temperature (18 °C) in darkness. The nominal exposure concentrations included 7.4, 22.2, 66.6 and 200 μg L^{-1} and a control. Six replicates per concentration were prepared. In the second experiment an additional replicate with 30 adults was added in order to count the embryos in the brood pouch on day 28. Specific conductivity, temperature, pH, and dissolved oxygen were monitored daily. Organisms were fed with 0.6 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per working day.

2.2. Biological measurements

The reproductive parameters measured were the same in each exposure. The number of neonates born in each beaker was counted weekly using a binocular microscope. Developmental abnormalities, if observed, were noted. In all experiments, at the end of the exposure periods, five adults per beaker were taken randomly (30 adults per concentration for fadrozole) to count the embryos in their brood pouch, a technique adapted from Duft et al. (2003). Additionally, an intermediary count was performed on day 28 in the 42-d exposure respectively. Thirty adults per concentration were cracked.

[1] Mixture of natural spring water and deionised water.

2.3. Immunohistochemistry

At the end of the 42-day exposure period, six adults per concentration were taken randomly for histological analysis allowing us to perform qualitative analysis. They were fixed for 48 h in Bouin's liquid, then washed and desiccated using baths of increasing alcohol concentrations (starting with 70%). Afterwards, the tissues were embedded in PARAPLAST X-TRA® (Sigma–Aldrich). Longitudinal sections of 4 μm were cut and the paraffin was removed from the sections using histochoice® and butanol (Sigma–Aldrich). Sections were hydrated using baths of alcohol of decreasing concentrations. Endogenous peroxidase activity and nonspecific background staining were blocked by incubating the sections with 3% H_2O_2 and 1% bovine serum albumin (BSA) plus 1% goat serum prepared in Tris–HCl buffer (pH 7.4). Sections were successively incubated with 50-fold diluted rabbit antihuman aromatase P450 as primary antibody and HRP (horseradish peroxidase) conjugated 2000-fold diluted goat anti-rabbit IgG as secondary antibody (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h each at room temperature, with rinsing with Tris–HCl buffer (pH 7.4) between each step. Secondary antibodies alone were used as a control. The HRP was visualized with 0.05% diaminobenzidine (DAB®, Dako, Carpinteria, USA) and the section was counterstained with hematoxylin. For conventional histology, some sections were stained using hemalun–eosin.

2.4. Chemical analysis

2.4.1. Steroid measurements

The levels of total *T* and *E*2, using a radioimmunoassay (RIA) technique adapted from Gooding and Leblanc (2004), were measured at the end of the exposure periods to fadrozole on 20 *P. antipodarum* randomly taken in the beakers (only for the control and the highest concentration in the first experiment, all conditions in the second). The samples were assayed using commercial RIA kits for *E*2 and *T* (Orion Diagnostic, Espoo, Finland), with slight modifications of the manufacturer's protocol for *E*2 assay. For *E*2 measurements, 40 μL 1% BSA were incubated overnight at room temperature before performing competition with the tracer during 1 h at 37 °C. We have previously shown that the mean recoveries of sex steroids from ten spiked snails were between 79% and 113% for *T*, 73% and 118% for *E*2. The limits of quantification were 0.14 pg mL^{-1} for E2 and 0.03 ng mL^{-1} for *T* (Gust et al., 2009b).

2.4.2. Fadrozole measurements

Fadrozole concentrations were determined twice weekly in water from the beakers and from the stock solution during the first experiment. As concentrations were stable, measurements were performed only once weekly in the second experiment. Samples were collected in all vessels of a same concentration, and pooled before measurements. Fadrozole concentrations were measured using high-pressure liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection, a technique adapted from Ankley et al. (2002). Water samples (3 mL) were collected, placed in glass vials, and directly injected as 100 μL aliquots onto a 15-cm Adsorbosphere HS column (Alltech, Deerfield, IL) on a alliance Waters HPLC with diode-array detection at 230 nm. Samples were chromatographed using a gradient program with a mobile phase starting at 60% methanol/40% 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and increasing to 70% methanol/30% buffer. The flow was maintained constant at 1 mL min^{-1}. The external method of quantification was used, with an eight-point standard curve. A water blank and spiked sample were analyzed in conjunction with each set of test samples. Each measurement was made in triplicate. Mean ($n = 5$) recovery of spiked samples was 85 ± 3%, while the agreement among replicates was 97%. The method detection limit was about 3 μg L^{-1}.

Author's personal copy

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Normality distribution and homogeneity of variance of the data were tested. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Dunnett's test for *post hoc* comparisons of groups. When necessary a Kruskal–Wallis test followed by a Mann–Whitney *U*-test were performed.

3. Results

During both experiments, the following exposure conditions remained relatively constant: temperature (16 ± 0.2 °C), pH (7.75 ± 0.09), conductivity (585 ± 19 µS cm^{-1}) and mean percentage of dissolved oxygen above 85%.

3.1. Measured fadrozole water concentrations

Chemical measurements showed fadrozole concentrations relatively close to target values since measured exposure concentrations were 6.2 (±2.3), 19 (±5.9), 54.4 (±5.2), 175.6 (±8) µg L^{-1} for nominal concentrations of respectively 7.4, 22.2, 66.6 and 200 µg L^{-1}.

3.2. Mortality

Whatever the tested concentrations, no notable rates of mortality were observed ($P > 0.05$) as they were lower than 10% in all groups (control and exposed snails).

3.3. Reproduction

As the effects of fadrozole on the mudsnail fecundity were very comparable between the 28 and 42-d exposures, Figures are shown only for the 42-d exposure (Fig. 1). The results of the 28-d exposure are available in supplementary data.

3.3.1. 28-d exposure period experiment

The cumulated number of neonates per living adult after the 28-d exposure period was not affected. The number of shell-less embryos in the brood pouch on day 28 significantly decreased compared to the control at all concentrations in a dose-dependant manner ($P < 0.01$). Indeed, compared to the control, the production of new embryos at the lowest concentration (6.2 µg L^{-1}) was reduced by 46%, and by 57%, 76% and 82% at the other (respectively 19, 54.4 and 175.6 µg L^{-1}). The total number of embryos was also reduced by 23–44% compared to the control in a dose-dependant manner. In all concentrations the relative percentages of unshelled embryos were lower than in the control in a dose-dependant manner, but not significantly except at the highest concentration ($P < 0.05$, Table 1).

3.3.2. 42-day exposure period experiment

The results were similar to those of the 28-d exposure. The cumulated number of neonates per living adult on day 28 was not affected, whereas after 42-d of exposure it decreased in all concentrations compared to the control. The difference was significant ($P < 0.01$) at 6.2 and 54.4 µg L^{-1} (Fig. 1A) on day 42. The exposed snails produced less neonates than the controls by the fifth week of exposure (significant in the two highest concentrations, data not shown). During the last week, the number of neonates in all concentrations decreased, and was significantly different for 6.2, 19 and 175.4 ($P < 0.01$) (Fig. 1B). The number of shell-less embryos and the total number of embryos in the brood pouch on day 28 (Fig. 1C) were significantly reduced compared to the control in

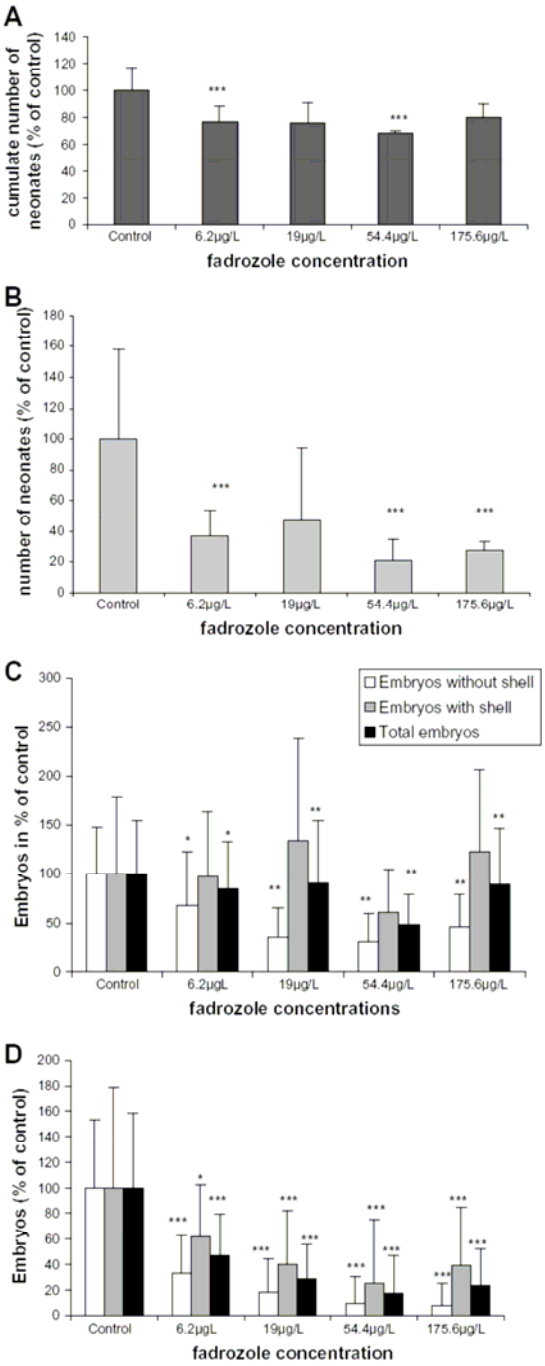


Fig. 1. Reproductive effects of fadrozole on *P. antipodarum* (mean value and standard deviation) as a function of fadrozole measured concentrations (2nd experiment). *indicates a significant difference from the control (* if $P < 0.05$, ** if $P < 0.01$ and *** if $P < 0.001$, Mann–Witney *U*-tests or Dunnett-*t* test). (A) Cumulated number of newborns per adult *P. antipodarum* expressed as the percentage of controls on day 42 B. Neonates expressed as the percentage of controls born during the last week of the experiment. (C) Embryos in the brood pouch expressed as the percentage of controls per adult *P. antipodarum* on day 28. (D) Embryos in the brood pouch expressed as the percentage of controls per adult *P. antipodarum* on day 42.

Author's personal copy

Table 1
Relative percentage of embryos with and without shells in the fadrozole exposure.

Fadrozole nominal concentration (µg L^{-1})	Control	6.2	19	54.4	175.6
Percentage of unshelled and shelled embryos D28 fadrozole 1	57/43	39/61	37/63	35/65	18/82*
Percentage of unshelled and shelled embryos D28 fadrozole 2	44/56	35/65	17/83*	28/72	22/78*
Percentage of unshelled and shelled embryos D42 fadrozole 2	52/48	36/64	33/67	29/71	17/83*

* Indicates a significant difference from the control ($P < 0.01$ Dunnett-t test).

all concentrations tested ($P < 0.01$). The percentage of shell-less embryos compared to the control was quite similar to the first experiment (Table 1). On day 42 the effects on fecundity was enhanced compared to day 28 with a significant decrease ($P < 0.01$) for all embryo types (with and without shells and total). The decrease was dose-dependent. The number of shell-less embryos was lowered by 67–92% in the exposed snails compared to the control-snails; 38–75% for the shelled ones and 53–83% for the total number of embryos (Fig. 1D). Once more, the relative percentages of shell-less embryos in exposed snails were lower than those in the control in a dose-dependant manner (Table 1).

3.3.3. Histology and immunohistochemistry

Histological observations were in accordance with the reproductive effects. The gonadal structure of the 175.6 µg L^{-1} exposed snails was impaired, with degenerative interstitial tissue (Fig. 2C) and several atretic follicles (Fig. 2D) compared to the control where none of these were observed (Fig. 2A and B). The immunoreactivity against CYP19 appeared to be localized in pavimentary cells around the follicles named follicular cells (Fig. 2E and F). In conventional histology their cytoplasm was basophilic and the nuclei eosinophilic (Fig. 2B). Immunostaining of these cells was effective in the control and all concentrations of fadrozole except for the highest one (175.6 µg L^{-1}). In the latter the immunoreactivity disappeared (Fig. 2G).

3.3.4. Steroids

In the first fadrozole exposure, *E2* levels in the control were higher compared to the highest concentration on day 28, whereas *T* levels in the control were lower. The *E2*/*T* ratio was higher in the control than in 175 µg L^{-1} of the fadrozole exposed snails (respectively, 2.42 and 1.13, data not shown). On day 42 of the second experiment, *T* levels were increased in the two highest concentrations of fadrozole (54.4 and 175.6 µg L^{-1}) compared to the control while a slight non concentration-dependent decrease of *E2* levels was observed within the exposed snails (data not shown). The *E2*/*T* ratio decreased by half in the exposed snails compared to the control (Fig. 3).

4. Discussion

This is the first study using a prosobranch mollusk to comprehensively assess the effects of a specific model aromatase inhibitor on both reproductive fitness and associated endocrinology. This study allows us to link mechanism-specific information (aromatase inhibition) to a cascade of events through the endocrine system (reduction in *E2*) and target tissues and to adverse effects in the whole organism (reduced fertility). The responses observed in the present experiment were consistent with expectations based on studies with fishes (Ankley et al., 2002; Fenske and Segner, 2004; Tzchori et al., 2004). The fecundity of the mudsnail greatly decreased in both the short (28 d) and the long (42 d) exposure periods to fadrozole. It was also observed at 6.2 µg L^{-1}, indicating a potential action of fadrozole at lower concentrations, despite the high variability of the reproductive endpoints. A dose-dependent decrease of unshelled embryos was observed only on day 28 during the first exposure and day 42 during the second one. As neonate production was also reduced in the last weeks of exposure we can be fairly sure that the reproductive fitness was affected by this compound. These concordant results point toward the same conclusion: the specific inhibition of the aromatase by fadrozole. However, identification of the aromatase in *P. antipodarum* would be necessary to further support our results.

The levels of *E2* in snails were also reduced in exposed snails compared to control and levels of *T* increased, especially in 54.4 and 175.6 µg L^{-1} of fadrozole-exposed snails. Only the total levels (conjugated and unconjugated) of *E2* were measured, and *E2* exists mainly as an esterified steroid in *P. antipodarum* (Gust et al., 2009b) as in *Marisa cornuaretis*, another prosobranch (Janer et al., 2006). We measured both the free and conjugated fraction of *E2* and only the unconjugated fraction is biologically active and thus potentially decreased by fadrozole. This fraction is the minor one, thus the limited decrease in *E2* levels (from 10% to 50% compared to the control) was due to our measurement method. Indeed, it certainly would have been sharper if only the free fraction of *E2* had been measured. However *T* exists mainly as an unesterified form in the mudsnail (around 80% free, Gust et al., 2009b). As a consequence the ratio *E2*/*T* might be a good way of assessing a shift in the steroid balance. Its decrease in a dose-dependant manner supports a potent effect of fadrozole on the *E2* synthesis pathways in *P. antipodarum*.

Histological observations of the gonads also support the reproductive and endocrine impairment. In the fathead minnow (*P. promelas*), fadrozole shut down spawning by preventing maturation of oocytes (Ankley et al., 2002). In the mudsnail, the decrease in fecundity, the reduced proportion of shell-less embryos without effects on oocyte number observed on histological sections suggest a possible role of fadrozole in early development of *P. antipodarum*. The presence of atretic follicles in histological sections of the 175.6 µg L^{-1} of fadrozole exposed snails also supports this hypothesis. This link between steroid metabolism and *P. antipodarum* fecundity points towards a physiological role of steroids in controlling reproduction.

These effects have been thoroughly described in several aquatic vertebrates and invertebrates. In a short term reproduction assay with *P. promelas*, Ankley et al. (2002) showed a concentration-dependant reduction in fecundity as well as a decrease in plasma *E2* and histological lesions of the ovaries. Injections of fadrozole (1–10 mg kg^{-1}) and decreased plasma *E2* in females coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Afonso et al., 1999). In Japanese medaka (*Oryzias latipes*), fadrozole inhibited aromatase activity (Kuhl and Brouwer, 2006). Due to a great phylogenetic distance between the tested species (fishes and mollusks), as well as the variations in route and timing of exposure, it is difficult to compare our results. However, the effects of fadrozole on steroid concentrations were qualitatively similar, as was the observation of reduced fecundity of fish females exposed to an aromatase inhibitor. The effects were less pronounced in the mudsnail than in fishes, but fadrozole is a drug designed for human use and the binding site of *P. antipodarum*'s aromatase may diverge, diminishing fadrozole's action.

Immunoreactivity associated with the use of an antibody against human CYP19 was observed in clusters of pavimentary cells around the developing follicles. This localization argues for a specific labeling of an immunoreactive-like aromatase in the

Author's personal copy

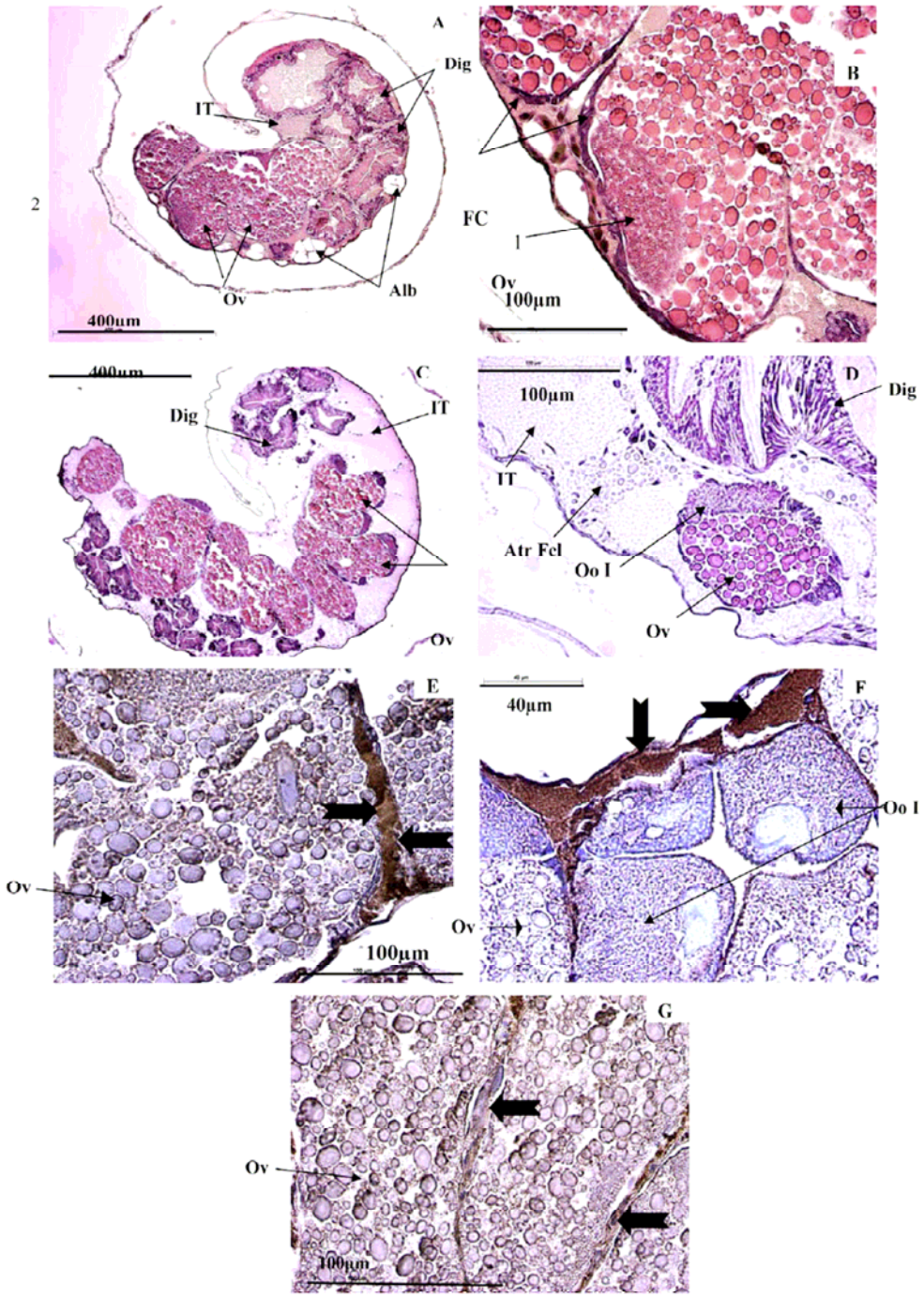


Fig. 2. Histological results in fadrozole exposed snails and immunohistochemical localization of P450 aromatase in *P. antipodarum* gonadal (thickness 4 µm). (A and B) Typical cross sections of *P. antipodarum* controls showing the numerous ovarian follicles. (C and D) Typical cross section of 175.6 µg fadrozole/L exposed *P. antipodarum*. (E) Typical immunostained longitudinal section of *P. antipodarum* controls follicles. Thick arrows indicate follicular cells (immunoreactive cells). (F) Typical immunostained longitudinal section of 6.2 µg fadrozole/L exposed *P. antipodarum*. (G) Typical immunostrained longitudinal section of 175.6 µg fadrozole/L exposed *P. antipodarum* showing no aromatase reactivity. IT: interstitial tissue; dig digestive tube; Ov: ovarian follicle; Alb: albumen gland; FC: follicular cells; Oo I: primary oocytes; Atr Fcl: Atretic follicle.

Author's personal copy

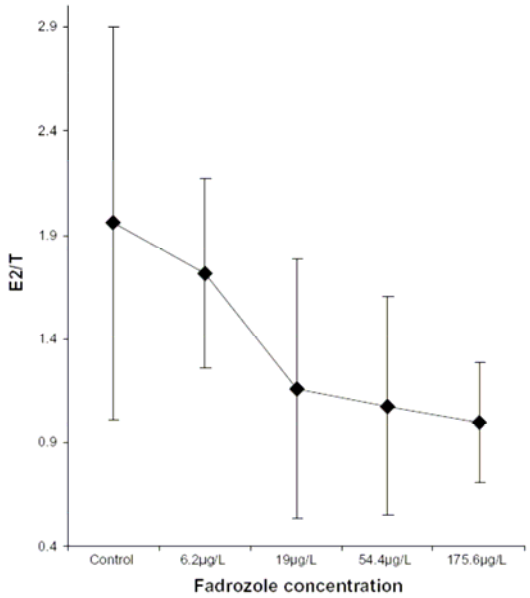


Fig. 3. *E2/T* ratio in *P. antipodarum* on day 42 (mean value and standard deviation) as a function of fadrozole measured concentrations.

mudsnail. This cell specific staining can be compared to previous studies in bivalves. In the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*), immunoreactivities against P450 aromatase have been detected in the cells along the outside of germinal acini in scattered cells of 20 µm with germinal vesicles (Matsumoto et al., 1997). The staining for aromatase disappeared at the highest concentration of fadrozole (175.6 µg L^{-1}) suggesting a down-regulation of the protein. These results are consistent with the observed effects of fadrozole in fishes which decreased or suppressed aromatase expression (Fenske and Segner, 2004; Tzchori et al., 2004; Villeneuve et al., 2006). The action of fadrozole on steroid levels highlights the value of their determination as a routine measurement in EDC screening/testing in snails and the usefulness of RIA techniques for its sensitivity. Indeed the steroid hormone biosynthesis pathway is potentially an important target for EDC (Sanderson, 2006), as with TBT (tributyltin). TBT effects on prosobranch snails are ranked among the best documented examples of the impact of an EDC on aquatic invertebrate reproduction and populations (Matthiessen and Gibbs, 1998). The most striking effect of TBT as a hormonal disrupter is the development of male organs in gastropod females now known as imposex. One of the hypothesis of the mechanism of imposex due to TBT has been attributed to the elevated *T* levels in female gastropods, coming from the inhibition by TBT of the cytochrome P450 aromatase (Spooner et al., 1991; Bettin et al., 1996). These last results (increase of *T*, without a potent decrease of *E2*) are consistent with the present ones obtained in *P. antipodarum*.

Other environmental pollutants are known to impair reproduction and steroid hormone biosynthesis pathways, and several screening studies have already identified some pesticides which impair CYP19 aromatase activity *in vitro* (Sanderson et al., 2002; Laville et al., 2006). Compounds designed to inhibit fungal CYP in agriculture are potent inhibitors of aromatase, raising concerned questions about the toxicity of azoles used in agriculture (Trösken et al., 2004). Further investigation is needed on wildlife exposed to azole fungicides used in agriculture or medicines designed to alter systems involved in steroidogenesis.

5. Conclusion

This study highlights the value role of *P. antipodarum* as a test species for assessing EDC effects in aquatic wildlife providing additional data about the potential role of vertebrate-like sex steroids in mollusks and a better understanding of their endocrinology control. Whether the mechanism of action of these vertebrate-like sex steroids may act differently than known in vertebrate, implications of a related control of reproduction in the mudsnail to vertebrates are high. This species is sensitive to EDC which are known to impair the steroid functions in vertebrates and should be useful in multi-species batteries for the assessment of contaminated aquatic ecosystems. However, more work is needed to assess the variability of the used endpoints.

Acknowledgements

The present work was partly funded by ONEMA. The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon for the financial grant of the RIA analysis. Solange Couturier is gratefully acknowledged for her technical help, Ashley Tilghman for improving the English and Jacques Mouthon for his help in collecting the snails, Célne Guillemain for her help with the NPLC analysis.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2010.01.030.

References

Afonso, L.O.B., Iwama, G.K., Smith, J., Donaldson, E.M., 1999. Effects of the aromatase inhibitor fadrozole on plasma sex steroid secretion and ovulation rate in female coho salmon, Oncorhynchus kisutch, close to final maturation. Gen. Comp. Endocrinol. 113, 221–229.

Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicol. Sci. 67, 121–130.

Bannister, R., Beresford, N., May, D., Routledge, E.J., Jobling, S., Rand-Weaver, M., 2007. Novel estrogen receptor-related transcripts in Marisa cornuarietis: a freshwater snail with reported sensitivity to estrogenic chemicals. Environ. Sci. Technol. 41, 2643–2650.

Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E., 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgolander Meeresuntersuchungen 50, 299–317.

Castro, L.F.C., Melo, C., Guillot, R., Mendes, I., Queiros, S., Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2007. The estrogen receptor of the gastropod Nucella lapillus: modulation following exposure to an estrogenic effluent? Aq. Toxicol. 84, 465–468.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aq. Toxicol. 64, 437–449.

Fenske, M., Segner, H., 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). Aq. Toxicol. 67, 105–126.

Gagne, F., Andre, C., Blaise, C., 2005. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17 beta. Fresenius Environ. Bull. 14, 861–866.

Gooding, M.P., LeBlanc, G.A., 2004. Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). Invert. Biol. 123, 237–243.

Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J., 2009a. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. Environ. Pollut. 157, 423–429.

Gust, M., Vulliet, E., Giroud, B., Garnier, F., Couturier, S., Garric, J., Buronfosse, T., 2009b. Development, Validation and Comparison of LC-MS/MS and RIA Methods for Quantification of Vertebrates-like Sex-steroids in Prosobranch Molluscs, ISTA 14. Metz, France.

Janer, G., Porte, C., 2007. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. Ecotoxicology 16, 145–160.

Janer, G., Lyssimachou, A., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C., 2006. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. Steroids 71, 435–444.

Author's personal copy

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aq. Toxicol. 65, 205–220.

Keay, J., Bridgham, J.T., Thornton, J.W., 2006. The *Octopus vulgaris* estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. Endocrinology 147, 3861–3869.

Kuhl, A.J., Brouwer, M., 2006. Antiestrogens inhibit xenoestrogen-induced brain aromatase activity but do not prevent xenoestrogen-induced feminization in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environ. Health Persp. 114, 500–506.

Lafont, R., Mathieu, M., 2007. Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology 16, 109–130.

Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfray, N., Casellas, C., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. Toxicology 228, 98–108.

Le Guellec, D., Thiard, M.C., Remy-Martin, J.P., Deray, A., Gomot, L., Adessi, G.L., 1987. In vitro metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *Helix aspersa*. Gen. Comp. Endocrinol. 66, 425–433.

Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., Mori, K., 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 beta on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Inver. Rep. Dev. 33, 87–93.

Matozzo, V., Marin, M.G., 2008. Can 17-[beta] estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? Environ. Toxicol. Pharmacol. 26, 38–44.

Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y., Mori, K., 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol. 118, 811–817.

Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Mori, K., Kayano, T., 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Zool. Sci. 20, 37–42.

Matthiessen, P., 2008. An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. Integr. Environ. Asses. Manag. 4, 274–284.

Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Environ. Toxicol. Chem. 17, 37–43.

Osada, M., Takamura, T., Sato, H., Mori, K., 2003. Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 beta and the central nervous system. J. Exp. Zool. Part a – Comp. Exp. Biol. 299A, 172–179.

Puinean, A.M., Labadie, P., Hill, E.M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard, I.P., Rotchell, J.M., 2006. Laboratory exposure to 17[beta]-estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. Aq. Toxicol. 79, 376–383.

Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. Toxicol. Sci. 94, 3–21.

Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 182, 44–54.

Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L.J., 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. Mar. Environ. Res. 32, 37–49.

Sternberg, R.M., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A., 2008. The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. Gen. Comp. Endocrinol. 156, 15–26.

Trösken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Völkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. Endocr. Res. 30, 387–394.

Tzchori, I., Degani, G., Hurvitz, A., Moav, B., 2004. Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*). Gen. Comp. Endocrinol. 138, 271–280.

Villeneuve, D.L., Knoebl, I., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hammermeister, D.E., Greene, K.J., Blake, L.S., Ankley, G.T., 2006. Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aq. Toxicol. 76, 353–368.

Winterbourn, M., 1970. The New Zealand species of *Potamopyrgus* (Gasteropoda: Hydrobiidae). Malacologia 10, 283–321.

2. Antagonisation de la liaison avec les récepteurs nucléaires

Afin d'apporter des informations supplémentaires sur le rôle fonctionnel des stéroïdes, nous avons essayé d'inhiber l'action de la T et l'E2 par des antagonistes de liaison des stéroïdes à leur récepteur théorique. Des molécules modèles, utilisées sur des récepteurs mammifères, ont été choisies. Le fulvestrant est le principe actif d'un médicament humain, utilisé pour le traitement du cancer du sein hormono-dépendant. C'est une molécule extrêmement spécifique qui se lie à l'ER et s'oppose à l'activation du récepteur par l'E2. De son côté la vinclozoline est un pesticide (fongicide) qui présente également des actions anti-androgéniques connues, dont le mécanisme d'action passe par le blocage du récepteur aux androgènes.

a. Récepteur aux œstrogènes (ER) : Fulvestrant

Le fulvestrant (numéro CAS 129453-61-8, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est un anti-ERα couramment utilisé dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant chez la femme. Il est hautement spécifique et ne présente pas d'effets secondaires dus à l'action sur d'autres cibles, contrairement à d'autres molécules plus anciennes comme le tamoxifen. Comme un ERα-like a été mis en évidence chez *P. antipodarum*, comme nos résultats préliminaires en biologie moléculaire et ceux d'autres laboratoires l'indiquent (Stange *et al*., 2009), nous avons voulu inhiber son activation potentielle par l'E2.

Une exposition de 28 jours à 21°C a été réalisée au laboratoire avec des adultes *P. antipodarum* (3,8 ± 0,2 mm). Une seule concentration d'exposition a été utilisée (50 µg/L), avec un témoin solvant (DMSO 0,001%). Les effets de ce composé modèle sur la reproduction (juvéniles nés et embryons dans la poche embryonnaire) ont été évalués.

Le logiciel Statistica version 7.1 a été utilisé pour le traitement statistique des données. La normalité des données a été testée (test d'adéquation du Chi-2, la statistique W de Shapiro-Wilks, le test sur l'asymétrie standardisée et le test sur l'aplatissement standardisé) ainsi que l'égalité des variances (test robuste de comparaison des variances). Lorsque les distributions étaient normales et que les variances étaient homogènes, alors des tests paramétriques ont été effectués (ANOVA un facteur et tests *post-hoc* de Dunnett ou LSD), avec une correction de Bonferroni, si nécessaire. Dans le cas contraire, des tests non paramétriques ont été faits (ANOVA de Kruskal-Wallis par Rangs et Test U de Mann-Whitney). Le traitement des

données a été réalisé de cette façon dans toutes les expérimentations présentées dans ce travail. Il est précisé de manière systématique dans les publications.

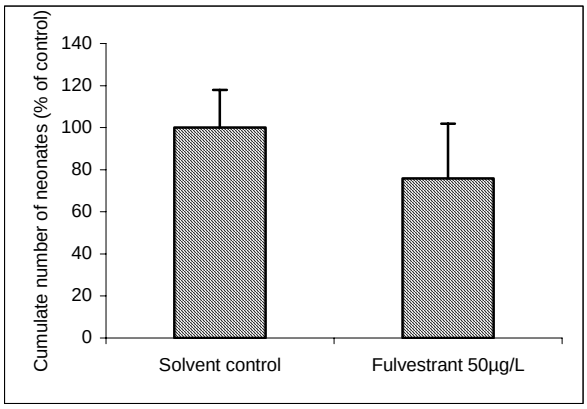


Figure III-2 : Nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum* après 28 jours d'exposition au fulvestrant

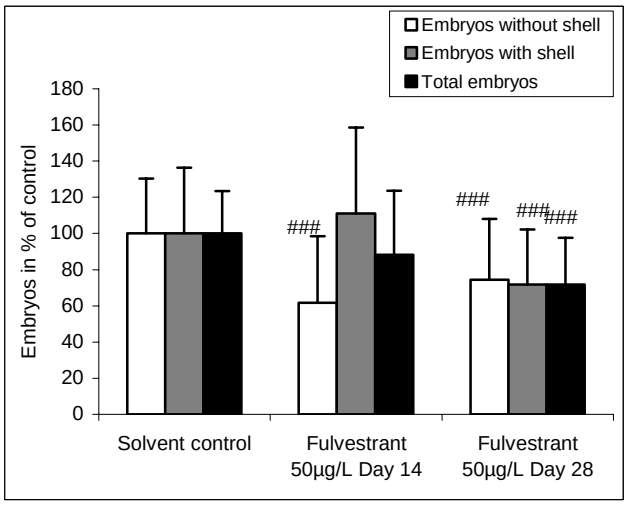


Figure III-3 : Pourcentage d'embryons par adultes *P. antipodarum* par rapport au témoin solvant après 28 jours d'exposition au fulvestrant

Le fulvestrant a provoqué, après 28 jours d'exposition, une diminution du nombre de juvéniles nés uniquement lors de la quatrième semaine (résultats non montrés), mais pas du nombre cumulé de juvéniles nés au cours des 4 semaines (Figure III-2) ainsi qu'une diminution des embryons dans la poche embryonnaire (Figure III-3). Toutes les étapes de la reproduction ont donc été inhibées, mais de manière peu importante (25% d'inhibition environ). Les effets du fulvestrant sur la reproduction de *P. antipodarum* ont donc été moins marqués que ceux qui avaient été observés lors de l'inhibition de synthèse de l'E2 par un anti-aromatase (Gust *et al*., 2010c). L'inhibition de l'action de l'E2 par le blocage de sa synthèse s'est avérée plus efficace que par l'antagonisation de son récepteur.

Cela suggère que s'il existe une liaison biologique de l'E2 à l'ERα-like (ou un autre récepteur) de *P. antipodarum*, et que celle-ci permet l'activation du récepteur, alors, le fulvestrant l'inhibe de partiellement uniquement. Ce raisonnement est valable si ce dernier provoque la diminution de reproduction observée *via* ce mécanisme.

Des résultats similaires ont été rapportés pour d'autres espèces de mollusques chez lesquels un ER-like a été trouvé (Thornton *et al*., 2003; Kajiwara *et al*., 2006; Keay *et al*., 2006; Puinean *et al*., 2006; Bannister *et al*., 2007; Castro *et al*., 2007b; Matsumoto *et al*., 2007). Cependant, seuls Thornton *et al*. (2003) et Keay *et al*. (2006), ont testé l'activité biologique du récepteur en regard de sa liaison avec l'E2 et l'ADN. Ces études n'ont pas

réussi à démontrer une activation de l'ER-like par l'E2. Il semble se comporter comme un récepteur orphelin ou un facteur transcriptionnel constitutif. Néanmoins, son expression est modulée par l'exposition à des effluents œstrogéniques (Castro *et al*., 2007b), même si son rôle reste encore à définir. La faible inhibition de reproduction observée pourrait être due à une affinité moindre du fulvestrant pour l'ER-like de *P. antipodarum* que pour l' ERα vertébré.

D'autres études, réalisées chez des invertébrés, ont utilisé le fulvestrant comme un antagoniste d'hormones (E2…) ou d'EDCs (BPA, OP…) avec succès uniquement chez les espèces chez qui l'E2 est supposé jouer un rôle dans la reproduction : chez les embryons d'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus* et *Lytechinus anamesus*) (Roepke *et al*., 2005), et chez *M. cornuaretis* (Oehlmann *et al*., 2006). En revanche, le fulvestrant n'a eu aucune action sur le développement et la reproduction d'un crustacé, *D. magna* (Kashian et Dodson 2004).

D'autres hypothèses pourraient expliquer les résultats obtenus. Le fulvestrant est un composé fortement hydrophobe. Il pourrait s'être adsorbé sur les tubulures d'exposition, et la concentration réelle d'exposition pourrait être bien inférieure à la concentration théorique de 50µg/L. Nous n'avons pas pu doser le fulvestrant lors de l'exposition. En conséquence, il n'est pas exclu que la concentration interne efficace ne soit pas atteinte chez *P. antipodarum*.

Ainsi, cette expérimentation présente de nombreuses incertitudes. Les effets observés sont moins marqués que ceux attendus au regard de nos précédentes expositions, et il existe de nombreuses hypothèses pouvant l'expliquer. Il faut aussi rappeler que des agonistes supposés de l'ER ont été décrits comme induisant la reproduction chez *P. antipodarum*, comme l'EE2, le BPA, l'OP, le NP (Duft *et al*., 2003b; Jobling *et al*., 2003). Il reste donc envisageable que ces composés aient effectivement induits la reproduction par l'intermédiaire d'une interaction avec un ER-like chez *P. antipodarum*.

b. Récepteurs aux androgènes (AR) : Vinclozoline

De la même manière que précédemment, puisqu'il existe de la T, l'existence d'un récepteur approprié est envisageable. La vinclozoline est un fongicide dicarboximide qui est utilisé en Europe et aux Etats-Unis sur les fruits, les légumes et les plantes ornementales. Il est dégradé dans le sol, les plantes et les organismes en deux métabolites majeurs : M1 (2-{[(3,5-dichlorophenyl)-carbamoyl] oxy}-2-methyl-3-butenoic acide) et M2 (3,5-dichloro-2-hydroxy-2-methylbut-3-enanilide).

C'est un antagoniste faible de l'AR chez les mammifères, mais ses deux métabolites sont plus efficaces (Kelce *et al*., 1994). Ils présentent une forte affinité pour l'AR et peuvent

bloquer l'expression de gènes dédiés, responsables d'une action anti-androgène (Wong *et al*., 1995). Les AR de poissons présentent une forte affinité pour les deux métabolites majeurs (Sperry et Thomas 1999). Lorsqu'ils sont présents à de fortes concentrations, ils deviennent des agonistes de l'AR chez les mammifères (Wong *et al*., 1995).

Ce fongicide est retrouvé dans l'environnement. Il est occasionnellement dosé dans les eaux de surface en France entre 0.1 et 0.05 µg/L (Legrand *et al*., 1991), et dans les rivières du Sud de l'Europe, à des concentrations aux alentours du ng/L (Readman *et al*., 1997).

Une exposition de 42 jours à 16°C a été réalisée au laboratoire avec des adultes de *P. antipodarum* (4,3 ± 0,2 mm) et de *V. piscinalis* (4,0 ± 0,2 mm). Quatre concentrations d'exposition (7.4, 22.2, 66.6 et 200 µg/L) et un contrôle ont été utilisés. Les deux organismes ont été mélangés dans les béchers. Il y avait 12 réplicats pour les témoins et 8 pour les exposés, chacun contenant 15 *P. antipodarum* et 10 *V. piscinalis*. Les effets de ce composé modèle sur la reproduction (juvéniles nés, embryons dans la poche embryonnaire, nombre d'œufs par masse) ont été évalués. Le comptage des juvéniles et des masses a été effectué toutes les semaines, et le craquage après 4 et 6 semaines d'exposition sur 30 individus.

Des dosages de la vinclozoline ont été réalisés hebdomadairement (Tableau III-2) en HPLC diode array après adaptation de la méthode publiée par Makynen *et al*. (2000).

Concentrations nominales (µg/L)	Témoin	7,4	22,2	66,6	200
Concentrations mesurées (µg/L)	ND	ND	4,8 ± 1,0	18,9 ± 9,4	52,7 ± 18,9

Tableau III-2 : Concentrations mesurées de vinclozoline ± écart-type (ND: non déterminé)

Les concentrations mesurées de vinclozoline dans l'eau, étaient bien inférieures aux concentrations nominales. Cela peut s'expliquer par son hydrolyse rapide (1-3 jours) dans l'eau. Ses métabolites ont, eux, une demi-vie supérieure dans l'eau (180 jours, EPA). Ils n'ont cependant pas été dosés lors de l'exposition.

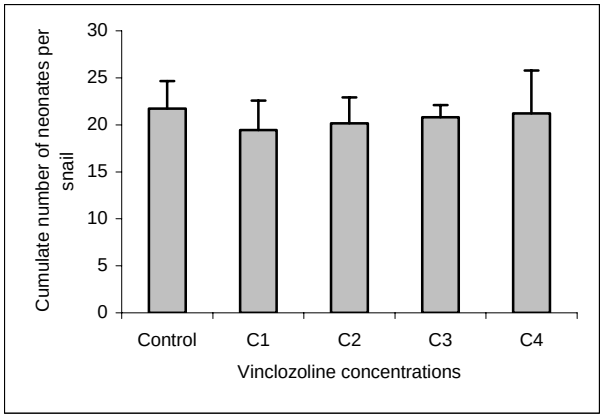


Figure III-4 : Nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum* après 42 jours d'exposition à la vinclozoline

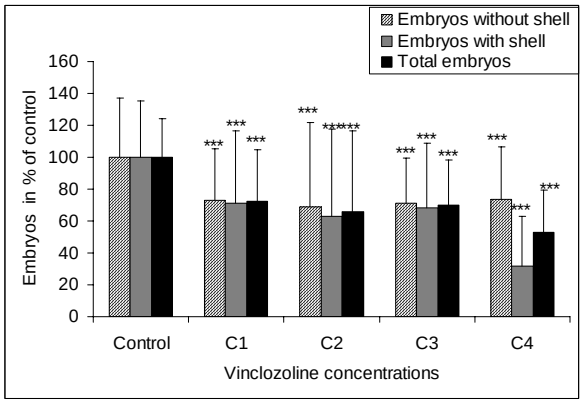


Figure III-5 : Nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum* après 42 jours d'exposition à la vinclozoline

Après 42 jours d'exposition, aucun effet n'a été observé sur le nombre cumulé de juvéniles par adultes *P. antipodarum*, quelque soit la concentration d'exposition (Figure III-4). En revanche, une diminution significative des embryons par individu a été observée, pour toutes les concentrations d'exposition après 6 semaines d'exposition (Figure III-5), alors q'aucun effet n'avait été observé après 4 semaines d'exposition (résultats non montrés). Une diminution des juvéniles nés la dernière semaine d'exposition chez les individus exposés aurait due être observée étant donné la température d'exposition (Publication n°2).

Cette diminution de reproduction a été équivalente pour toutes les concentrations (environ 25% pour les embryons non coquillés) mais non dose-dépendante. De manière intéressante, l'exposition à la plus faible concentration d'exposition, que nous n'avions pas été en mesure de doser, a présenté des effets équivalents à ceux observés aux autres concentrations. Cette observation est également en faveur d'une hydrolyse rapide de la vinclozoline en ses métabolites.

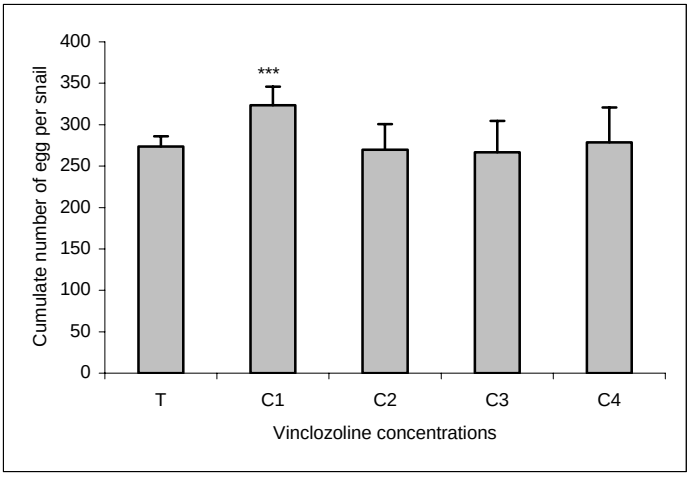


Figure III-6 : Nombre cumulé d'œufs par adultes *V. piscinalis* après 42 jours d'exposition à la vinclozoline

Après 42 jours d'exposition, le nombre cumulé d'œufs pas adultes *V. piscinalis* était significativement plus important pour la plus faible concentration d'exposition que chez les témoins (Figure III-6). Il est possible que nous observions un effet d'hormesis, qui est une réponse adaptative caractérisée par une courbe concentration/effet biphasique. A de faibles niveaux de stress, la « fitness » est augmentée. L'implication écologique d'un tel phénomène est encore méconnue (Calabrese et Baldwin 2002). Comme chez *P. antipodarum*, il est intéressant de noter qu'un effet a été observé dans la plus faible concentration d'exposition alors qu'aucune vinclozoline n'a pu être dosée à cette concentration.

Dans la mesure où *P. antipodarum* est parthénogénétique et qu'il n'existe presque que des femelles, il est assez étonnant qu'un antagoniste supposé de l'AR puisse engendrer, de façon spécifique, des diminutions de reproduction. Nos résultats ne sont pas en faveur d'un mode d'action de la vinclozoline impliquant un équivalent AR. En revanche, chez *V. piscinalis* qui est hermaphrodite, les effets observés diffèrent. Il faut aussi rappeler qu'aucun AR n'a pu être identifié chez les gastéropodes (Sternberg *et al*., 2008a). Cependant, des effets sur la reproduction, de la vinclozoline, ont été décrits chez d'autres gastéropodes gonochoriques, et sont eux aussi, très différents de ceux que nous avons observés sur nos espèces hermaphrodites et parthénogénétiques.

Des juvéniles de *M. cornuarietis* et des adultes de *N. lapillus* ont été exposés pendant 5 mois à 0,03-1 µg/L de vinclozoline. Chez *M. cornuarietis* aucun effet n'a été observé chez les femelles. Pendant les 3 premiers mois d'expérience, , un retard à la maturité sexuelle a été noté chez les mâles associé à une réduction significative de la longueur du pénis et des organes sexuels accessoires (0,03 et 0,1 µg/L). Ces effets n'apparaissant que chez des

individus immatures sexuellement et sont réversibles à la puberté. Chez *N. lapillus*, les mâles adultes présentent une réduction des organes sexuels (pénis, prostate) et un avancement de la phase de repos sexuel (moins de mâles avec du sperme mature dans la vésicule séminale). Il semble donc que ce composé ait des effets chez les Gastéropodes, mais principalement chez les mâles (Tillmann *et al*., 2001).

Ainsi, la vinclozoline semble avoir des effets différents suivant le mode de reproduction du Gastéropode testé. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas très concluants du fait de l'absence de réponse dose-dépendante. Il est donc difficile d'apporter une conclusion concernant l'action d'antagonistes de l'AR potentiels chez *P. antipodarum* ou *V. piscinalis*.

C / VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DES STEROIDES

La dernière étape de notre démarche concernant le rôle des stéroïdes sexuels de type vertébrés passe par la mise en relation des niveaux d'E2 et T avec le cycle reproductif d'une population naturelle de *P. antipodarum*. Cette partie fait référence au suivi annuel d'une telle population dont les résultats sont présentés dans la publication n°1.

Pour rappel, cette étude nous a permis de montrer que les concentrations d'E2 et de T variaient au cours du cycle reproductif, avec des niveaux d'E2 globalement plus élevés en période reproductive et bas en période de repos (Figure 4, Publication 1). Nos résultats montrent une variation physiologique des stéroïdes mesurés, et laissent penser que l'**E2** serait lié à la **fécondité** et la **T** au **déclenchement de la ponte**. Ces éléments ne sont pas une réelle « preuve » de l'implication des stéroïdes dans le contrôle de la reproduction des mollusques, mais, avec ceux présentés auparavant dans ce chapitre, ils sont en faveur de cette dépendance.

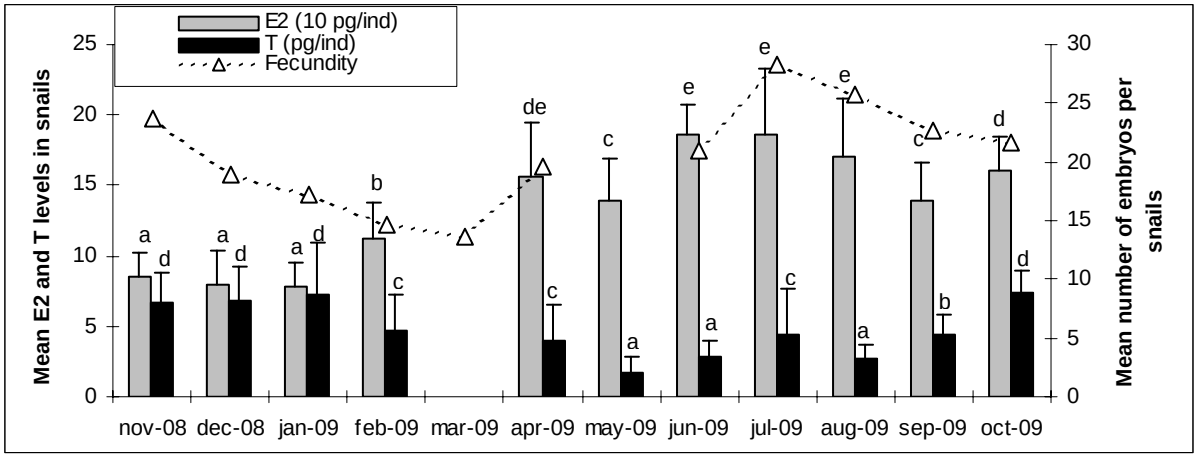


Figure 4, Publication 1 : 17β-œstradiol (E2, 10pg/snail) and testosterone (T, pg/snail) levels (mean values and standard deviation) in *P. antipodarum* jointly with fecundity of snails of the same length over the year (a<b<c<d; *P*<0.001, LSD test).

Nous avons montré la **présence** de stéroïdes sexuels de types vertébrés chez *P. antipodarum*.

Une **méthode de dosage** de la T et de l'E2 fiable, relativement simple et adaptée à la taille de nos organismes a été développée en **RIA**.

Les éléments en faveur du rôle des stéroïdes dans la reproduction chez *P. antipodarum* sont :

- L'**inhibition de l'aromatase** et la chute coinjointe de la **reproduction**, qui suggèrent une synthèse endogène ;
- Les variations physiologiques des taux d'E2 et T en relation avec le **cycle annuel** de reproduction.

En revanche, les expositions à des antagonistes modèles des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes n'ont pas été concluantes.

La mesure des stéroïdes sexuels semble donc intéressante dans le cas de polluants ayant une **action délétère sur la stéroïdogenèse**, ce qui confirme *P. antipodarum* comme une **espèce prometteuse** pour l'évaluation des effets des EDCs ayant une action de ce type.

CHAPITRE 4 :

APPLICATION DES MARQUEURS AU LABORATOIRE A UNE MOLECULE REPROTOXIQUE : LA FLUOXETINE

Les expériences de laboratoire présentées dans les chapitres précédents ont été réalisées avec des molécules « modèles », dont le mode d'action supposé ou connu était en relation directe avec les marqueurs développés, afin de moduler leur réponse en lien avec des effets biologiques, pour confronter la pertinence des marqueurs choisis dans la problématique étudiée. Nous avons, par exemple, utilisé le fadrozole, un inhibiteur de l'aromatase, pour moduler la synthèse des stéroïdes (Gust *et al*., 2010c).

Le but de ce chapitre est de confronter les marqueurs développés et les espèces modèles à un polluant d'intérêt en écotoxicologie, ayant une action reprotoxique, mais dont le mode d'action n'est pas en lien direct avec les marqueurs développés. Les méthodes de suivi de la reproduction décrites dans le Chapitre 2 et les marqueurs associés ont alors utilisés afin de préciser les modalités de l'action reprotoxique de ce polluant.

Le composé reprotoxique choisi a été la fluoxétine, une molécule connue pour ses effets sur la reproduction des bivalves à de faibles concentrations (Fong 1998; Fong *et al*., 2003). La fluoxétine est le principe actif d'un médicament ciblant le système **neuroendocrinien**, par l'intermédiaire des récepteurs à la sérotonine. Ses effets reprotoxiques avaient été évalués sur de nombreuses espèces aquatiques non cibles, mais rarement sur des gastéropodes, malgré leur importance écologique, et leur pertinence comme modèles d'étude en écotoxicologie. Ainsi, dans une démarche d'évaluation de risque, l'exposition de *V. piscinalis* et *P. antipodarum* présentait une innovation. Elle a permis de mettre en évidence des différences interspécifiques de sensibilité chez deux espèces proches.

Les objectifs de ce chapitre sont de comparer les **sensibilités respectives** de *P. antipodarum* et *V. piscinalis* à la fluoxétine, et d'avancer des pistes quant aux **modalités de son action reprotoxique** à l'aide des marqueurs développées, aussi bien au niveau biochimique et individuel.

A / LE CHOIX DE LA FLUOXETINE

De nombreux produits pharmaceutiques, dont la fluoxétine, ont été retrouvés récemment dans les eaux de surface ou les effluents de stations d'épuration (Ternes 1998; Kolpin *et al*., 2002). La fluoxétine (Figure IV-1) est le principe actif du **Prozac**®, anti-dépresseur très largement utilisé, comme traitement de la dépression, mais également des comportements compulsifs, et des troubles du comportement alimentaire ou de la personnalité. C'est un **inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine** (SSRI en anglais).

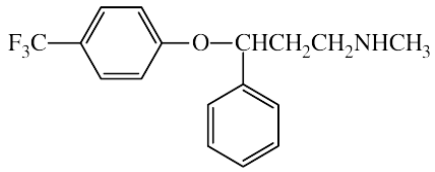


Figure IV-1 : Structure chimique de la fluoxétine

C'est une substance d'intérêt dans la problématique des perturbateurs endocriniens dans la mesure où elle est susceptible d'avoir des effets neurohormonaux proches de substances environnementales « œstrogene-like » à des concentrations très faibles (Fong 1998; Fong *et al*., 2003). De plus, la sérotonine est impliquée dans le système immunitaire et les interactions neuro-immunes (Mossner et Lesch 1998), et dans la prise alimentaire (Meguid *et al*., 2000).

1. Sérotonine et reproduction

Chez certains poissons, la sérotonine (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) stimule la sécrétion de gonadotropine, donc la synthèse de stéroïdes sexuels et contrôle le développement de l'oogenèse, notamment la vitellogenèse (Arcand-Hoy et Benson, 2001, cités par Brooks *et al*., 2003a).

Chez les crustacés (*Uca pugilator* et *Procambarus clarkii*), la sérotonine stimule le développement des ovaires (Kulkarni et Fingerman 1992; Kulkarni *et al*., 1992) et des testicules (Sarojini *et al*., 1993) de manière dose dépendante.

Chez les bivalves, plusieurs événements reproductifs sont régulés par la sérotonine. Chez *Spisula solidissima* et *sachalinensis*, elle induit la **maturation oocytaire** (rupture des vésicules germinales) et la **ponte,** à des concentrations de l'ordre du millimolaire (Hirai *et al*., 1988). La ponte est également induite chez la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), aussi bien par application externe, que par injection (Ram *et al*., 1993). Chez *Mactra chinensis*, la sérotonine induit la ponte, mais pas la maturation oocytaire (Fong *et al*., 1996a). La

parturition de *Sphaerium* spp. est induite par la sérotonine à des concentrations de l'ordre du millimolaire (Fong *et al*., 1996b). Chez *Ruditapes philippinarum* la sérotonine induit la rupture des vésicules germinales et la libération du calcium intracellulaire (Fong *et al*., 1997).

Chez les gastéropodes, des injections ou des applications externes de sérotonine induisent la **métamorphose de larves** (*Ilyanassa obsoleta*) (Couper et Leise 1996). Le comportement rotatoire des embryons de *Physa elliptica* est induit par la sérotonine. La 5-HT induit une rotation significative dose-dépendante de 10^{-6} à 10^{-4} M (Uhler *et al*., 2000). Le dépôt des œufs de *Biomphalaria glabrata* est augmenté par la sérotonine (Muschamp et Fong 2001).

2. Pharmacocinétique de la fluoxétine chez l'homme

La fluoxétine est un mélange racémique de deux énantiomères lipophiles, qui ne sont pas aussi actifs l'un que l'autre. Chez l'homme, elle est métabolisée par des cytochromes P450 en un métabolite actif, la **norfluoxétine** (aussi sous forme de deux énantiomères). La concentration sanguine du métabolite excède celle de la fluoxétine chez l'homme. Après administration orale, la fluoxétine est absorbée à près de 90%. Elle a un volume de distribution large, et s'accumule dans les tissus. La demi-vie est longue (1 à 4 jours pour la fluoxétine, 7 à 15 jours pour la norfluoxétine). La cinétique du composé n'est pas linéaire. L'excrétion urinaire ne concerne que moins de 10% du composé parental sous forme inchangée (Hiemke et Hartter 2000). Toutefois, la métabolisation de la fluoxétine peut différer avec les espèces, puisque, chez les poissons, la norfluoxétine n'est pas le métabolite majoritaire (Smith *et al*., 2010).

La bioaccumulation de la fluoxétine et la norfluoxétine ont été évaluées chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis* pour mieux comprendre l'origine de leur différence de sensibilité.

3. Présence dans l'environnement

Aucune information n'est disponible concernant la norfluoxétine dans l'environnement, par contre, la fluoxétine a été retrouvée à plusieurs reprises dans des effluents municipaux ou des cours d'eau (tableau 1). Dans leur étude de 2002, au Canada, Metcalfe *et al*. (2003b), n'ont pas retrouvé de norfluoxétine, aussi bien dans les effluents que dans les eaux de surface. Des études complémentaires doivent permettre de déterminer si cela s'explique par la présence du composé sous forme conjuguée.

Dans les **eaux de surface**, les concentrations maximales de fluoxétine sont estimées en Amérique du Nord à **0,012 µg/L** (Kolpin *et al*., 2002) et à **0,046 µg/L** (Metcalfe *et al*., 2003b). Dans les **effluents** les concentrations sont plus élevées et peuvent atteindre, suivant les études, **0,540 µg/L** (Weston cité par Brooks *et al*., 2003a) ou **0,099 µg/L** au maximum au Canada (Metcalfe *et al*., 2003b). Cependant, l'intensité, la durée et la fréquence de l'exposition à ce médicament n'ont pas été explorées. Aucune étude n'a eu pour objet la recherche de la fluoxétine dans les sédiments. Ce manque d'informations fiables est préjudiciable à l'évaluation du risque relatif à la présence de ce produit pharmaceutique dans l'environnement (Brooks *et al*., 2003a).

Il est à noter que, dans une étude ayant duré 6 mois dans des canaux de la Nouvelle Orléans, la fluoxétine n'a pas été retrouvée, alors que le naproxen, le bisphénol A, le triclosan ou l'ibuprofen l'ont été (Boyd *et al*., 2004).

La fluoxétine est le SSRI le plus **persistant** dans l'environnement. Les traitements de stations d'épuration éliminent en moyenne 22,58% de la quantité initiale du médicament. La fluoxétine s'adsorbe sur les **sédiments** (log Koc de 4,7 à 5,3). Ces derniers sont un réservoir potentiel pour le compartiment aquatique (Johnson *et al*., 2005). L'impact potentiel de la molécule sur l'environnement aquatique serait diminué par cette distribution au sein du sédiment. Cette molécule ne semble pas sensible à la photodégradation, l'hydrolyse et la dégradation microbienne (Kwon et Armbrust 2006). D'autres auteurs rapportent une photodégradation en phase aqueuse (Lam *et al*., 2005).

4. Effets sur les organismes non cibles

L'exposition à la fluoxétine peut concerner aussi bien les organismes benthiques en se fixant aux sédiments, que les organismes pélagiques (Brooks *et al*., 2003a). Dans la littérature scientifique, des études sur la survie, la croissance, la reproduction et le comportement sont disponibles.

a. Effet sur la survie

Les sensibilités entre les espèce, sont assez variables (Tableau IV-1). Des différences de protocole expérimental pourraient expliquer les écarts observés, notamment chez *D. magna*.

Espèce	CL_{50}	Milieu	Référence
Ceriodaphnia dubia	234 µg/L (48h) 510 µg/L (48h)	Eau	(Brooks *et al*., 2003b) (Henry *et al*., 2004)
Daphnia magna	820 µg/L (48h) 6,4 mg/L (48h)	Eau	(Brooks *et al*., 2003b) (Christensen *et al*., 2007)
Chironomus tentans	15,2 mg/kg (10j)	Sédiment	(Brooks *et al*., 2003b)
Hyalella azteca	ND	Sédiment	(Brooks *et al*., 2003b)
Pimephales promelas	705 µg/L (48h)	Eau	(Brooks *et al*., 2003b)
Oryzias latipes	ND	Eau	(Brooks *et al*., 2003b)

Tableau IV-1 : Effet de la fluoxétine sur la survie des espèces non cible (ND: non déterminée)

b. Effet sur la croissance

Chez de nombreuses espèces, la fluoxétine induit une diminution de croissance (Tableau IV-2). *P. subcapitata* est l'espèce la plus sensible, montrant la grande sensibilité des **végétaux** à la fluoxétine.

Espèce	Effet	Concentration
D. magna	Diminution de croissance	300 µg/L (Pery *et al*., 2008)
Chironomus riparus	Diminution de croissance	666 mg/kg (Pery *et al*., 2008)
C. tentans	Diminution de croissance	1,3 mg/kg (Brooks *et al*., 2003b)
H. azteca	Diminution de croissance	5,6 mg/kg (Brooks *et al*., 2003b)
Pseudokirchneriella. subcapitata	Diminution de croissance CE_{50} CE_{50}	13,6 µg/L (Brooks *et al*., 2003b) 24 µg/L (120h) (Brooks *et al*., 2003b) 27 µg/L (48h) (Christensen *et al*., 2007)

Tableau IV-2 : Effet de la fluoxétine sur la croissance des espèces non cible

c. Effets sur la reproduction

Les effets de la fluoxétine sur les organismes non cibles sont variés, et parfois contradictoires suivant les auteurs y compris chez la même espèce (Tableau IV-3).

Espèce		Effet	Concentration
Mollusques	***Potamopyrgus antipodarum***	**Diminution** de la reproduction **Induction** de la reproduction	11 µg/L (Nentwig 2007),100 µg/L (Pery *et al*., 2008; Gust *et al*., 2009) 3.7 µg/L (Gust *et al*., 2009)
	Biomphalaria glabrata	Inversion de préputium	3,45 mg/L (Fong *et al*., 2005)
	Ilyanassa obsoleta	Métamorphose des larves	345 µg/L (Couper et Leise 1996)
	Physa elliptica	Induction de la rotation des embryons Diminution de la rotation des embryons	<34,5 µg/L >34,5 µg/L (Uhler *et al*., 2000)
	Dreissena polymorpha	Induction de l'émission de gamètes	1,7 mg/L (femelles) et 17 µg/L (mâles) (Fong 1998)
	***Sphaerium* spp.**	Potentialise la parturition	1,7 mg/L (Fong *et al*., 1998)
Crustacés	***C. dubia***	**Augmentation** non significative du nombre de jeunes **Diminution** du nombre de jeunes	56 µg/L (Brooks *et al*., 2003b) 112 µg/L (Brooks *et al*., 2003b) 447 µg/L (Henry *et al*., 2004)
	D. magna	**Stimulation** de la reproduction **Diminution** de la reproduction Diminution de la fitness de F1	36 µg/L (Flaherty et Dodson 2005) 300 µg/L (Pery *et al*., 2008) 30 µg/L (Pery *et al*., 2008)
	H. azteca	**Stimulation** de la reproduction non significative	(Brooks *et al*., 2003b)
	Uca pugilator	Induction du développement des ovaires et des testicules	43,2 µg/L (Kulkarni et Fingerman 1992; Sarojini *et al*., 1993)
	Procambarus clarkii	Induction du développement des ovaires	15 µg/g de poids corporel (Kulkarni *et al*., 1992)
Oligochète	***Lumbriculus variegtus***	**Augmentation** de la reproduction	0,94 mg/kg de sédiment (Nentwig 2007)
	C. riparus	Aucun effet Diminution de la reproduction	(Nentwig 2007) 666 mg/kg (Pery *et al*., 2008)
Vertébré	***O. latipes***	Aucun effet sur la	0,1 à 0,5 µg/L (Foran *et*

		reproduction Augmentation du **taux plasmatique d'œstradiol**	*al*., 2004)

Tableau IV-3 : Effet de la fluoxétine sur la reproduction des espèces non cibles

B / SENSIBILITE RELATIVE DE P. ANTIPODARUM ET V. PISCINALIS A LA FLUOXETINE

Afin de comparer la sensibilité respective de *V. piscinalis* et *P. antipodarum* à un composé reprotoxique, une exposition à la fluoxétine a été réalisée.

La détermination des effets de la fluoxétine sur différents traits de vie des deux organismes modèles (fertilité, fécondité, âge et taille à la première reproduction de la deuxième génération) et sur des marqueurs sub-individuels (histologie des gonades, concentrations de stéroïdes) a permis de mieux appréhender les modalités de reprotoxicité de ce médicament chez les gastéropodes.

Ce travail a permis la publication d'un article (Publication n°5) et la participation à deux autres, sur l'effet de la fluoxétine sur les cycles de vie de plusieurs invertébrés (Publication n°6) et sur son évaluation de risque environnemental (Publication n°7).

Publication n°5 :

Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*.

M. Gust, T. Buronfosse, L. Giamberini, M. Ramil, R. Mons, J. Garric

La **fluoxétine** est le principe actif du Prozac®, anti-dépresseur très largement utilisé et fréquemment retrouvé dans les eaux de surface. C'est un **perturbateur endocrinien potentiel** chez les mollusques du fait de son mode d'action (inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine). La sensibilité des deux espèces testées est très différente. La reproduction de *V. piscinalis* n'a pas été affectée par l'exposition, jusqu'à des concentrations mesurées de 69 µ/L. En revanche, *P. antipodarum* a présenté une courbe dose réponse biphasique avec une induction de reproduction aux faibles concentrations et une diminution aux fortes. Le nombre cumulé de juvéniles nés, ainsi que les embryons dans la poche embryonnaire ont été affectés, à partir de concentrations mesurées de 1 µg/L. Les effets histologiques étaient en accord avec les observations sur la reproduction. En revanche, les variations des titres de stéroïdes sexuels n'ont pas pu être liées aux effets reproducteurs. De manière très intéressante, la seconde génération a été affectée par l'exposition des parents chez *P. antipodarum* uniquement. La croissance de la génération F1 a été plus importante chez les juvéniles issus de parents exposés, ainsi que leur taille à la première reproduction.

Il est vraisemblable que les **différences de sensibilité** entre les deux espèces, ainsi que les effets sur la génération F1 s'expliquent par une expression de récepteurs à la sérotonine (nombre et localisation) lors des phases embryonnaires et adultes différentes chez les deux espèces. D'autres hypothèses peuvent être avancées, comme des capacités métaboliques différentes ou des modes de reproduction plus ou moins sensibles. Nos résultats indiquent que la fluoxétine **bloque le développement embryonnaire précoce** chez *P. antipodarum*.

Mots-clés : Fluoxétine, reproduction, *P. antipodarum*, *V. piscinalis*

Environmental Pollution, 2009, 157, 2, 423-429

Author's personal copy

Environmental Pollution 157 (2009) 423–429

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*

M. Gust [a,*], T. Buronfosse [b], L. Giamberini [c], M. Ramil [d], R. Mons [a], J. Garric [a]

[a] Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, 3b quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France
[b] Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France
[c] Laboratoire des interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, campus Bridoux, 57000 Metz, France
[d] Federal Institute of Hydrology (BFG), D-56068 Koblenz, Am Mainzer Tor 1, Germany

Fluoxetine has significant effects on the reproduction and development of some freshwater snails.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 June 2008
Received in revised form 5 September 2008
Accepted 17 September 2008

Keywords:
Fluoxetine
Freshwater snail
Valvata piscinalis
Potamopyrgus antipodarum

ABSTRACT

Fluoxetine is a widely used antidepressant, frequently found in aquatic ecosystems. We investigated its effects on two freshwater prosobranch gastropods: *Valvata piscinalis* (European valve snail) and *Potamopyrgus antipodarum* (New Zealand mudsnail), which have different reproductive modes. The fecundity of *V. piscinalis* (cumulate number of eggs at day 42) was not affected with an NOEC of 100 μg/L nominal concentration (69 μg/L measured concentration). The mudsnail *P. antipodarum* responded in a biphasic dose–effect curve at low concentrations. The cumulate number of neonates at day 42 had an LOEC of 100 μg/L (69 μg/L) and an NOEC of 33.3 μg/L (13 μg/L), whereas the embryos in the brood pouch at day 42 only showed an LOEC of 3.7 μg/L (1 μg/L). We also observed histological effects in *P. antipodarum* (gonadal thickness). Among the sexual steroids we measured only testosterone which varied, independent of reproduction. Moreover the use of two closely related species highlights the interspecific variability.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fluoxetine is a widely used antidepressant frequently found in waste water treatment plant (WWTP) effluent and in aquatic ecosystems at concentrations below μg/L. The maximum concentrations in surface waters were observed at 0.012 μg/L and 0.046 μg/L in the United States (Kolpin et al., 2002) and in Canada (Metcalfe et al., 2003), respectively. Concentrations in effluents range from 0.099 μg/L (Metcalfe et al., 2003) to 0.540 μg/L (Weston in Brooks et al., 2003a).

Known for its biological activity in invertebrate species, fluoxetine (Brooks et al., 2003a; Henry et al., 2004; Nentwig, 2007; Pery et al., 2008), which acts as a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), was selected as a pharmaceutical model to be environmentally assessed in the framework of the European Union (EU) Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPham) project. Biological effects of fluoxetine were tested on a battery of test organisms, including gastropods. Despite their ecological relevance, mollusks (e.g. gastropods, …) have unfortunately seldom been used as test species (Rittschof and McClellan-Green, 2005). Snails, for example, are very sensitive organisms when exposed to estrogenic compounds (Matthiessen and Gibbs, 1998), and sex steroids are likely to play a role in controlling bivalve reproduction (Croll and Wang, 2007), which is in favor of some similarities between vertebrates and mollusks hormonal systems. Thus, this makes them particularly qualified and promising test organisms for identifying endocrine disrupting chemicals (Janer and Porte, 2007).

Serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) has many different functions in invertebrates and particularly in mollusks. It regulates a wide range of behaviors, such as heartbeat rhythm, feeding, and locomotion (Couper and Leise, 1996), as well as reproduction processes in bivalves such as spawning, oocyte maturation (Hirai et al., 1988), egg laying (Muschamp and Fong, 2001), parturition (Fong et al., 1996) and sperm motility (Kadam and Koide, 1990). Serotonin receptors are found on the membrane of oocytes and sperm of *Spisula* (Kadam et al., 1991) and are involved in the release of gametes. These receptors are regulated by 17β-estradiol, also in bivalves (Osada et al., 1998), and it presumably potentiates 5-HT-induced gamete release (Croll and Wang, 2007). Its exogenous application to bivalves can induce or potentiate spawning and parturition (Fong, 1998). In gastropods, however, only the induction of metamorphosis by 5-HT in the larvae of *Ilyanassa obsoleta* has been described (Couper and Leise, 1996). Moreover fluoxetine can act on the embryogenesis in *Daphnia magna* (Pery et al., 2008).

* Corresponding author. Tel.: +33 472208905; fax: +33 478477875.
E-mail addresses: marion.gust@cemagref.fr (M. Gust), thierry.buronfosse@inserm.fr (T. Buronfosse), giamb@sciences.univ-metz.fr (L. Giamberini), mramil@usc.es (M. Ramil), raphael.mons@cemagref.fr (R. Mons), jeanne.garric@cemagref.fr (J. Garric).

0269-7491/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.envpol.2008.09.040

Author's personal copy

Due to these numerous links between serotonin and bivalve reproduction, we decided to assess the effects of fluoxetine on two prosobranch gastropods, *Valvata piscinalis* (the European valve snail) and *Potamopyrgus antipodarum* (the New Zealand mudsnail), which have different modes of reproduction.

P. antipodarum is an invasive parthenogenetic ovoviviparous freshwater mudsnail (Robson, 1926; Winterbourn, 1970) which thrives in running waters from small creeks to steams, lakes and estuaries (Winterbourn, 1970), in mud and sand, on rocks, gravel and aquatic plants (Michaut, 1968). This sensitive test organism has been recommended for use in the development of a reproduction test within the OECD guideline "*Ad hoc* Expert Group on Invertebrate Testing" (Duft et al., 2007). Recently Nentwig (2007) studied the effects of this SSRI on this species and found a significant decrease in fecundity.

The European valve snail, *V. piscinalis*, thrives in the same habitat as *P. antipodarum*, though in terms of reproduction it is hermaphrodite oviparous (Heard, 1963). Furthermore, this new test species has been successfully cultured in our laboratory for several years (Ducrot et al., 2006).

Effects of fluoxetine in the two gastropods were compared using the same test conditions and endpoints in order to determine the possible modes of action on their reproductive characteristics. The number of capsule and eggs per capsules in *V. piscinalis* and the number of neonates and embryos in the brood pouch of *P. antipodarum* were measured. The development capacity (growth, age at first spawning) of neonates born from exposed parents (F1) was also examined. Finally, the effects of fluoxetine on gonad tissues and sex steroids were assessed.

2. Materials and methods

P. antipodarum and *V. piscinalis* were obtained from long term cultures established in our laboratory (Cemagref, Lyon, France). These cultures were initiated with snails that originated from natural populations collected in clean sediment in a canal close to the Rhone river. The snails were kept at 21 ± 1 °C in 20 L in stainless aquaria filled with reconstituted[1] water. They were fed with Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) as described by Ducrot et al. (2006).

2.1. Fluoxetine-spiked water exposure

Fluoxetine exposure on both *P. antipodarum* and *V. piscinalis* was performed simultaneously. Ten snails from each species were placed in separate test beakers filled with 0.5 L water one week before beginning the test. The beakers were set at 21 ± 1 °C with a 16:8 h light:dark photoperiod. We used a flow through system which consisted of beakers filled with continuously renewed test water (four renewals a day) and a continuous pumping system, for each tested concentration, of clean water and a fluoxetine-spiked solution allowing to obtain the required exposure concentrations after mixing. The stock of the fluoxetine-spiked solution (CAS number 59333-67-4, purchased from Interchim (Montluçon, France)), was renewed every three days and kept at an ambient temperature (21 °C) and in darkness, according to its stability in these conditions (Kwon and Armbrust, 2006). The nominal exposure concentrations included 3.7, 11.1, 33.3 and 100 µg/L and a control. Six replicates per concentration were prepared and exposed for 42 days. Specific conductivity, temperature, pH, and dissolved oxygen were monitored daily. Organisms were fed with 0.6 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per working day for *P. antipodarum* and 0.9 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per working day for *V. piscinalis*.

Adult reproducing snails, with a size of approximately 4.4 mm (±0.3) and 3.8 mm (±0.2) for *P. antipodarum* and *V. piscinalis*, were used at the start of the experiment.

2.2. Biological measurements

For *P. antipodarum*, the number of neonates born in each beaker was counted weekly using a binocular microscope. Developmental abnormalities, if observed, were noted.

At the end of the 42-day exposure period to fluoxetine, 4 adults per beakers were taken randomly (24 adults per concentration) to count the embryos in their brood pouch, a technique adapted from Duft et al. (2003). The shell was measured in length and then cracked using a vice. The shell parts were removed in order to observe the embryos through the epithelia. After carefully opening the brood pouch, the number of embryos with or without shells were counted under a binocular microscope in order to obtain a calculated percentage.

As for *V. piscinalis*, egg capsules were collected once a week from each beaker and counted. The number of eggs per capsule was determined using a binocular microscope. Twenty-four capsules per concentration were selected every week and exposed to the corresponding concentration of fluoxetine until the hatching began. Date and rate of hatching were registered.

During the last week of exposure, neonates of *P. antipodarum* and capsules of *V. piscinalis* (F1) were collected and placed in clean water (same used for laboratory cultures) for 14 weeks. F1 survival and growth of both species were monitored weekly up until the 8th week. Growth was determined using shell length measurements. In *V. piscinalis*, shell length was measured between the peristome and its opposite extremity. This distance corresponds to the maximal diameter of the shell. In *P. antipodarum*, shell length was measured between the apex and the distal extremity of the aperture, which corresponds to the maximal height of the shell. *P. antipodarum* were fed with 0.24 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per working day. *V. piscinalis* were fed with 0.1 mg/invidual the first two weeks and 0.4 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per working day afterwards. On the 8th week after birth, only 10 juveniles per concentration per species were kept in a beaker for each concentration under the same conditions. Growth (size, mm) was then measured every two weeks using a binocular microscope. Monitoring ended when the first reproduction period was observed in each beaker.

2.3. Histology

At the end of the 42-day exposure period to fluoxetine, 10 adults per concentration were taken randomly for histological analysis. Samples were preserved for 48 h in Bouin liquid, then washed and desiccated using baths of alcohol-growing concentrations (starting with 70%). Afterwards, the snails were embedded in paraffin using toluene as a solvent. Serial cross sections of 5 µm were cut and colored using hemalun–eosin. From the apical to the distal part of each organism, the number of sections containing oocytes were counted and the gonad thickness was deduced.

2.4. Chemical analysis

2.4.1. Steroid measurements

To measure the levels of total testosterone, progesterone and estradiol using a radioimmunoassay (RIA) technique, five *V. piscinalis* and sixteen *P. antipodarum* were taken on day 42, a technique adapted from Gooding and LeBlanc (2004). Pools of two whole frozen *P. antipodarum* or single *V. piscinalis* were homogenized in 1% (v/v) trifluoro acetic acid. Homogenates were extracted twice with methylene chloride (2 × 3 mL) and centrifuged at 3,000 × *g* for 10 min at 0 °C. The organic extract was evaporated and dissolved in acetonitrile (300 µL). Since estradiol was not properly quantified after the saponification step, an aliquot of one third (100 µL) of the sample was immediately separated and evaporated to measure estradiol after being resuspended in 20 µL of steroid-free monkey serum. The other two thirds (200 µL) of the sample were used to measure total testosterone and progesterone. It underwent a saponification step (1 mL methanol containing 2% KOH) for 3 h at 45 °C. Following saponification 4 mL reverse-osmosed water was added to each tube. Steroids were extracted twice with methylene chloride (2 × 2 mL) and resuspended in acetonitrile.

After evaporation, the dry extract was resuspended in 30 µL steroid-free monkey serum to measure total testosterone and progesterone. The samples were assayed using commercial RIA kits for estradiol (DiaSorin, Saluggia, Italy), progesterone and testosterone (DSL, Webster, USA). Sex steroids were measured in the sample according to the protocol provided with the RIA kit.

In both species the efficiency of the extraction ($n = 7$) was above 59% for estradiol, 91% for testosterone and 60% for progesterone. Moreover, the occurrence of progesterone and testosterone in our snails was confirmed by LC–MS–MS (data not shown).

2.4.2. Fluoxetine measurements

On day 42, water samples were randomly collected for each concentration, in order to measure the effective exposure concentrations. Samples were then stored in glass vessels at −18 °C, for less than 30 days before being sent to Federal Institute of Hydrology (Germany) for chemical analysis. Water samples (250 mL), adjusted to pH 3 with sulphuric acid, were spiked with the surrogate standard fluoxetine-d_5 (Isotec, Miamisburg, USA). Samples were enriched at a flow rate of 10–20 mL/min (ca. 200 mbar) with OASIS® HLB SPE (hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction) cartridges (200 mg, 30 µm, Waters, Milfort, USA), and the SPE material was dried for 1 h under a nitrogen stream. Fluoxetine was eluted using 4 × 2 mL of methanol/acetic acid (98/2, v/v). After blowing down to 100 µL the samples extracts, they were reconstituted to 1 mL of the liquid chromatography (LC) eluent A.

The sample extracts were measured by LC tandem mass spectrometry (Agilent 1100 with degasser, quaternary pump and autosampler, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany/API 4000 with electrospray ionization, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) operating in the positive ion mode using multiple reaction

[1] Mixture of natural spring water and deionised water.

Author's personal copy

monitoring (MRM). Chromatographic separation took place at room temperature by means of a Synergi Polar RP 80A column (150 × 3 mm, 4 µm) (Phenomenex®, Aschaffenburg, Germany). A mixture of 20 mM ammonia solution (pH 5.7 adjusted with acetic acid): acetonitrile (98:2) (A) and a mixture of A:acetonitrile (2:3) (B) were used as mobile phases. Two MRM transitions were monitored for each substance for identification and quantification of the analytes (fluoxetine: 310/44 and 310/148 amu; fluoxetine-d_5: 315/44 and 315/143 amu).

Calibration curves showed linearity in the range of 5–2000 ng ml^{-1}. The limit of quantification (LOQ) for fluoxetine in water samples was 5 ng l^{-1}.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Normality distribution and homogeneity of variance of the data were tested. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Dunnett's *t*-test for post hoc comparisons of groups. When necessary a Kruskal–Wallis test followed by a Mann–Whitney *U*-test were performed.

3. Results

During the entire experiment, the following exposure conditions remained relatively constant: temperature (21.2 ± 0.2 °C), pH (7.93 ± 0.07), conductivity (634 ± 58 µS/cm) and mean percentage of dissolved oxygen of 88 ± 4%.

3.1. Measured water concentration

Chemical measurements showed a fluoxetine recovery in the exposure system depending on the tested concentration (from 27% to 69%), with measured exposure concentrations of 1, 4.2, 13 and 69 µg/L. Since only one measurement was performed, from here on only the nominal concentrations will be used.

3.2. P. antipodarum

3.2.1. Mortality

In spite of the tested concentrations, no notable rates of mortality were observed ($P > 0.05$). Survival rates in the controls were higher than 80% for *P. antipodarum* (Table 1). However mortality of *P. antipodarum* at the high concentration was higher than controls.

3.2.2. Reproduction of F0

The cumulated number of neonates per living adult after the 42-day exposure period significantly decreased (Fig. 1) at only the highest concentration of 100 µg fluoxetine/L ($P < 0.01$).

The number of shelled embryos and the total number of embryos in the brood pouch on day 42 (Fig. 2) increased significantly compared to the controls at 3.7 and 11.1 µg fluoxetine/L ($P < 0.01$), and then significantly decreased at 100 µg fluoxetine/L ($P < 0.01$). The number of unshelled embryos (Fig. 2) also increased significantly at 3.7 µg fluoxetine/L ($P < 0.05$), and decreased significantly at 100 µg fluoxetine/L ($P < 0.01$).

Interestingly, the relative percentages of embryos without a shell (Table 1) were considerably higher than the controls ($P < 0.05$) at the two highest nominal concentrations of 33.3 and 100 µg/L.

3.2.3. Histological analysis

Histological analysis of the gonads on day 42 confirm the effects of fluoxetine on *P. antipodarum* fecundity (Table 1). The reproductive tissues of the exposed organisms were compared to those of the controls. A non-significant increase of the thickness of the reproductive tissues, compared to the control organisms, was observed at all concentrations except 100 µg/L. For this latter concentration, the gonad tissues were particularly thinner ($P < 0.05$). In addition, very few mature embryos were observed at 100 µg fluoxetine/L, however mature oocytes were present. Finally, a significant number of adults from the 100 µg/L concentration were in very bad physiological status, having loosened tissues (Fig. 3). All tissues were affected at this concentration.

3.2.4. Steroids

No significant effects were observed with estradiol concentrations. A concentration-dependent increase of the total testosterone level was observed when exposed to 33.3 and 100 µg/L ($P < 0.05$ and 0.01). A significant increase ($P < 0.05$) of progesterone concentrations per snail was also measured at 33.3 µg/L (Table 1).

3.2.5. Effects on F1

Some mortality was observed for F1 during the observation period of the neonates born in the 33.3 µg/L concentration (14 weeks). The size of the newborns obtained from the control group was significantly smaller than that of the newborns obtained from the exposed parents ($P < 0.01$). Moreover, a difference of size was not observed between the juveniles born from exposed parents ($P > 0.05$). Second, among all organisms born from exposed adults, the first spawning was delayed despite the size observed from the first reproduction, which was significantly greater than the controls ($P < 0.05$; Table 1). Nonetheless, since the organisms were grouped in only one beaker per concentration, we had 10 measures for growth, but only one for reproduction, and the delay observed for reproduction could not be statistically assessed.

3.3. V. piscinalis

3.3.1. Mortality

Survival rates in the controls were higher than 70% for *V. piscinalis* (Table 2) and no notable rates of mortality were observed ($P > 0.05$).

Table 1
Effects of fluoxetine on the different endpoints for *P. antipodarum*, mean value (standard deviation). * indicates significant difference from the control (*$P < 0.05$, Mann–Withney *U*-tests). The percentage of unshelled embryos was calculated based on the mean number of embryos without shells per adult compared to total embryos.

Fluoxetine nominal concentration (µg/L)	Control	3.7	11.1	33.3	100
F0 lethality	5%	7%	3%	5%	20%
Cumulate number of neonates per adult at day 42	21.71 (4.10)	23.25 (4.75).	25.37 (6.01)	16.80 (3.95)	10.14 (5.53)
Mean number of embryos of *P. antipodarum* with shell at 42 days	4.42 (2.92)	7.65 (3.57)	9.90 (5.56)	2.40 (2.91)	0.05 (0.22)
Mean number of embryos of *P. antipodarum* without shell at 42 days	8.68 (4.70)	12.45 (4.79)	11.00 (4.67)	7.90 (5.29)	3.05 (2.94)
Percentage of embryos of *P. antipodarum* without shell at day 42	64%	62%	55%	82%*	>99%*
Thickness of reproductive tissues in *P. antipodarum* (µm) F0, $n = 10$	283 (70)	311 (66)	348 (87)	304 (98)	96* (28)
Testosterone levels (fmol per snail), $n = 8$	35.7 (10.3)	41.9 (8.2)	35.7 (13.0)	51.5* (13.0)	60.3* (14.4)
Progesterone levels (fmol per snail), $n = 8$	97.0 (10.1)	94.5 (8.0)	93.7 (13.1)	115.6* (15.7)	104.0 (12.1)
Estradiol levels (10^{-2} fmol per snail), $n = 8$	172.7 (57.7)	156.2 (51.9)	165.3 (36.4)	190.3 (60.6)	215.2 (65.9)
F1 lethality	0%	20%	20%	50%*	10%
Size at 14 weeks (F1, mm)	3.81 (0.39)	4.63*(0.40)	4.91* (0.25)	4.80* (0.34)	4.84* (0.30)
Age after birth at first spawning (weeks)	11	14	12	12	12
Size at first spawning (F1, mm)	3.05 (0.45)	4.63* (0.40)	4.21* (0.39)	4.53* (0.43)	4.39* (0.15)

Author's personal copy

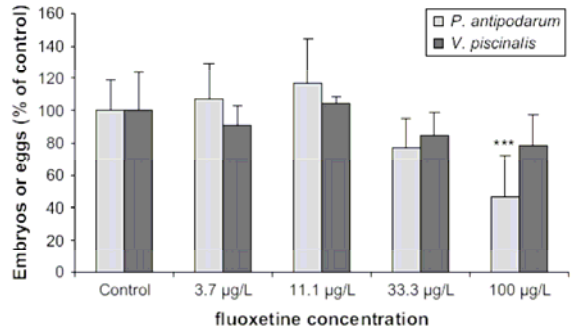


Fig. 1. Cumulated number of newborns per adult *P. antipodarum* and eggs per adult *V. piscinalis* at day 42 (mean value and standard deviation) as a function of fluoxetine nominal concentrations (corresponding to measured concentration of 1, 4.2, 13 and 69 µg/L). *** indicates significant difference from the control ($P < 0.01$, Dunnett *t*-test).

3.3.2. Reproduction of F0

After 42 days of exposure the total number of eggs per living adult (Fig. 1) decreased at 100 µg fluoxetine/L, though the effect was not significant ($P = 0.08$). Contrary to effects observed on *P. antipodarum*, induced reproduction was not detected at the two lowest concentrations (3.7 and 11.1 µg/L, Fig. 1). In addition, no effect on the rate or time of the eggs hatching was detected. All capsules hatched between 7 and 14 days with a hatching success above 90%.

3.3.3. Histological analysis

Histological analysis of the organisms allowed to confirm that fluoxetine did not affect the reproductive tissue of *V. piscinalis* at any tested concentration (data not shown).

3.3.4. Steroids

No significant effects were observed on the levels of any steroids (Table 2). The levels per individual were much higher than in *P. antipodarum* (between 2-fold for progesterone and 10-fold for testosterone).

3.3.5. Effects on F1

After 8 and 10 weeks, high mortality occurred mainly in beakers with juveniles born from adults exposed to 11.1 and 100 µg/L of fluoxetine (respectively 90 and 70% mortality, Table 2). These beakers were therefore not considered for the assessment of growth and age from the first reproduction. In the beakers where the mortality was less than 50%, the size of the organisms was not significantly different no matter what origins they have ($P > 0.05$) whether it be from exposed or control parents. Reproduction times for control juveniles and the juveniles born from exposed adults were nearly the same (Table 2).

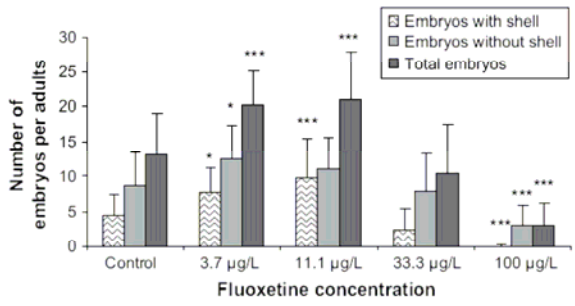


Fig. 2. Number of embryos in the brood pouch per adult *P. antipodarum* at day 42 (mean value and standard deviation) as a function of fluoxetine nominal concentrations (corresponding to measured concentration of 1, 4.2, 13 and 69 µg/L). * indicates significant difference from the control (*$P < 0.05$, Dunnett *t*-test, ***$P < 0.01$, Dunnett *t*-test).

4. Discussion

Measured concentrations of fluoxetine were lower than expected ones, with the lowest recovery rates for the lowest tested concentration. Knowing that fluoxetine is a persistent SSRI in the environment, relatively recalcitrant to hydrolysis, photolysis and microbial degradation (Kwon and Armbrust, 2006), and has the capacity to adsorb to organic matter ($\log(K_{oc}) = 5.3$, Johnson et al., 2005), the above results could be explained by adsorption on the implemented exposure system rather than by degradation. Nevertheless, since only one analytical measurement was available at the end of the experiment, a mean exposure concentration was not assessable, which explains why nominal concentrations were kept for stating concentration–effect relationships.

According to the literature, effects of fluoxetine exposure on invertebrates, and particularly on reproductive endpoints, vary with the tested species. Also, fluoxetine has been shown to impair or sometimes induce reproduction at the lowest, tested concentrations (Brooks et al., 2003b; Henry et al., 2004; Flaherty and Dodson, 2005).

Contrary to the effects of fluoxetine on *P. antipodarum*, the reproduction of *V. piscinalis* was not affected regardless the exposure concentration and the considered endpoints (number of eggs, capsules, hatching time, rate of hatching, histology and steroids measurements). Even if these two species belong to the same phylum (gastropod prosobranch) and possess different modes of reproduction, be it hermaphroditic or parthenogenetic, showed a noticeable difference of sensitivity to fluoxetine. Perhaps this could be explained by the metabolic breakdown of fluoxetine. For example, cytochrome P-450 dependent monooxygenase biotransforms fluoxetine into norfluoxetine, which is a metabolite shown to be 50% more toxic than the parent compound in 24 h lethality tests (Nalecz-Jawecki, 2007). However, the metabolic activities of the two species might not be as effective. Besides *V. piscinalis* has a higher lipid content than *P. antipodarum* (data not shown), and fluoxetine is a lipophilic compound (Johnson et al., 2005). Thus the bioavailability for tissues could be lower in *V. piscinalis*. Moreover, these two snails could have dissimilar serotonin receptors with different affinity for fluoxetine. The pattern of serotonin-receptor phenotype development (time of apparition and number of serotoninergic neurones) is variable between gastropods (Goldberg and Kater, 1989), which could explain why some are very sensitive and others are not. This is true for embryos as well as for adults: the number of 5-HT receptors can be different between two stages of adult development (Goldberg and Kater, 1989). Further research is therefore needed in order to explain the mechanism of a lower sensitivity of *V. piscinalis* to fluoxetine and more importantly to provide information on the relative sensitivity of the these two gastropod species when exposed to xenobiotics.

In regards to *P. antipodarum*, a similar study done in our laboratory interestingly found an enhancement of reproduction at low concentrations of fluoxetine (under 10 µg/L) when taking into consideration the cumulate number of neonates (Pery et al., 2008). Nevertheless, additional studies are needed to ensure the repeatability of the induction of reproduction as few data are available on the natural variability of *P. antipodarum* reproduction in laboratory conditions.

Parallel to the above results, an hormesis effect on reproduction was observed in *P. antipodarum*. Such a response, often a receptor-based toxicological response, can be linked to an adaptive response to low levels of stress or damage which is a result of enhanced

Author's personal copy

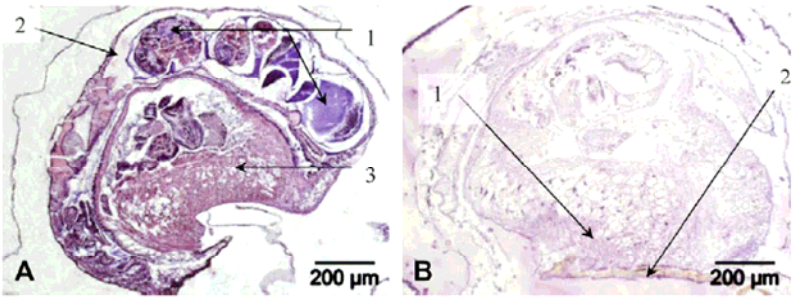


Fig. 3. A: Cross section of the *P. antipodarum* control (thickness 5 µm). 1: embryos; 2: brood pouch; 3: muscle. B: Cross section of a 100 µg/L *P. antipodarum* (thickness 5 µm). 1: muscle; 2: opercula.

fitness for finite periods of certain physiological systems. The ecological implications of this phenomenon are still discussed (Calabrese and Baldwin, 2002). Other environmental endocrine disrupters show a similar concentration–effect curve. For example EE2, bisphenol A (BPA) and octylphenol (OP) are able to induce reproduction in *P. antipodarum* at low concentrations (25 ng/l and 1 µg/L for EE2 and for BPA respectively after 42 days of exposure, and 5 µg/L after 63 days for OP, Jobling et al., 2003). No data are available for *V. piscinalis*. However fluoxetine can induce a gradual increase on the brood size of *Ceriodaphnia dubia* (56 µg/L) and a significant decrease at 112 µg/L (Brooks et al., 2003b). This dose–response curve is not described in every species tested.

Similar to Nentwig's (2007) results, a decrease of the number of embryos in the brood pouch after 42 days at the highest exposure concentration (100 µg fluoxetine/L) was measured in our experiment. An increase was also observed at the lowest concentration (3.7 µg fluoxetine/L), although this induction of embryo production was not measured by Nentwig (2007). Some differences in experimental procedure could explain the latter results (origin and size of organisms, temperature, design of exposure). The exposure temperature was 21.2 + 0.2 °C, whereas it was 16 ± 1 °C in the Nentwig's experiment. Temperature might modify the metabolic capacities of the snails and the effects of fluoxetine. Nonetheless our control values for reproduction were quite comparable to results obtained in his laboratory (Oetken et al., 2005; Nentwig, 2007). Contrary to Nentwig's study where embryos were counted at day 14, 21, 28 and 56, we counted the number of embryos once, e.g. after 42 d. of exposure. As found with previously published studies, once an induction in reproduction was observed, the process did not slow down but rather increased during the course of exposition (see EE2, BPA or OP, Jobling et al., 2003).

Flaherty and Dodson (2005) found an enhancement of reproduction in *D. magna* exposed to a single concentration of 36 µg/L. In contrast, Brooks et al. (2003b) found a reproduction decrease in *C. dubia* with an NOEC of 56 µg/L and an LOEC of 112 µg/L. Henry et al. (2004) also detected a decrease in reproduction for the same species with an NOEC of 89 µg/L and an LOEC of 447 µg/L. Brooks et al. (2003b) derived growth LOECs for *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* of 1.3 and 5.6 mg/kg sediment, whereas Nentwig (2007) did not observe significant effects on *Chironomus riparius* for concentrations up to 5.86 mg/kg sediment.

The most sensitive endpoint used to assess effects of chemical exposure on *P. antipodarum* fecundity is the number of embryos in the brood pouch, a method recently proposed for standardization (Duft et al., 2007), and also confirmed by our study. Based on the results obtained in this study, the number of living neonates should also be considered as a crucial parameter when assessing the population growth because of possible impairment of embryo development before their release. We observed a statistically significant hormesis effect when considering the total number of embryos in the brood pouch (Fig. 2). This induction in reproduction was also perceptible, even if not statically significant, when taking into account the cumulate number of newborns. This points towards a modification in population growth.

Of the two highest concentrations (33.3 and 100 µg fluoxetine/L) we tested, the percentage of unshelled embryos was significantly higher compared to the controls (Table 1). In addition, few or no neonates were observed in the beakers exposed to 100 µg/L at the end of the experiment. This could indicate that embryo development was initiated but not completed, a hypothesis supported by the histological analysis of gonads. Very few to no mature embryos were observed, even though mature oocytes were present at 100 µg/L. High concentrations of fluoxetine seem to impair embryo development in *P. antipodarum*. Certainly gastropods develop serotonergic neurons as embryos and maintain population of these neurons throughout their life (Goldberg and Kater, 1989). Such an

Table 2
Effects of fluoxetine on the different endpoints for *V. piscinalis*, mean value (standard deviation), ND: non-determined. * indicates significant difference from the control (*$P < 0.05$, Mann–Withney *U*-tests).

Fluoxetine nominal concentration (µg/L)	Control	3.7	11.1	33.3	100
F0 lethality	22%	30%	32%	20%	27%
Cumulate number of eggs per adult *V. piscinalis* at day 42	193.96 (45.46)	176.97 (22.48)	202.69 (7.71)	164.57 (26.67)	151.99 (36.48)
Cumulate number of capsules per adult *V. piscinalis* at day 42	19.66 (2.69)	17.26 (1.92)	19.14 (2.48)	15.46 (3.88)	15.48 (3.56)
Mean number of eggs per capsule	9.87	10.25	10.59	10.64	9.82
Testosterone levels (fmol per snail), $n = 5$	436.5 (67.7)	505.1 (54.4)	277.5 (57.9)	585.0 (144.8)	469.8 (146.1)
Progesterone levels (fmol per snail), $n = 5$	194.6 (16.2)	225.0 (15.6)	163.5 (27.1)	196.5 (27.1)	175.5 (28.9)
Estradiol levels (10^{-2} fmol per snail), $n = 5$	898.4 (377.7)	1303.7 (648,9)	1097.0 (788.5)	596.6 (330.2)	557.0 (161.6)
F1 lethality	50%	20%	90%*	20%	70%*
Size at 14 weeks (F1, mm)	4.30 (0.45)	4.24 (0.45)	ND	4.04 (0.52)	ND
Age after birth at first spawning (weeks)	13	12	ND	12	ND
Size at first spawning (F1, mm)	3.76 (0.53)	3.34 (0.78)	ND	3.78 (0.57)	ND

Author's personal copy

impairment might be linked to the fluoxetine-induced developmental abnormalities described in Medaka (Foran et al., 2004) or the spontaneous abortions reported in humans (Rahimi et al., 2006).

Furthermore fluoxetine at very low concentrations seems not only to influence reproduction but also the fitness of the second generation (F1). When analyzing the effects on F1 of *P. antipodarum*, the neonates born from exposed parents and kept in clean water, regardless of the concentration of the parent exposure, grew faster and reproduced later than controls. Fluoxetine could act on embryos by speeding up the growth of neonates at the expense of sexual maturation. This result indicates that early development of *P. antipodarum* embryos might be a critical window for SSRI exposure. *D. magna* newborns exposed to 30 μg/L were also observed to be reduced in length (Garric, personal communication). Interestingly enough, *P. antipodarum* and *D. magna* are both parthenogenetic and ovoviviparous, while *V. piscinalis* is hermaphrodite oviparous. The egg capsule might protect the embryos against SSRIs.

In our study, the development of reproductive tissues is coherent with the reproductive performances of both parthenogenetic and hermaphroditic snails. In terms of reproduction, no effects on the gonadal development of the ovotestis of *V. piscinalis* were observed. As for induced reproduction in *P. antipodarum*, the main stimulation of the reproductive tissue occurred when exposed to the two lowest concentrations (3.7 and 11.1 μg fluoxetine/L). However at 100 μg/L the reproductive tissues were less developed than in the controls, and fecundity was also drastically lower. As all tissues were impaired, these effects on reproduction at 100 μg/L seem to be due to general toxicity rather than specific effects. Although, we observed only a slight increase of the gonad thickness at 33.3 μg/L compared to the control organisms, there was no statistical difference in the reproduction endpoints (neonates and embryos). This is consistent with the effects described in Crustaceans, where injections of fluoxetine (43.2 μg/L and 15 μg/g of body weight respectively) in *Uca pugilator* (Kulkarni and Fingerman, 1992) and *Procambarus clarkia* (Kulkarni et al., 1992) induced ovarian development.

Interestingly, fluoxetine alters sex steroid levels in both vertebrates and invertebrates. In Japanese Medaka, the testosterone levels are not affected, however estradiol increases at low concentrations (0.1 and 0.5 μg/L, Foran et al., 2004). In female rats, fluoxetine reduces blood levels of progesterone (Uphouse et al., 2006). On the contrary, in *P. antipodarum* the testosterone level is concentration-dependant, but no effects are seen on estradiol. The effects on progesterone are unclear. These measurements cannot be easily linked to the reproductive effects observed. Finally, in *V. piscinalis* no variations of the steroid levels were observed. The link between serotonin and steroids in gastropods is unclear and needs to be further investigated.

5. Conclusions

Our results confirm the ability of the SSRI fluoxetine to act on non-target species in impairing or modifying relevant physiological parameters such as growth or reproduction though with opposite effects. This study underlines the necessity to consider different biological levels in order to better understand the toxicity mechanisms. The histological studies were useful in corroborating the results even if a mechanism was not pinpointed. Despite the preliminary use of steroid measurements, they do support the hypothesis that steroidogenesis can be a chemical target in *P. antipodarum*. Finally, the mode of reproduction is an important parameter to consider when assessing the impact of SSRI on gastropods. Indeed the response of the two related species to this drug is quite different, but an explanation is not currently available.

Acknowledgements

The present work is part of the ERAPharm project, funded within the 6th framework program of the European Commission (project no SSPI-CT-2003-511135).

The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon (Prof. F. Garnier) for the financial grant of the RIA analysis. Solange Couturier, Edwige Rousselière, Antoinette Meyer and Hervé Quéau are gratefully acknowledged for their technical help, and Ashley Tilghman for improving the English.

References

Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003a. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. Toxicology Letters 142, 169–183.

Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B., 2003b. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. Chemosphere 52, 135–142.

Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2002. Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. Trends in Pharmacological Sciences 23, 331–337.

Couper, J.M., Leise, E.M., 1996. Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. Biological Bulletin 191, 178–186.

Croll, R.P., Wang, C., 2007. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs. Aquaculture 272, 76–86.

Ducrot, V., Cognat, C., Mons, R., Mouthon, J., Garric, J., 2006. Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: the gastropod *Valvata piscinalis*. Chemosphere 62, 1272–1281.

Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals – an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Ecotoxicology 16, 169–182.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aquatic Toxicology 64, 437–449.

Flaherty, C.M., Dodson, S.I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. Chemosphere 61, 200–207.

Fong, P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. Biological Bulletin 194, 143–149.

Fong, P.P., Wade, S., Rostafin, M., 1996. Characterization of serotonin receptor mediating parturition in fingernail clams *Sphaerium* (Musculium) spp from eastern North America. Journal of Experimental Zoology 275, 326–330.

Foran, C.M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B., 2004. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46, 511–517.

Goldberg, J.I., Kater, S.B., 1989. Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the Helisoma nervous-system. Developmental Biology 131, 483–495.

Gooding, M.P., LeBlanc, G.A., 2004. Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). Invertebrate Biology 123, 237–243.

Heard, W.H., 1963. Reproductive feature of*Valvata*. Nautilus 77, 64–68.

Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L., Black, M.C., 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 2229–2233.

Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H., Koide, S.S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. Journal of Experimental Zoology 245, 318–321.

Janer, G., Porte, C., 2007. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. Ecotoxicology 16, 145–160.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology 65, 205–220.

Johnson, D.J., Sanderson, H., Brain, R.A., Wilson, C.J., Bestari, K.T., Solomon, K.R., 2005. Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. Regulatory Toxicology and Pharmacology 42, 313–323.

Kadam, A.L., Koide, S.S., 1990. Stimulation of *Spisula* sperm motility by 5-hydroxytryptamine analogs. Invertebrate Reproduction & Development 17, 33–37.

Kadam, P.A., Kadam, A.L., Segal, S.J., Koide, S.S., 1991. Functional serotonin receptor sites on Atlantic surf clam *Spisula solidissima* Dillwyn 1817 oocytes and sperm. Journal of Shellfish Research 10, 215–220.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology 36, 1202–1211.

Author's personal copy

Kulkarni, G.K., Fingerman, M., 1992. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler-crab, *Uca pugilator*. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology & Endocrinology 101, 419–423.

Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., Amaldoss, G., Jaiswal, R.G., Fingerman, M., 1992. *In vivo* stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), by 5-hydroxytryptamine. Invertebrate Reproduction & Development 21, 231–240.

Kwon, J.W., Armbrust, K.L., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 2561–2568.

Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 37–43.

Metcalfe, C.D., Miao, X.S., Koenig, B.G., Struger, J., 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2881–2889.

Michaut, P., 1968. Données biologiques sur un Gastéropode Prosobranche récemment introduit en Côte-d'Or, *Potamopyrgus jenkinsi*. Hydrobiologia 32, 513–527.

Muschamp, J.W., Fong, P.P., 2001. Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: reduction of egg laying and induction of penile erection. Journal of Experimental Zoology 289, 202–207.

Nalecz-Jawecki, G., 2007. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. Chemosphere 70, 29–35.

Nentwig, G., 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52, 163–170.

Oetken, M., Nentwig, G., Loffler, D., Ternes, T., Oehlmann, J., 2005. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 49, 353–361.

Osada, M., Nakata, A., Matsumoto, T., Mori, K., 1998. Pharmacological characterization of serotonin receptor in the oocyte membrane of bivalve molluscs and its formation during oogenesis. Journal of Experimental Zoology 281, 124–131.

Pery, A.A.A., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J., 2008. Fluoxetine effects on the life cycle of aquatic invertebrates. Chemosphere 73, 300–304, doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.029.

Rahimi, R., Nikfar, S., Abdollahi, M., 2006. Pregnancy outcomes following exposure to serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis of clinical trials. Reproductive Toxicology 22, 571–575.

Rittschof, D., McClellan-Green, P., 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. Marine Pollution Bulletin 50, 369–373.

Robson, G.C., 1926. Parthenogenesis in the mollusc *Paludestrina jenkinsi* – part I. Journal of Experimental Biology 1, 65–78.

Uphouse, L., Hensler, J.G., Sarkar, J., Grossie, B., 2006. Fluoxetine disrupts food intake and estrous cyclicity in Fischer female rats. Brain Research 1072, 79–90.

Winterbourn, M., 1970. The New Zealand species of *Potamopyrgus* (Gasteropoda: Hydrobiidae). Malacologia 10, 283–321.

Publication n°6:

Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates

A.R.R. Péry, M. Gust, B. Vollat, R. Mons, M. Ramil, G. Fink, T. Ternes, J. Garric

La fluoxétine est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, généralement utilisé comme anti-dépresseur très largement utilisé et fréquemment retrouvé dans les eaux de surface. Elle est suspectée d'être toxique pour les invertébrés aquatiques. Ses effets ont été évalués sur le **cycle de vie** de quatre invertébrés : *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Potamopyrgus antipodarum* via de l'eau contaminée à la fluoxétine et *Chironomus riparius* via des sédiments contaminés. Chez *D. magna*, une étude multi-générationnelle a été conduite, avec l'exposition de nouveau-nés.

La fluoxétine a des effets à des concentrations aussi faibles que 10µg/L, notamment sur les espèces parthénogénétiques que sont *D. magna* et *P. antipodarum*. Chez les daphnies la taille des juvéniles est diminuée et les effets étaient plus marqués sur la deuxième génération d'individus exposés, avec une NOEC aux alentours de 8,9 µg/L. Chez *P. antipodarum* une diminution significative de reproduction a été observée pour des concentrations aux alentours de 100 µg/L. En revanche, la reproduction de *H. azteca* n'a pas semblé affectée par l'exposition, au contraire de sa croissance (33 µg/L). Aucun effet n'a été observé chez *C. riparius* aux concentrations d'exposition.

Des **modèles mécanistiques** généraux basés sur l'allocation d'énergie se sont montrés peu pertinents pour l'analyse des données. Ces résultats suggèrent que la fluoxétine ait pour cible des **mécanismes spécifiques de la reproduction**.

Mots-clés: Fluoxétine, effets sub-létaux, modèles mécanistiques, invertébrés

Chemosphere, 2008, 73, 3, 300-304

Chemosphere 73 (2008) 300–304

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates

A.R.R. Péry [a,b,*], M. Gust [a], B. Vollat [a], R. Mons [a], M. Ramil [c], G. Fink [c], T. Ternes [c], J. Garric [a]

[a] Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France
[b] INERIS, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Unité METO, 60550 Verneuil en Halatte, France
[c] Federal Institute of Hydrology (BFG), D-56068 Koblenz, Am Mainzer Tor 1, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 January 2008
Received in revised form 29 May 2008
Accepted 13 June 2008
Available online 24 July 2008

Keywords:
Invertebrates
Fluoxetine
Pharmaceuticals
Sublethal effects
Multi-generational test
Mechanistic models

ABSTRACT

Fluoxetine is a serotonin re-uptake inhibitor, generally used as an antidepressant. It is suspected to provoke substantial effects in the aquatic environment. This study reports the effects of fluoxetine on the life cycle of four invertebrate species, *Daphnia magna*, *Hyalella azteca* and the snail *Potamopyrgus antipodarum* exposed to fluoxetine spiked-water and the midge *Chironomus riparius* exposed to fluoxetine-spiked sediments. For *D. magna*, a multi-generational study was performed with exposition of newborns from exposed organisms. Effects of fluoxetine could be found at low measured concentrations (around 10 $\mu g\,l^{-1}$), especially for parthenogenetic reproduction of *D. magna* and *P. antipodarum*. For daphnids, newborns length was impacted by fluoxetine and the second generation of exposed individuals showed much more pronounced effects than the first one, with a NOEC of 8.9 $\mu g\,l^{-1}$. For *P. antipodarum*, significant decrease of reproduction was found for concentrations around 10 $\mu g\,l^{-1}$. In contrast, we found no effect on the reproduction of *H. azteca* but a significant effect on growth, which resulted in a NOEC of 33 $\mu g\,l^{-1}$, expressed in nominal concentration. No effect on *C. riparius* could be found for measured concentrations up to 59.5 $mg\,kg^{-1}$. General mechanistic energy-based models showed poor relevance for data analysis, which suggests that fluoxetine targets specific mechanisms of reproduction.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For the past few years, there has been a growing concern about ecotoxicological risk of pharmaceuticals. Indeed, human medicines have been detected in many countries in sewage treatment plant effluents, surface waters, seawaters, groundwater and some drinking waters (Fent et al., 2006). As pharmaceuticals are present at relatively low levels in the environment, risk for acute toxic effects is unlikely, but chronic environmental toxic effects cannot be excluded (Carlsson et al., 2006). However, little is known about the chronic effects of these substances. Moreover, environmental risk assessment based on acute data is inappropriate (Ferrari et al., 2004). For instance, carbamazepine and propanolol would be inaccurately identified as having negligible risks in France and Germany. There is a real lack of long term effects studies, in particular chronic data on the entire life cycle and investigation of multigenerational effects (Fent et al., 2006).

Fluoxetine is a serotonin re-uptake inhibitor. It is apparently the most acute toxic human pharmaceuticals reported so far (Fent et al., 2006), which makes necessary more studies about risks of low levels of exposure. In terms of environmental concentrations, Kolpin et al. (2002) estimated at 0.012 $\mu g\,l^{-1}$ the median concentration of fluoxetine in US streams. In terms of chronic effects, the recently published data on the effects of fluoxetine to invertebrates provide contradictory information. Flaherty and Dodson (2005) found an enhancement of reproduction for *Daphnia magna* exposed to a concentration of 36 $\mu g\,l^{-1}$. In contrast, Brooks et al. (2003) found a reproduction decrease for *Ceriodaphnia dubia* with a NOEC of 56 $\mu g\,l^{-1}$ and a LOEC of 112 $\mu g\,l^{-1}$. Henry et al. (2004) also found reproduction decrease for the same species with a NOEC of 89 $\mu g\,l^{-1}$ and a LOEC of 447 $\mu g\,l^{-1}$. Brooks et al. (2003) derived growth LOECs for *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* of, respectively 1.3 and 5.6 $mg\,kg^{-1}$ sediment, but Nentwig (2006) did not find any significant effect on *Chironomus riparius* for concentrations up to 5.86 $mg\,kg^{-1}$ sediment. This author obtained an extremely low LOEC of 0.47 $\mu g\,l^{-1}$ for the reproduction of the snail *Potamopyrgus antipodarum*, comparable to concentrations measured in surface water.

Toxic effects of fluoxetine on invertebrates are consequently still worth being studied. We selected four invertebrates, with the following criteria: first, we tested species for which at least one test result is available in the literature to allow comparisons between our data and data from other studies; second, as past studies indicated that the sublethal effects of fluoxetine are likely to be on reproduction, we tried to have different reproduction

* Corresponding author. Address: INERIS, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Unité METO, 60550 Verneuil en Halatte, France. Tel.: +33 3 44 55 61 26; fax: +33 3 44 55 68 00.
E-mail address: alexandre.pery@ineris.fr (A.R.R. Péry).

0045-6535/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.029

strategies (sexual reproduction and parthenogenesis). We consequently used a large test battery encompassing several phylogenetic groups. The species selected were then *C. riparius* for sediment borne exposure, the crustacean *D. magna* and *H. azteca*, and the mollusc gastropod *P. antipodarum* concerning water borne exposure. This selection for water borne exposure is relevant to cover a large range of invertebrate sensitivity for organic compounds, as presented by Wogram and Liess (2001). Indeed, these authors showed that, relative to organic compounds, amphipoda are significantly more sensitive than daphnids and that gastropoda are significantly less sensitive than daphnids. We plan here to investigate effects on all the components of the life cycle of our species. In particular, effects on adults survival and reproduction as well as effects on juveniles survival and growth have been assessed. Moreover, for one of the species (*D. magna*), fitness of the newborns produced during exposure and exposed themselves at the same concentration as their mother was assessed, to account for subtle effects on reproduction (like malformation) which would be undetectable with results expressed only in terms of numbers of newborns. Finally, the growth and reproduction data were analyzed using energy-based models, DEBtox (Kooijman and Bedaux, 1996). These models permit to estimate parameters not dependent on time, which is valuable to assess effects for long term exposure, and they allow insides relative to the physiological mode of action of the compound (Kooijman and Bedaux, 1996; Péry et al., 2003).

2. Materials and methods

2.1. Chemical substance

Fluoxetine-HCL was used for all ecotoxicity tests (CAS 59333-67-4). It was purchased from Interchim (Montluçon, France; product number 09674, batch number RD0001).

2.2. Chironomus riparius tests

Larvae were exposed to fluoxetine-spiked sediment. Sediment has been taken from Port-Galland, a tributary of the river Ain (France). This sediment has been monitored for years by Cemagref. Chemicals concentration are at low level and it has never been toxic to sediment organisms. Sediments were 2 mm sieved and homogenised before use. Organic carbon content is 3%, organic nitrogen content is 0.35%. Water was constituted of ¼ water from a spring, situated under our laboratory, added to demineralised water, resulting in pH of 7.8 and conductivity of 450 $\mu S\ cm^{-1}$. Sediments were spiked with fluoxetine 10 days before starting the tests. Fluoxetine (Interchim, Montluçon, France) was introduced in 0.5 l water at the concentration corresponding to the chosen nominal exposure concentrations and mixed with 1.5 kg wet sediment. Tested exposure concentrations were 1.2, 3.7, 11, 33, 100 and 1000 mg kg^{-1} d.w., the latest being the concentration for which a compound is considered as safe if no significant effect occur at this exposure concentration (OECD, 2004). Sediments were transferred in beakers three days before starting tests. There were ten beakers per concentration. We put 0.1 l sediment and 0.4 l water in these beakers. The beakers were set in a water bath at 21 °C with a 16:8 h light:dark photoperiod. Conductivity, temperature, pH, amount of dissolved oxygen were measured daily. We used an aeration system (air introduced through a Pasteur pipette in each beaker) to maintain oxygen level.

The experiment was initiated with two-day-old larvae (end of first instar) from our laboratory culture. We put ten larvae per beaker. Length at the beginning of the test, measured on 20 organisms, was 1.7 ± 0.1 mm. Organisms were fed daily with 0.6 mg per larva Tetramin® fish food.

At day 7, survivor and growth were monitored by sampling five beakers per concentration. Individuals were counted, killed using formaldehyde, then length was measured using a binocular microscope. Emergence was monitored for the five remaining beakers per concentration which had been covered to prevent organisms from escaping. The females were then put into 1 l mating chambers, with 0.1 l water, with males from laboratory culture in a ratio of three males per female as described by Péry et al. (2002). After mating and oviposition, each egg mass was removed and put into a 5 ml tube with 2 ml H_2SO_4, 2N overnight and the number of eggs was counted.

2.3. Hyalella azteca tests

Amphipods were exposed to fluoxetine-spiked water. Experimental protocol was the same as in Péry et al. (2005): amphipods were exposed in beakers and an artificial nylon-shelter was introduced at the bottom of each beaker. The beakers were set in a water bath at 21 °C with a 16:8 h light:dark photoperiod. Test water in the beakers was continuously renewed (four renewals a day): for each concentration, there was a continuous pumping of clean water (same as for *C. riparius*) and stock solution at a speed calculated to obtained the required exposure concentration and then mixed in a bottle. Stock solution was protected from light and renewed every three days. The nominal exposure concentrations were 3.7, 11, 33 and 100 $\mu g\ l^{-1}$. Specific conductivity, temperature, pH, dissolved oxygen were measured daily. Organisms were fed daily with 0.16 mg Tetramin® per individual. Two experiments were conducted. In the first one, young organisms (between 7 and 9 days old, mean length 1.69 ± 0.17 mm) selected in our laboratory culture were exposed (ten per beaker) and length was measured every 7 days to assess effects on growth. Length measurements were performed on the dorsal side from the base of the first antenna to the end of the next to last segment, using an image analysis method (Sigma Scan Pro 5.0, SPSS Inc., Chicago). In the second one, we exposed five precopula (one male and one female, resulting in ten organisms per beaker) taken from our laboratory culture per beaker during 28 days, and we monitored reproduction every week. For each experiment, there was four replicates per concentration.

2.4. Daphnia magna tests

Organisms were exposed individually in 100 ml-bottles which contained 80 ml of solution. There were ten replicates per concentration. Tested fluoxetine concentrations were 0, 3, 10, 30, 100 and 300 $\mu g\ l^{-1}$. Test duration was 21 d, temperature was maintained at 20 °C by putting the bottles in temperature-controlled chambers, water (M4 medium, as recommended by ISO 10706) was renewed every day. Daphnids length was measured at days 7, 14 and 21 using image analysis and reproduction (number of newborns) was monitored every day. Length of the newborns was measured for the third brood. Food was algae *Pseudokirchneriella subcapitata* from our laboratory culture. Each organism received 10^7 algal cells per day the two first days, 2×10^7 algal cells per day the three following days, 3×10^7 algal cells per day the two following days and 4×10^7 algal cells per day until the end of the test. These feeding conditions are *ad libitum* conditions, as it has been chosen by previous tests (unpublished results).

To assess effects on two generations, an experiment in the same conditions was performed with newborns from the fifth brood. This experiment with the newborns started exactly the day when the experiment with their mother ended. There was not enough surviving newborns to start this new test for nominal concentration 300 $\mu g\ l^{-1}$.

2.5. Potamopyrgus antipodarum tests

Snails from the species *P. antipodarum* came from our laboratory culture. The test beakers were filled with 0.5 l fluoxetine-spiked water (the same as for amphipods), three days before the beginning of the tests. The beakers were set in a water bath at 21 °C with a 16:8 h light:dark photoperiod. The exposure system was the same as for *H. azteca*. The nominal exposure concentrations were 3.7, 11, 33 and 100 μg l^{-1}. Specific conductivity, temperature, pH, dissolved oxygen were measured daily. Organisms were fed with 0.6 mg Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) per individual per day. We performed two experiments, one to assess effects on growth, the other one to assess effects on reproduction. Growth was monitored every week through shell length measurements using a binocular. At the beginning of the growth test, each beaker contained ten organisms, which had been selected in the culture according to their length (0.48 ± 0.026 mm). Reproduction was monitored once a week, by counting and removing all newborns using a binocular. The test was initiated with individual adult length superior to 4 mm at the beginning of the test, and also ten individuals per replicate. For each experiment, there were three replicates per concentration. The experiments lasted six weeks.

2.6. Analytical procedures

Spiked water was sampled for all exposure concentrations in the *D. magna* and *P. antipodarum* tests at day 10 for daphnids and day 42 for snails. We could not have chemical measurements for amphipod tests. To get enough volume to perform chemical measurements, waters for all replicates of a given concentration were pooled. Spiked sediments were sampled for all concentrations at the end of the toxicity test.

Water samples (10–250 ml), adjusted to pH 3 with sulphuric acid, were spiked with the surrogate standard fluoxetine-d5 (Isotec, Miamisburg, USA). Samples were enriched at a flow rate of 10–20 ml min^{-1} (ca. 200 mbar) with OASIS HLB SPE cartridges (200 mg, 30 μm, Waters, Milfort, USA) and the SPE material was dried for 1 h under a nitrogen stream. Fluoxetine was eluted using 4 × 2 ml of methanol/acetic acid (98/2, v/v). After blowing down to 100 μl the samples extracts, they were reconstituted to 1 ml of the LC eluent A (see below).

Sediment samples (1 g) were spiked with the surrogate standard fluoxetine-d5 and extracted by pressurized liquid extraction (PLE) with MeOH/water/acetic acid (49:49:2) at 100 bar and 120 °C during two static cycles of 5 min. Afterwards, the extract was made up to 50 ml and one aliquot of 0.1–1 ml diluted in 500 ml of groundwater. SPE clean-up was carried out with OASIS HLB cartridges eluted with MeOH-MTBE (95:5).

The sample extracts were measured by LC tandem MS (Agilent 1100 with degasser, quaternary pump and autosampler, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany/API 4000 with ESI ionization, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) operating in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). Chromatographic separation took place at room temperature by means of a Synergi Polar RP 80A column (150 × 3 mm, 4 μm) (Phenomenex®, Aschaffenburg, Germany). A mixture of 20 mM ammonia solution (pH 5.7 adjusted with acetic acid): acetonitrile (98:2) (A) and a mixture of A:acetonitrile (2:3) (B) were used as mobile phases. Two MRM transitions were monitored for each substance for identification and quantification of the analytes (fluoxetine: 310/44 and 310/148 amu; fluoxetine-d5: 315/44 and 315/143 amu).

Calibration curves showed a good correlation in the range 5–2000 ng ml^{-1}. Limits of quantification for fluoxetine in sediment and water samples were 10 ng $g^{-1}$and 5 ng l^{-1}, respectively.

2.7. Statistical analysis

To analyse the data, we used standard methods (ANOVA, Dunnet-*t* tests) but also DEBtox models (see a complete description in Kooijman and Bedaux (1996) and in the OECD guideline about statistics in ecotoxicology (OECD, 2006). These models are based on the DEB theory (Kooijman, 2000), which describes growth and reproduction as a function of bioenergetics parameters like for instance costs of maintenance or food assimilation rate. Effects on growth and reproduction are described as the consequences of effects on one of these bioenergetics parameters. These effects are proportional to the difference between accumulated compound concentration and a threshold concentration, called the NEC (No Effect Concentration). The estimate of this threshold concentration, obtained through maximum likelihood methods, does not depend on the duration of the test.

3. Results

3.1. Chironomus riparius tests

Temperature was constant (21 ± 1 °C) so as pH (7.9 ± 0.3). Conductivity was 490 ± 35 μS cm^{-1}, and the percentage of dissolved oxygen was always above 90%. Growth (length of 12.1 mm at 7 days) and survival (72%) in the control were enough to validate the test.

Chemical measurement showed a recovery of 63 ± 4% for fluoxetine spiked on the sediments. Traces of fluoxetine near detection limit (0.1 mg kg^{-1}) were found in the control.

There was no significant effect on *C. riparius* growth, emergence and reproduction for concentrations up to 59.5 mg kg^{-1} (ANOVA, $p > 0.05$). Final length for all these concentrations were between 11.9 and 12.1 mm and total number of eggs per female were between 426 and 456. For measured concentration 666 mg kg^{-1}, there was no emergence, survival at day 7 was low (34%) and growth at day 7 was very significantly reduced ($p < 0.01$, Dunnet-*t* test), by 31%.

3.2. Hyalella azteca tests

Temperature was constant (20.9 ± 0.4 °C) so as pH (7.55 ± 0.2). Conductivity was 391 ± 17 μS cm^{-1}, and the percentage of dissolved oxygen was always above 90%.

No adult died for any of the concentrations during the test. There was no significant effect of fluoxetine on reproduction (ANOVA, $p > 0.5$), with mean number of newborns per female from 12.8 to 15.9. For the young organisms, more than 87.5% amphipods survived in all the concentrations. Effects on growth were significant for nominal concentration 100 μg l^{-1} at days 14, 21 and 28 ($p < 0.01$, Dunnet-*t* test), as presented by Fig. 1. This resulted in a LOEC of 100 μg l^{-1} and a NOEC of 33 μg l^{-1}. We used DEBtox models, with the three possible physiological modes of action for growth (effects on food assimilation, on growth energy costs or on maintenance energetic costs), and with a Von Bertalanffy growth rate of 0.08 d^{-1} (parameter required by the software, estimated with a least square method using control data). Growth was very low the first week, so we used DEBtox only from day 7 to 28, but taking into account that compound accumulation has started from the very first day. The best fit was obtained for the mode of action "increase of energetic costs for growth", the two other modes of action leading to estimations significantly different from the data at day 28 obtained for nominal concentration 100 μg l^{-1}. To propose a rough explanation for that, we should point that, in the DEBtox context, "increase of energetic costs for growth" is characterized by effects on growth rate but no effect on ultimate

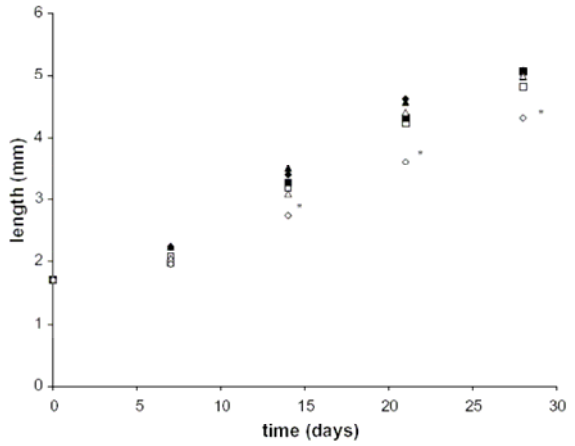


Fig. 1. Length of the young *H. azteca* as a function of time and nominal concentration (control: black diamonds, 1.2 µg l^{-1}: black squares, 3.7 µg l^{-1}: black triangles, 11 µg l^{-1}: white squares, 33 µg l^{-1}: white triangles, 100 µg l^{-1}: white diamonds). Asterisk accounts for significant difference with the control ($p < 0.05$, Dunnet-*t* test).

length. By looking at (Fig. 1), it seems that all growth curves tend to reach the same ultimate length. The NEC estimated by DEBtox was 19 µg l^{-1}, but the software was unable to provide a confidence interval, which means that all numbers between 0 and infinity were in this confidence interval.

3.3. Daphnia magna tests

Temperature was constant (19.9 ± 0.34 °C) so as pH (7.9 ± 0.27) and conductivity (642 ± 30 µs cm^{-1}). Chemical measurements showed a recovery of fluoxetine in the exposure system from 80% to 102%.

In the first test, a significant effect on growth was found at day 7 for concentrations 102 and 241 µg l^{-1}. At days 14 and 21, this effect was only significant for exposure concentration 241 µg l^{-1}. Moreover, there was 40% mortality for this concentration at day 21 and a significant decrease of reproduction by 32%. No effect on reproduction was found for the other concentrations. The measurements of the newborns length for the third brood of the first test showed significant effects of fluoxetine for exposure concentrations 31, 102 and 241 µg l^{-1} (Fig. 2). This parameter is the most

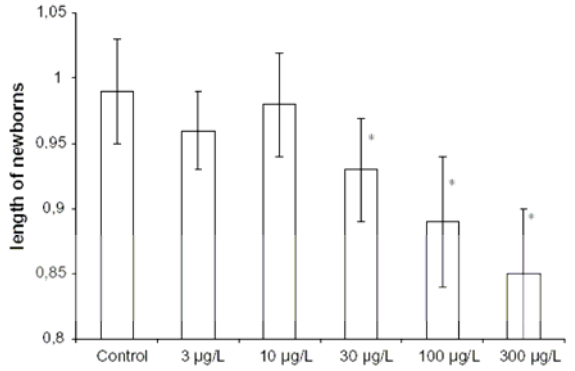


Fig. 2. Length of *Daphnia* newborns from the third brood as a function of fluoxetine nominal exposure concentration. Asterisk indicates significant difference from the control ($p < 0.05$, Dunnet-*t* test).

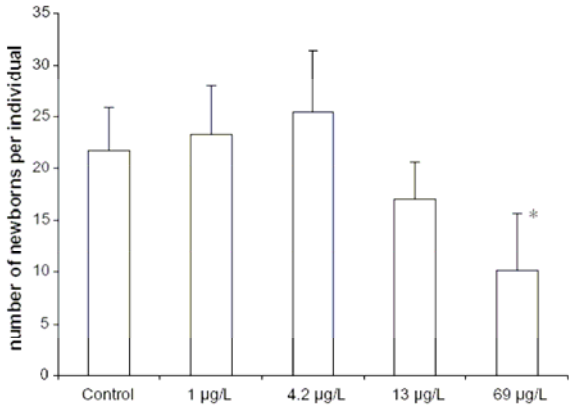


Fig. 3. Number of newborns per *P. antipodarum* adult (mean value and standard deviation) as a function of fluoxetine nominal exposure concentration. Asterisk indicates significant difference from the control ($p < 0.05$, Dunnet-*t* test).

sensitive to fluoxetine, resulting in a NOEC of 8.9 µg l^{-1} and a LOEC of 31 µg l^{-1}. Concerning the second test, effects were much more pronounced than for the first one, but with the same LOEC and NOEC. 70% of the newborns were found dead at 21d for exposure concentration 102 µg L^{-1}. Moreover, reproduction was significantly reduced for exposure concentration 31 µg l^{-1} (by 18%) and length was significantly lower than the control for exposure concentrations 31 and 102 µg l^{-1}.

3.4. Potamopyrgus antipodarum tests

Temperature was constant (20.8 ± 0.4 °C) so as pH (7.6 ± 0.3). Conductivity was 400 ± 24 µS cm^{-1}, and the percentage of dissolved oxygen was always above 90%. Chemical measurements showed a bad recovery of fluoxetine in the exposure system (from 27% to 69%), with measured exposure concentrations: 1, 4.2, 13 and 69 µg l^{-1}.

There was no significant effect of fluoxetine on growth for all weekly measurements (ANOVA, $p > 0.5$). As for reproduction, we observed a significant decrease at 69 µg l^{-1} (Fig. 3) but no significant effect at lower concentrations (Dunnet-*t* tests, $p < 0.05$), resulting in a NOEC of 13 µg l^{-1} and a LOEC of 69 µg l^{-1}. We used DEBtox models to analyse data on reproduction. We selected the physiological mode of action « increase of the energetic costs of reproduction ». Indeed, the selection of effects on reproduction due to effects on growth would have no sense here, because we exposed adults. We obtained a NEC of 5 µg l^{-1} with 95% confidence interval 4.3–10.4 µg l^{-1}. All values in this confidence interval are lower than the estimated NOEC.

4. Discussion

The chemical measures for the tests with daphnids and chironomids showed a correct spiking with fluoxetine. In contrast, the chemical measurements for the tests snails showed an irregular, sometimes low efficiency of water spiking (especially for low concentrations), despite a continuous renewal of the solution. Recently Kwon and Armbrust (2006) have demonstrated that fluoxetine is hydrolytically and photolytically stable in aqueous solutions including natural waters. Fluoxetine may thus not be degraded in our system. Our hypothesis is thus that fluoxetine, which is likely to sorb very quickly on the sediments, could sorb very quickly on the fish food provided to the snails and the amphipods in our test or to the plastic tubes of the renewing system. As the exposure

system was the same for *H. azteca* as for *P. antipodarum*, and as the tests for the snails were performed immediately after the tests with amphipods, we could consider that the actual concentrations that have been measured for snails exposure to fluoxetine are also valid for amphipods exposure to fluoxetine. The NOEC of 33 $\mu g\,l^{-1}$ expressed in nominal concentration for growth of amphipods would be a NOEC of 13 $\mu g\,l^{-1}$ expressed in measured concentration.

The classification of sensitivity for our species was quite different from our expectations based on the works of Wogram and Liess (2001) on effects on organic compounds on invertebrates, which classified amphipods, daphnids and snails in order of decreasing sensitivity, which confirms the necessity to treat pharmaceuticals specifically among all organic compounds. In our tests, the most sensitive species is *P. antipodarum*, with a NEC of 5 $\mu g\,l^{-1}$ relative to reproduction. Moreover, the effects of fluoxetine were on reproduction for daphnids and snails (juveniles fitness and total amount of newborns, respectively), whereas they were on growth for *H. azteca*. Our choice of tested species was consequently relevant to capture a large range of different types of responses.

For daphnids, the highest effects were found on the development of the embryos, with smaller newborns resulting in significant effects on their future reproduction. Exposure to fluoxetine has thus consequences on the fitness of the newborns, which energy-based models like DEBtox are not able to account for. Indeed, they assume that the total amount of energy invested per newborn is not concentration dependent, so that newborns should have the same length and ability to resist to toxic exposure. This suggests a direct action of fluoxetine on the development of newborns, which may not be the consequence of energy depletion in the adult female. Consequently, no result from modeling was presented for daphnids toxicity tests, for our models cannot account for fluoxetine mode of action. For *H. azteca*, the use of DEBtox models was also irrelevant. DEBtox was unable to provide a confidence interval, which means that all numbers between 0 and infinity were in this confidence interval. This suggests that energy-based models like DEBtox are unable to account accurately for the observed effects, and that, probably, the main target of fluoxetine in *H. azteca* is not the dynamics of energy.

We can compare our results with other studies from the literature. Fluoxetine appeared to have different effects on growth, fecundity and reproduction depending on species. The freshwater snail *P. antipodarum* has shown to be the most sensitive invertebrate species for reproduction as a NOEC of 3.2 $\mu g\,l^{-1}$ (56 days) has been reported by Nentwig (2006). This is very coherent with the NEC of 5 $\mu g\,l^{-1}$ we found in this project. For *H. azteca*, fluoxetine treatments inhibited growth with a NOEC of 33 $\mu g\,l^{-1}$ expressed in nominal concentration. Brooks et al. (2003) also showed an inhibition of growth due to fluoxetine exposure. We have contradictory results compared to the data from Flaherty and Dodson (2005) who found an enhancement of reproduction for *D. magna* exposed to a concentration of 36 $\mu g\,l^{-1}$ fluoxetine. In contrast, our results are coherent with Brooks et al. (2003) who found a reproduction decrease for *C. dubia* with a NOEC of 56 $\mu g\,l^{-1}$ and a LOEC of 112 $\mu g\,l^{-1}$. Henry et al. (2004) also found reproduction decrease for the same species with a NOEC of 89 $\mu g\,l^{-1}$ and a LOEC of 447 $\mu g\,l^{-1}$. Nentwig, (2006) found a LOEC of 1.12 mg kg^{-1} (measured value) when studied fluoxetine effects on *C. riparius* emergence which was associated to a significant increase of number of eggs per clutch. However, he observed no effect on growth for concentrations up to 5.86 mg kg^{-1} and he recommends confirming the potential reduced emergence and increased clutch size observed after fluoxetine exposure. In our study, we observed no effect for concentrations below 59 mg kg^{-1}. Fluoxetine is consequently very unlikely to have effects in the field on *C. riparius*.

To conclude, data sets on acute and chronic toxicity of the selected case study pharmaceuticals have been derived in our study. Fluoxetine seems to interact with growth and reproduction processes in invertebrates. Depending on the tested species, effects of fluoxetine can be found at low exposure concentrations, around 10 $\mu g\,l^{-1}$. The fact that the second generation of daphnids was more sensitive than the first one highlights the need for investigation of the effects of pharmaceuticals on at least two generations of invertebrates. Energy-based models were developed and used to describe effects on growth and reproduction, but were not relevant to estimates threshold effect for fluoxetine.

Acknowledgements

The present work is part of the project ERAPharm that is funded within the 6th framework programme of the European Commission (Project No SSPI-CT-2003-511135). We also would like to thank an anonymous reviewer who contributed to improve the reading of the manuscript.

References

Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B., 2003. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. Chemosphere 52, 135–142.

Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K., Kuhler, T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci. Total Environ. 364, 67–87.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 76, 122–159.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environ. Toxicol. Chem. 23, 1344–1354.

Flaherty, C.M., Dodson, S.I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth and reproduction. Chemosphere 61, 200–207.

Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L., Black, M.C., 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2229–2233.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 36, 1202–1211.

Kooijman, S.A.L.M., 2000. Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. Cambridge University press, Cambridge.

Kooijman, S.A.L.M., Bedaux, J.J.M., 1996. The Analysis of Aquatic Toxicity Data. V.U. University press, Amsterdam.

Kwon, J.W., Armbrust, K.L., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. Environ. Toxicol. Chem. 25, 2561–2568.

Nentwig, G., 2006. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates Part II: the antidepressant drug fluoxetine. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 163–170.

OECD, 2004. OECD guideline for the testing of chemicals No. 218: sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.

OECD, 2006. OECD environment health and safety publications. Series on testing and assessment no 54: current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to applications.

Péry, A.R.R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L., Garric, J., 2002. A modelling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. Environ. Toxicol. Chem. 21, 2507–2513.

Péry, A.R.R., Ducrot, V., Mons, R., Garric, J., 2003. Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. Aquat. Toxicol. 65, 281–292.

Péry, A.R.R., Dargelos, S., Quéau, H., Garric, J., 2005. Preparatory work to propose water-only tests with the amphipod *Hyalella azteca*. Comparison with sediment toxicity tests. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 75, 617–622.

Wogram, J., Liess, M., 2001. Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of Daphnia. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 67, 360–367.

Publication n°7:

An Environmental Risk Assessment for the Serotonin Re-uptake Inhibitor Fluoxetine - A Case Study Utilizing the European Risk Assessment Framework

K.D. Oakes, A. Coors, B. Escher, K. Fenner, J. Garric, M. Gust, T. Knacker, A. Küster, C. Kussatz, C.D. Metcalfe, S. Monteiro, T. Moon, J. Mennigen, J. Parrott, A.RR Péry, M. Ramil, J.V. Tarazona, P.S.-Argüello, T.A Ternes, V.L. Trudeau, T. Boucard, G.J. Van Der Kraak, M.R Servos

La fluoxétine est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, qui a été sélectionné dans le programme européen **ERAPharm** sur l'évaluation de risque environnemental des médicaments. Les critères de sélections de ce composé ont été sa persistance environnementale, sa forte toxicité aiguë vis-à-vis des organismes non cibles et sa pharmacocinétique.

La fluoxétine est le principe actif du Prozac®, anti-dépresseur très largement utilisé et fréquemment retrouvé dans les eaux de surface proches des rejets d'effluents de stations d'épuration urbaines. Cette voie d'entrée dans l'environnement est majoritaire pour ce médicament.

Dans la phase I de l'évaluation de risques, les concentrations environnementales prédites (PEC) dans les eaux de surface (0.4 $\mu g\ L^{-1}$) ainsi que les évaluations affinées dans les effluents de STEP (0.010, 0.012, et 0.059 $\mu g\ L^{-1}$ pour la Suède, l'Allemagne et la Grande-Bretagne, respectivement), étaient toutes supérieures ou égales au seuil de 10 $ng\ L^{-1}$. En conséquence la **phase II** de l'évaluation de risque a été nécessaire. Les algues vertes étaient les espèces les plus sensibles à la fluoxétine avec une NOEC inférieure à 0,6µ/L, à partir de laquelle une PEC pour les effluents a été dérivée (0.012 $\mu g\ L^{-1}$). Le ratio PEC/PNEC basé sur les données de prescription du Royaume-Uni et de l'Allemagne, était supérieur à 1, indiquant un **risque potentiel** pour le **compartiment aquatique**. De faibles risques pour les micro-organismes et les eaux souterraines ont été évalués. Le risque pour le compartiment **terrestre** et **sédimentaire** ne peut être exclu du fait des estimations trop peu fiables des coefficients de partage. L'estimation basée respectivement sur les Koc et Kow des comportements de partitionnement de la fluoxétine sur les boues et son potentiel de bioconcentration est problématique du fait que la fluoxétine est majoritairement sous forme cationique aux pH environnementaux.

Une évaluation de risque probabilistique suggère la possibilité d'effets adverses de la fluoxétine sur les organismes aquatiques exposés aux concentrations retrouvées dans les eaux

de surface. Cette étude de cas pour la fluoxétine montre que les directives européennes d'évaluation de risque permettent une prédiction raisonnable du risque environnemental, par rapport aux données mesurées.

Mots-clés: Fluoxétine, évaluation de risque environnemental, médicament humain

Integrated EnvironmentalAssessment and Management, 2010, 6, 1, 524-539

524 Integrated Environmental Assessment and Management — Volume 6, Supplement 1—pp. 524–539
© 2010 SETAC

Environmental Risk Assessment for the Serotonin Re-uptake Inhibitor Fluoxetine: Case Study Using the European Risk Assessment Framework

Ken D Oakes,† Anja Coors,‡ Beate I Escher,§,‖ Kathrin Fenner,§ Jeanne Garric,# Marion Gust,# Thomas Knacker,‡ Anette Küster,†† Carola Kussatz,†† Chris D Metcalfe,‡‡ Sara Monteiro,§§ Thomas W Moon,‖‖ Jan A Mennigen,‖‖ Joanne Parrott,## Alexandre RR Péry,# Maria Ramil,††† Ines Roennefahrt,†† José V Tarazona,‡‡‡ Paloma Sánchez-Argüello,‡‡‡ Thomas A Ternes,††† Vance L Trudeau,‖‖ Tatiana Boucard,§§§ Glen J Van Der Kraak,‖‖‖ and Mark R Servos†*

†Department of Biology, University of Waterloo, 200 University Ave W, Waterloo, Ontario N2L 3G1, Canada
‡ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim/Main, Germany
§Eawag, Überlandstrasse 133, Dübendorf, Switzerland
‖University of Queensland, National Research Centre for Environmental Toxicology (EnTox), 39 Kessels Rd, Brisbane, Australia
#Cemagref, UR BELY, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 3 bis, Quai Chauveau, CP 220, Lyon Cedex, France
††Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1, Dessau, Germany
‡‡Department of Environmental and Resource Studies, Trent University, 1600 West Bank Drive, Peterborough, Ontario, Canada
§§Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, United Kingdom
‖‖Department of Biology and Centre for Advanced Research in Environmental Genomics, University of Ottawa, 30 Marie-Curie, Ottawa, Ontario, Canada
##Environment Canada, 867 Lakeshore Road, PO Box 5050, Burlington, Ontario, Canada
†††BfG, Koblenz, Am Mainzer Tor 1, Germany
‡‡‡Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Crta de la Coruña, Madrid, Spain
§§§Environment Agency Science Group, Red Kite House, Howbery Park, Wallingford, United Kingdom
‖‖‖Department of Integrative Biology, University of Guelph, 50 Stone Rd E, Guelph, Ontario, Canada

(Submitted 25 November 2009; Returned for Revision 5 January 2010; Accepted 11 March 2010)

ABSTRACT

The serotonin re-uptake inhibitor fluoxetine was selected for an environmental risk assessment, using the most recent European guideline (EMEA 2006) within the European Union (EU)-funded Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPharm) project due to its environmental persistence, acute toxicity to nontarget organisms, and unique pharmacokinetics associated with a readily ionizable compound. As a widely prescribed psychotropic drug, fluoxetine is frequently detected in surface waters adjacent to urban areas because municipal wastewater effluents are the primary route of entry to aquatic environments. In Phase I of the assessment, the initial predicted environmental concentration of fluoxetine in surface water (initial PEC_{SW}) reached or exceeded the action limit of 10 ng/L, when using both a default market penetration factor and prescription data for Sweden, Germany, and the United Kingdom. Consequently, a Phase II risk assessment was conducted in which green algae were identified as the most sensitive species with a NOEC of <0.6 μg/L. From this value, a predicted no effect concentration for surface waters ($PNEC_{SW}$) of 0.012 μg/L was derived. The PEC/PNEC ratio was above the trigger value of 1 in worst-case exposure scenarios indicating a potential risk to the aquatic compartment. Similarly, risks of fluoxetine for sediment-dwelling organisms could not be excluded. No risk assessment was conducted for the terrestrial compartment due to a lack of data on effects of fluoxetine on soil organisms. The need for a separate risk assessment for the main metabolite of fluoxetine, norfluoxetine, was not conducted because of a lack of fate and effect studies. Based on published data, fluoxetine and norfluoxetine appeared to have a low to moderate bioaccumulation potential, which should be confirmed in formal studies according to OECD guidelines. Exposure assessments for fluoxetine according to the current framework rely heavily on K_{OC} and K_{OW} values. This approach is problematic, because fluoxetine is predominantly a cationic substance at environmental pH values. Consequently, the fate of fluoxetine (and other ionic substances) cannot be predicted using partition coefficients established for nonionic compounds. Further, published estimates for partition coefficients of fluoxetine vary, resulting in considerable uncertainties in both the exposure and environmental risk assessments of fluoxetine. Integr Environ Assess Manag 2010;6:524–539. © 2010 SETAC

Keywords: Human antidepressant Fluoxetine Environmental risk assessment

INTRODUCTION

The antidepressant fluoxetine [(±)-*N*-methyl-3-phenyl-3-[α,α,α-trifluoro-*p*-tolyl)oxy]propylamine] was introduced under the tradename Prozac® almost 20 y ago by Eli Lilly (2005, 2006) as one of the first selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) on the market. Since then, fluoxetine has rapidly become one of the most heavily prescribed psychotropic drugs used for the treatment of clinical depression, but

* To whom correspondence may be addressed:
mservos@admmail.uwaterloo.ca
Published online 1 April 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)
DOI: 10.1002/ieam.77

it is also administered for treatment of compulsive behaviors as well as eating, panic, and premenstrual dysphoric disorders. Fluoxetine acts primarily on the central nervous system by strongly and selectively inhibiting a carrier protein for serotonin re-uptake at the pre-synaptic membrane, producing an increase in serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) concentrations at postsynaptic receptor sites. Fluoxetine and other SSRIs have a low affinity for neurotransmitter receptors (e.g., muscarinic acetylcholine receptors), and consequently have a lower incidence of serious side effects (e.g., cardiotoxicity) compared with other psychotropic drugs (e.g., the tricyclic antidepressants). In comparison to other medications prescribed for the treatment of clinical depression, SSRIs are considered relatively safe (Hiemke and Härtter 2000). However, fluoxetine has recently received considerable attention due to its frequent detection in surface waters and municipal effluents (Kolpin et al. 2002; Metcalfe et al. 2003a, 2003b) and is recognized as one of the human pharmaceuticals with the highest acute toxicity toward nontarget organisms (Fent et al. 2006).

A preliminary risk assessment for fluoxetine conducted by Brooks et al. (2003a) estimated a hazard quotient based on predicted and measured environmental concentrations and the lowest effect level (determined by effects on growth of algae). Although the authors concluded that little risk may be expected, it was noted that the impact of fluoxetine on nontraditional endpoints in fish warranted further study (Brooks et al. 2003a). A subsequent risk assessment conducted by Webb (2004) was based on predicted environmental concentration (PEC)/predicted no effect concentration (PNEC) ratios using acute toxicity data for the PNEC estimation and consumption data in the United Kingdom for the PEC estimation. This assessment found that fluoxetine was among the few human pharmaceuticals with an initial PEC/PNEC ratio of >1, indicating the need for further refinement in the risk assessment process. Revising the PEC by assuming dilution in surface water and efficient removal in wastewater treatment resulted in a refined PEC/PNEC ratio of 0.12, indicating negligible environmental risk (Webb 2004). Fent et al. (2006) did not conduct a preliminary risk assessment due to the lack of chronic toxicity data, but noted that "the safety margin is narrow" when comparing lowest observed effect levels (LOECs) of fluoxetine and its maximum measured concentration in treated wastewater.

Models estimating the toxic potency of pharmaceuticals following human metabolism indicated negligible environmental risks associated with fluoxetine (Lienert et al. 2007). However, this assessment focused on acute endpoints unrelated to the mechanism of action of fluoxetine and did not consider chronic toxicity or potential specific effects, both of which may be relevant to algae and fish (Lienert et al. 2007). Recent experimental studies found both fluoxetine (Johnson et al. 2007; Neuwoehner et al. 2009) and its metabolite in humans, norfluoxetine (Neuwoehner et al. 2009), are specifically toxic to green algae.

Evaluation of sublethal changes linked to fluoxetine-induced alterations in serotonin levels may represent more sensitive and appropriate endpoints than traditional acute survival assessments. This approach is particularly relevant with respect to investigating impacts on aquatic organisms chronically exposed to low fluoxetine concentrations via municipal wastewater effluents (De Lange et al. 2006). The lack of environmental fate and chronic effects data for fluoxetine has both hampered attempts to conduct an environmental risk assessment (ERA) and prompted the selection of fluoxetine as a model compound in the EU-funded Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals (ERAPharm) project. Within ERAPharm, a suite of additional studies into the fate and effects of fluoxetine in the environment were conducted. The present case study uses these and other newly available data to conduct an exemplary ERA for fluoxetine according to the guidelines of the European Medicines Agency (EMEA 2006), which recently came into effect.

ERA ACCORDING TO CURRENT GUIDELINES

The ERA according to the EMEA guideline (EMEA 2006) is a tiered process in which Phase I is an action limit approach only considering environmental exposure. Phase II is a hazard quotient approach, comparing the PEC with the PNEC for various compartments. A detailed description and discussion of the final guideline is provided elsewhere (Laenge et al. 2006; Küster et al. accompanying paper). This risk assessment for fluoxetine follows the tiered assessment approach of the EMEA guideline and finally discusses the outcome of the ERA in view of integrating alternative approaches and additional data.

Phase I: Estimation of exposure

With reference to the OSPAR Convention, pharmaceuticals with a log K_{OW} value of >4.5 should be screened for persistence, bioconcentration, and toxicity (PBT; European Chemical Bureau 2003). Most measured and calculated log K_{OW} values for fluoxetine are <4.5, indicating that a formal PBT assessment is not required (Table 1). However, some calculated log K_{OW} values exceed this limit, specifically the value calculated by K_{OW}Win (SRC 2007a), a QSAR model recommended by the relevant technical guidance document of the EU (European Chemical Bureau 2003). While recognizing the range of reported K_{OW} values, the present case study did not include a formal PBT assessment for fluoxetine.

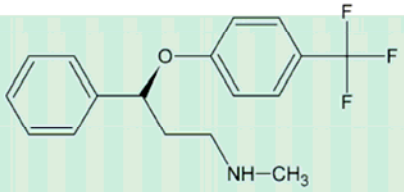
The initial predicted environmental concentration of fluoxetine in surface water (PEC_{SW}) in Phase I is calculated according to Equation 1:

$$PEC_{SW} = \frac{Dose_{ai} \cdot F_{pen}}{WasteW_{inhab} \cdot dilution}. \quad (1)$$

The maximum recommended daily dose of the active ingredient ($Dose_{ai}$) and the market penetration factor (F_{pen}) are pharmaceutical-specific parameters. F_{pen} can either be based on available marketing data or substituted with the default value of 0.01. The other equation parameters are default values ($WasteW_{inhab}$ as daily discharge volume of waste water per inhabitant, 200 L/inhab d^{-1}, and dilution as the factor for dilution of sewage effluent in the receiving surface water, for which the default value is 10 L/L). Whereas the defined daily dose (DDD) of fluoxetine is 20 mg/inhab d^{-1} (WHO 2007), the maximum $Dose_{ai}$ is 80 mg (Eli Lilly 2006), which results in an initial PEC_{SW} of 0.40 µg/L when using the default value for F_{pen}.

Calculation of initial PEC_{SW} in Phase I may also be based on actual consumption data. For 3 European countries (Germany, Sweden, and the United Kingdom), these data are available. Annual prescribed fluoxetine ranged from

Table 1. Physicochemical properties of fluoxetine relevant for fate assessment in Phase II Tier A

CAS	54910-89-3		
Molecular formula	$C_{17}H_{18}F_3NO$		
Molecular mass	309.33 g/mol		
Water solubility	60.3 g/m^3	Calculated	SRC (2007b)
pK_a	10.06	Calculated	Brooks et al. (2003a)
log K_{OW}	4.05	Measured	Adlard et al. (1995)
log K_{OW}	3.82	Calculated	Biobyte (http://www.biobyte.com)
log K_{OW}	4.10	Calculated	Dollery et al. (1991)
log K_{OW}	4.26	Measured	Wan et al. (2007)
log K_{OW}	4.50	Measured by pH-metric titration	Balon et al. (1999)
log K_{OW} (D_{OW})	1.22*	Measured	Kwon and Armbrust (2008)
log D_{OW}	4.30 (pH 11), 1.57 (pH 7), 1.25 (pH 2)	Calculated	Brooks et al. (2003a)
log K_{OW}	4.64	Calculated	SRC (2007a)
log K_{OW}	4.16	Calculated	IA (2007)
log K_{OW}	4.67 ± 0.56	Calculated	VCCLAB (2005)
log D_{OW} (pH 7)	4.51	Calculated	Lienert et al. (2007)
log D_{lipw} (pH 7)	3.60	Calculated	Lienert et al. (2007)
log D_{lipw} (pH 7)	3.84 ± 0.02	Measured	Neuwoehner et al. (2009).
log D_{lipw} (pH 7)	3.79	Measured	Yamamoto et al. (2005)
log D_{lipw} (pH 7)	4.23	Measured	Nakamura et al. (2008)
log D_{lipw} (pH 7)	3.00	Measured, neutral species	Balon et al. (1999)
K_{OC}	52 000 (DOM)	Measured (fluorescence quenching)	Yamamoto et al. (2005)
K_{OC}	74 000 (soil, 2.7%OC)	Measured	Yamamoto et al. (2005)
K_{OC}	17 000 (sediment, 0.79%OC)	Measured	Yamamoto et al. (2005)
K_{OC}	13 629 (activated sludge assuming 33%OC)	Calculated from measured data	Yamamoto et al. (2005)
K_{OC}	20 417–151 356 (sediment, range 0.16-0.65%OC)	Measured	Kwon and Armbrust (2008)

(Continued)

Table 1. (*Continued*)

K_{OC}	12 302-30 903 (soil, range 0.93–1.77%OC)	Measured	Kwon and Armbrust (2008)
K_{OC}	2746-7553 (soil, 3.3–8.5%OC)	Measured (based on OECD 106)	Monteiro (2008)
K_{OC}	535 (digested sludge, 33%OC)	Measured (based on OECD 106)	Monteiro (2008)
K_{OC}	9 (pH 7)	Calculated	Brooks et al. (2003a)
K_{OC}	199 526	Calculated	Johnson et al. (2005)

log K_{OW} = logarithm of octanol–water partition coefficient; log D_{OW}(pH) = logarithm of octanol–water distribution ratio at a given pH value; log D_{lipw} (pH 7): logarithm of liposome–water distribution coefficient ratio of a species; K_{OC} = water–organic carbon partition coefficient (L/kg C); DOM = Suwanee River natural organic matter; %OC = percentage organic carbon content.
*Reported as K_{OW} but it is likely that speciation was not considered and the value refers to D_{OW}

710 kg/a in Germany (data for 2001, IMS Health AG 2002) and 3.3 million defined daily doses a^{-1} in Sweden (data for 2003, Stockholm County Council 2005), to 2560 kg/a for the United Kingdom (Sebastine and Wakeman 2003). Considering the number of inhabitants in these countries (83 million in Germany, 8.9 million in Sweden, and 59.6 million in the United Kingdom; http://go.hrw.com/atlas/norm_htm), PEC_{SW} of 0.012 µg/L, 0.010 µg/L, and 0.059 µg/L were calculated for Germany, Sweden, and the United Kingdom, respectively. The action limit for initial PEC_{SW} triggering further impact assessment in Phase II is currently set to 0.01 µg/L (EMEA 2006). All PEC_{SW} calculated in Phase I were equal to or exceeded this action limit. Phase II environmental risk assessment for fluoxetine is therefore required according to the current guideline (EMEA 2006).

Phase II Tier A: Initial environmental fate and effects analyses

A base dataset (derived according to standardized methods, e.g., OECD guidelines) for the pharmaceutical is required for the risk assessment in Phase II, both in terms of the environmental fate (e.g., physicochemical properties, degradability, bioconcentration potential, partition behavior) and the effects (long-term toxicity tests with organisms from 3 trophic levels). The necessary data for the fate assessment of fluoxetine are summarized in Table 1, and standard long-term fluoxetine aquatic toxicity data sets for the effects assessment are reported in Table 2. Based on these data, the ratios of PEC/PNEC for surface water, groundwater and microorganisms are derived in the following sections. The outcome in the final evaluation step will determine whether a refined risk assessment according to Phase II Tier B is required.

Initial risk assessment for surface water

Standard long-term toxicity test datasets covering 3 trophic levels (algae, daphnid, and fish) are required by the current guideline (EMEA 2006) for calculating the predicted no effect concentration in surface water ($PNEC_{sw}$). In the case of a complete data set, an assessment factor (AF) of 10 should be used to calculate the $PNEC_{sw}$ from the lowest determined no observed effect concentration (NOEC). For fluoxetine, data from standard tests were only available for algae and *Daphnia* (Table 2). Consequently, an assessment factor of 50 is applied to the NOEC of the most sensitive species as prescribed in the technical guidance document (European Chemical Bureau 2003). For the most sensitive species, the chlorophyte *Desmodesmus subspicatus*, the NOEC was below the lowest tested concentration of 0.6 µg/L (which showed significant effects). To assess the risk for the aquatic compartment, the lowest observed effect concentration (LOEC) of ≤0.6 µg/L for *D. subspicatus* was used as a surrogate for the NOEC. Consequently, a $PNEC_{SW}$ of 0.012 µg/L was derived. Using the initial revised PECs, a PEC/PNEC ratio of <1 was obtained for Sweden (0.83), whereas a value of ≥1 was found for the United Kingdom and Germany (4.92 and 1.0, respectively), indicating a risk for the aquatic compartment based on fluoxetine prescription data for some European countries.

Initial risk assessment for groundwater

As some experimentally determined fluoxetine water–organic carbon partition coefficient (K_{OC}) values are <10 000 L/kg (Table 1), bank infiltration may be a likely path for groundwater contamination by surface waters (EMEA 2006). The initial $PEC_{groundwater}$ is calculated as [0.25* initial PEC_{sw}]. The range of $PEC_{groundwater}$ (based on the initial PEC_{sw} determined for Sweden and the United Kingdom) was 0.0025 to 0.015 µg/L. The $PNEC_{groundwater}$ equals the NOEC determined in the *Daphnia* reproduction test with an assessment factor of 10 (EMEA 2006), resulting in a $PNEC_{groundwater}$ of 10 µg/L. Consequently, the PEC/PNEC ratio for all initial PEC_{sw} values is well below 1, suggesting fluoxetine poses no environmental risk to groundwater. Based on the available data, no further evaluations of the fate or effects of fluoxetine in groundwater were considered in light of the low environmental risk to this compartment.

Initial risk assessment for microorganisms

No activated sludge respiration-inhibition tests (according to guideline OECD 209) were conducted within ERA Pharm or reported in the literature. Consequently, no $PNEC_{microorganism}$ could be determined. As an SSRI, fluoxetine was not designed to exert antimicrobial effects, nor have such side effects been reported on human intestinal fauna (Eli Lilly 2005). The few studies within the literature examining the effects of fluoxetine on free-living microorganisms suggest

Table 2. Standard long-term fluoxetine toxicity test datasets for effects assessment in Phase II Tier A and for use in deriving $PNEC_{SW}$

Trophic level and recommended guideline	Test species	EC50 (endpoint)	LOEC (endpoint)	NOEC (endpoint)	Guideline used	Source
Algae OECD 201	*Pseudokirchneriella subcapita*	n/a	13.6 μg/L	n/a	USEPA	Brooks et al. (2003b)
	Unknown	n/a	n/a	1 μg/L (unknown)	Unknown	FDA-CDER as cited by Webb 2004
	Desmodesmus subspicatus	2.1 μg/L[a] (biomass)	≤0.6 μg/L[a] (biomass)	< 0.6 μg/L[a] (biomass)	OECD 201	Present study[c]
Daphnid OECD 211	*Daphnia magna*	n/a	300 μg/L (reproduction)	100 μg/L (reproduction)	OECD 211	Péry et al. (2008)
		n/a	135 μg/L[b] (reproduction)	< 60 μg/L[b] (reproduction)	OECD 211	Present study[c]
		n/a	178 μg/L (reproduction)	89 μg/L (reproduction)	OECD 211	Brooks et al. (2005b)
Fish OECD 210	n/a					
Microrganisms OECD 209	n/a					

All reported concentrations are nominal unless otherwise indicated.
n/a = no data available.
[a]Effects were seen at lowest measured concentration, 0.6 μg/L.
[b]Effects were seen at lowest measured concentration, 60 μg/L.
[c]Data provided in supplementary information available online.

low acute toxicity to bacteria. Munoz-Bellido et al. (2000) reported a minimum inhibitory fluoxetine concentration of 32 mg/L was required to exert antimicrobial activity against *Corynebacterium*, and bacterial abundance in microcosms did not appear to be adversely impacted by pharmaceutical mixtures that included fluoxetine (Richards et al. 2004).

Necessity of risk assessment for the terrestrial compartment

The potential of the parent compound to contaminate soils via sewage sludge application must be assessed to evaluate whether an additional fluoxetine risk assessment for the terrestrial compartment is necessary. This path of entry into the terrestrial environment is assumed to be of relevance if the pharmaceutical sorbs strongly to sewage sludge, as indicated by the K_{OC}. If the estimated K_{OC} is >10 000 L/kg, a terrestrial risk assessment should be conducted in Phase II Tier B in addition to the aquatic risk assessment (EMEA 2006). The K_{OC} should be estimated according to standard guidelines (OECD 106, OECD 121, or OPPTS 835.1110), preferably conducted with the appropriate matrix wherever possible. Thus, when determining the sorption of a pharmaceutical to sludge and subsequent risk of soil contamination, partitioning behavior should be assessed using sludge as the matrix.

For fluoxetine, a K_{OC} of 535 L/kg was estimated according to guideline OECD 106, using digested dried sewage sludge (Monteiro 2008). Because this K_{OC} value is below the action limit of 10 000 L/kg, no risk assessment for the terrestrial compartment would be required for fluoxetine according to the current guideline (EMEA 2006). Yet Yamamoto et al. (2005) reported strong sorption of fluoxetine to activated-sewage sludge in batch experiments (K_{OC} of 13 629 L/kg, recalculated from a measured sorption of 93% and assuming an organic carbon content of 33%). Based on the Yamamoto study, an additional risk assessment for the terrestrial compartment would be required. The partitioning behavior of fluoxetine within wastewater treatment plants (WWTPs) may be highly dependent on individual sludge characteristics because it is likely influenced by the organic carbon content and the cationic exchange capacity within each sludge, as well as changes in pH and redox status within a WWTP. Consequently, a wide range of measured K_{OC} values are expected for fluoxetine across a variety of matrices. The disparity of sorption estimates reported in the literature (summarized in Table 1) indicates that estimation of fluoxetine sorption to sewage sludge remains uncertain. Consequently, estimating the probability of soil contamination with fluoxetine via sewage sludge application is similarly uncertain (Renner 2002). Regardless, no terrestrial ERA was conducted in the present case study because no data on fluoxetine toxicity to soil organisms are available in the published literature, nor were such data produced within ERAPharm. A conclusion of low risk for the terrestrial compartment would therefore be based solely on the expectation of low fluoxetine concentrations in soil.

Necessity of effects assessment for sediment organisms

Additional toxicity testing with sediment organisms is required under the European risk assessment guideline if "more than 10% of the substance at any time point after or at day 14 is present in sediment" (EMEA 2006). Several studies

have demonstrated rapid partitioning of fluoxetine from the aqueous phase to sediments (Yamamoto et al. 2005; Sánchez-Argüello et al. 2009); consequently, an assessment of effects on sediment organisms is deemed relevant and respective data will be provided within the present case study.

Necessity of assessing bioconcentration

It is often recommended that bioconcentration potential be evaluated by means of the octanol–water partition coefficient, K_{OC} (Renner 2002; EMEA 2006). If the log K_{OC} is $\geq$3, or additional criteria stated in the technical guidance document on risk assessment (European Chemical Bureau 2003) are met, "the bioconcentration factor should be considered in the Phase II Tier B assessment" (EMEA 2006). Table 1 summarizes log K_{OC} estimates by various QSAR models, as well as measured log K_{OC} values. Overall, there was a broad reported range of fluoxetine log K_{OC} values (3.82 to 4.67) spanning values indicating that bioconcentration could occur (European Chemical Bureau 2003). By definition, K_{OC} refers strictly to the neutral species; however, fluoxetine is present at environmentally relevant pH levels predominantly in cationic form. Correction for ionization at lower pH values results in much lower apparent octanol–water distribution ratios (D_{OC}; Table 1); however, D_{OC} has limited application as a metric of bioaccumulation potential (Yamamoto et al. 2005; Kwon and Armbrust 2008). According to the Technical Guidance Document (European Chemical Bureau 2003), fluoxetine meets most of the criteria for a compound with the potential for bioconcentration, because it has a log K_{OC} of $\geq$3 in the un-ionized form, is highly adsorptive, does not readily biodegrade, nor does it readily hydrolyze (Kwon and Armbrust 2006). As a consequence, the bioconcentration potential for fluoxetine should be estimated.

Phase II Tier B: Extended environmental fate and effects analysis

Bioconcentration potential of fluoxetine. The K_{OW} value for a substance such as fluoxetine, which ionizes in water at ambient pH levels (pK_a 10.06; Table 1), may not be a reliable predictor of the BCF of a compound or bioconcentration potential (European Chemical Bureau 2003; Cunningham 2004). At relevant pH conditions within WWTPs and receiving environments, fluoxetine will be present predominantly in the ionized form, hence the K_{OW} of the nonionized species will overestimate bioconcentration potential. In contrast, fluoxetine binds strongly to proteins (e.g., in human blood; Eli Lilly 2005), which is not considered when calculating BCF based on K_{OW} values alone. Metabolism of fluoxetine to norfluoxetine slightly increases the hydrophobicity and thus bioaccumulation potential (Neuwoehner et al. 2009), whereas metabolism to more polar metabolites diminishes the likelihood of bioconcentration (Webb 2004; Brooks et al. 2005a; Paterson and Metcalfe 2008). Consequently, predictions of bioconcentration and/or potential homeostatic modifications should not be based solely on the K_{OW} of the parent pharmaceutical. The liposome–water partition coefficient (D_{lipw}) has been suggested as a better estimate for the bioconcentration potential of ionic compounds (Escher et al. 2000; Lienert et al. 2007; Neuwoehner et al. 2009). All experimental and estimated log D_{lipw} (pH 7) values are >3, indicating a moderate bioaccumulation potential of fluoxetine in biological systems (Table 1).

Brooks et al. (2005a) and Ramirez et al. (2007) collected fish from a municipal wastewater-dominated stream and detected both fluoxetine and the active metabolite norfluoxetine in brain, liver, and muscle tissues at levels ranging from 0.11 to 1.58 ng g^{-1} (fluoxetine) and 1.07 to 10.27 ng g^{-1} (norfluoxetine). Similar values (0.14 to 1.02 ng g^{-1}) were detected in 2 fish species (brown bullhead, *Ameiurus nebulosus* and gizzard shad, *Dorosoma cepedianum*) collected from a wastewater-influenced lake environment (Chu and Metcalfe 2007). Unfortunately, concentrations of fluoxetine in the receiving water were not determined in either field study and, consequently, no BCF can be derived.

Adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed under laboratory conditions for 7 d to static fluoxetine solutions (pH 7.2–7.5; medium renewed daily) yielded a BCF of 74 (based on the ratio of fluoxetine concentrations in whole fish and in exposure water) and 80 (based on the ratio of uptake and depuration rate constants; Paterson and Metcalfe 2008). A second study of Japanese medaka by Nakamura et al. (2008) highlights the influence of pH on fluoxetine bioconcentration, as has recently been described for ionic substances in detail (Fu et al. 2009). After 30 d of flowthrough exposure to fluoxetine, BCFs of 13, 37, and 330 within pH environments of 7, 8, and 9, respectively, were obtained based on the ratio of fluoxetine concentration in whole fish and water (Nakamura et al. 2008). A recent study with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) yielded BCF values at 7 and 14 d of 62 and 84 (at pH 8.2) for dorsal-epaxial muscle (Zhou et al. 2008). Overall, these studies indicate a low bioconcentration potential of fluoxetine in fish, with experimentally determined BCFs falling below the threshold bioconcentration value of 500 for Phase II assessment (OECD 2001). In summary, both published studies and an assessment using the liposome–water coefficient indicate low to moderate bioaccumulation potential of fluoxetine. However, experimental data collected according to OECD guidelines would still be required to elucidate the bioaccumulation potential of fluoxetine definitively according to EMEA (2006).

Separate risk assessment for parent compound and metabolite. Fluoxetine is manufactured and prescribed in oral form as fluoxetine hydrochloride, a 50/50 racemic mixture of the *R*- and *S*-enantiomers (Eli Lilly 2006), both of which are nearly completely absorbed (Hiemke and Härtter 2000). Enantiomers of chiral compounds may differ in environmental fate and effects (Stanley and Brooks, 2009). Assessments of survival and growth in fathead minnow (*Pimephales promelas*) indicated that the *R*-enantiomer of fluoxetine is much less toxic than the *S*-enantiomer (Stanley et al. 2007). Enzymes of the cytochrome P450 complex govern stereoselective demethylation of fluoxetine to produce the primary metabolite norfluoxetine as well as several other metabolites (Hiemke and Härtter 2000; Ring et al. 2001). The application of several models predict that only 10% (Hiemke and Härtter 2000) to 24% (Lienert et al. 2007) of administered fluoxetine is excreted as the parent compound, with most excretion occurring predominantly as metabolites (63%). Consequently, norfluoxetine qualifies as a relevant metabolite (>10% of amount excreted) for a separate ERA in Phase II Tier B (EMEA 2006). Separate fate assessments for major metabolites are reasonable when the potential for environmental persistence of the parent compound is high (Cunningham 2004), as is the case with fluoxetine. The liposome–

water distribution ratio of norfluoxetine is slightly higher than that of fluoxetine with a log D_{lipw} (pH 7) of 4.08 (Neuwoehner et al. 2009), indicating assessments of the bioaccumulation potential of norfluoxetine may also be relevant. However, data on the physicochemical properties of norfluoxetine are scarce (Table 3) and toxicity data are limited, hampering the ability to conduct a separate risk assessment for this metabolite.

In an early modeling study, the predicted relative potency (RP_i) of the metabolite was only 0.347 that of the baseline toxicity associated with fluoxetine (Lienert et al. 2007). Subsequent experimental work demonstrated fluoxetine toxicity (as measured by algal growth inhibition) exceeded that of norfluoxetine by a factor of 2.8 (Neuwoehner et al. 2009). Both compounds produced higher than predicted (baseline) toxicities, indicating a specific mode of toxic action in algae. Based on comparisons among various physiological endpoints and against the mode of action of reference compounds, Neuwoehner et al. (2009) concluded that both fluoxetine and norfluoxetine exhibit limited specific toxicity on energy metabolism in algae, while exhibiting the typical response pattern of a baseline toxicant. Although these considerations indicate that a separate risk assessment for norfluoxetine should be conducted, the present case study did not perform such an ERA in the light of the paucity of both fate and effects data for norfluoxetine.

Extended fate analysis. The environmental fate of fluoxetine is largely predicated by its passage through, or removal by, municipal WWTPs. For fluoxetine, predictions of environmental behavior depend largely on divergent estimates of sorption behavior to sludge organic carbon (Table 1). As a readily ionizable substance ($pK_a = 10.06$), the partitioning of fluoxetine to organic carbon (K_{OW}) will be modified significantly by pH. When the ionization of fluoxetine is taken into account, log K_{OC} (and log K_{OW}) values do not conform to a linear regression model as do nonpolar compounds. This nonlinear behavior indicates that binding of fluoxetine to organic matter is, to a large degree, mediated not only by hydrophobic interactions but also by other mechanisms such as interactions between π-electrons, ionic interactions, and hydrogen bonding, perhaps between the functional groups of fluoxetine and clay minerals (Yamamoto et al. 2005).

Because laboratory and field-based determinations of removal of fluoxetine by activated sludge or within receiving environments are rare (Lam et al. 2005; Kwon and Armbrust 2006), models are needed to estimate removal and calculate refined PEC_{sw} values according to the guideline (EMEA 2006) using parameters that are partially empirically derived and partially modeled. A critical model input parameter, the measured matrix-specific estimates of K_{OC}, varied widely from lower values of 535 (Monteiro 2008) to higher values of 13 629 L/kg (calculated assuming 33% organic carbon in activated sludge, using elimination data of Yamamoto et al. 2005). Corresponding K_d values derived from the K_{OW} values reported above are 0.177 L/g (Monteiro 2008) and 4.13 L/g (Yamamoto et al. 2005). Because these values are critical to determine removal efficiencies from WWTPs, both extremes of these K_{OW} estimates were used to calculate refined PEC_{SW} values. Because no fluoxetine biodegradation rates were available in the published literature, a value (0.017/h) was estimated from the Primary Survey Model (PSM) Score of 3.2523 predicted by BIOWIN (Probability of Rapid Biodegradation) v. 4.10 EPISuite, USEPA, corresponding to a half-life of 8.7 d in water. Concurrent ERAPharm studies demonstrated that water half-lives are roughly 5 times higher than those in sludge, resulting in an estimated sludge half-life of 1.74 d or a biodegradation rate of 0.0165/h for fluoxetine.

Environmental fate analysis and PEC_{SW} refinements were performed using SimpleTreat™ software as recommended by EMEA (2006), as well as using a formula proposed by Joss et al. (2006). Using SimpleTreat, the local surface water concentration can be refined as:

$$PEC_{SW} = \frac{Elocalwater \cdot Fstpwater}{WasteW_{inhab} \cdot CapacitySTP \cdot Factor \cdot Dilution} \quad (2)$$

Table 3. Physicochemical properties of the metabolite norfluoxetine

CAS	56161-73-0		
Molecular formula	$C_{16}H_{16}F_3NO$		
Molecular mass	295.3 g/mol		
Water solubility	n/a		
pK_a	9.05	Calculated	Brooks et al. (2003a)
log K_{OW}	4.06 (pH 11), 2.05 (pH 7), 0.97 (pH 2)	Calculated	Brooks et al. (2003a)
log D_{lipw}(pH 7)	4.08 ± 0.01	Measured	Neuwoehner et al. (2009)
log K_{OC}	3.58 (pH 11), 1.57 (pH 7), 0.49 (pH 2)	Calculated	Brooks et al. (2003a)

where $Elocalwater = Dose_{ai} \cdot F_{excreta} \cdot F_{pen} \cdot CapacitySTP$; *Waste-W*$_{inhab}$ is the amount of wastewater, per inhabitant, per d (default value 200 L/inh d^{-1}); *CapacitySTP* is the capacity of the local STP (default 10 000 inhabitants); *Fstpwater* is the fraction of emission directed to surface water (calculated by SimpleTreat); *Dilution* is the receiving environment dilution factor (default 10); *Factor* is the adsorption to sludges in STPs (OECD 106); and, *Elocalwater* is the local emission to wastewater of fluoxetine (mg/d; calculated as the product of the average daily dose, excretion rate of the parent compound, market penetration, and STP capacity).The second calculation was performed using a simplified formula of Joss et al. (2006) as:

$$F_{stp} = \frac{1}{1 + K_d \cdot SP + k_{bio} \cdot \theta} \quad (3)$$

to generate F_{stp} for Equation 2 (rather than the *Fstpwater* generated through SimpleTreat), where K_d is the sorption coefficient to sludge (L/g), SP is specific sludge production in g suspended solid L^{-1} (typical value is 0.12 g/L), k_{bio} is the biodegradation rate in h^{-1}, and θ is the hydraulic retention time (default value is 10 h). Using these 2 models, we refined the initial PEC_{SW} for Germany, Sweden, and the United Kingdom under a worst-case and a best-case scenario based on K_{OW} assumptions (Table 4). As output from these models, both the highest (0.052 μg/L) and lowest (0.0007 μg/L) refined PEC_{SW} were obtained using the model of Joss et al. (2006), assuming low (535 L/kg) and high sorption (13 629 L/kg), respectively. Refined PEC_{SW} predictions based on the Simple Treat model did not differ significantly from those calculated using the F_{stp} of Joss et al. (2006) within the low sorption scenario, but PEC_{SW} estimates by SimpleTreat were higher than those of Joss et al. (2006) by almost an order of magnitude when assuming high sorption to sludge. Refined PEC_{SW} estimates are in the same range as those estimated by Webb (2004) and Johnson et al. (2005), as reported in Table 5. Regardless of the assumptions used to calculate the estimated PEC_{SW}, the values reported in the present study are comparable to measured environmental concentrations (Kolpin et al. 2002; Metcalfe et al. 2003b).

Risk assessment for the aquatic compartment with refined PEC$_{sw}$. The $PNEC_{SW}$ derived in Phase II Tier A of the risk assessment is compared with the refined PEC_{SW} to assess potential risks to the aquatic environment. Based on the growth inhibition of the green algae *D. subspicatus* and an assessment factor of 50, a $PNEC_{SW}$ of 0.012 μg/L was derived in Phase II Tier A. Relative to our refined PEC_{SW} of 0.0007 to 0.052 μg/L, resulting $PEC_{SW}/PNEC_{SW}$ ratios range from 0.058 to 4.33 for a best-case and a worst-case scenario, respectively. Because the risk ratio in the worst-case scenario is above 1, the possibility of risk to organisms within aquatic environments cannot be excluded.

Consideration of additional data in the aquatic risk assessment. Additional data produced within ERAPharm and/or available from published literature may yield valuable information regarding the effects of fluoxetine on aquatic organisms (Table 6). Although not conducted according to standardized guidelines, these studies nonetheless indicate the potential of fluoxetine to produce adverse effects in a variety of phyla, often at very low concentrations. A biphasic reproductive response in the freshwater snail *Physa acuta* (spawning increased at 32 μg/L, but inhibited at 250 μg/L) was recently observed with fluoxetine exposure (Sánchez-Argüello et al. 2009), suggesting specific endocrine disrupting effects at low concentrations in mollusks, with nonspecific toxicity at higher concentrations. Other studies demonstrated impacts of fluoxetine on egg production in zebrafish (*Danio rerio*) at 3.2 μg/L (Lister et al., 2009), on the induction of parturition in the bivalve *Anodonta cygnea* at 310 μg/L (Cunha and Machado 2001), on reproduction in *Daphnia magna* at 30 μg/L, on alterations in *P. antipodarum* embryo characteristics at 33 to 100 μg/L (Péry et al. 2008), and fecundity at 3.7 μg/L (Gust et al. 2009). Two other studies report reduced locomotion in *Gammarus pulex* at 0.01 μg/L (De Lange et al. 2006) and estrogenic effects in *Oryzias latipes* at 0.1 μg/L (Foran et al. 2004). However, in both studies, fluoxetine concentrations higher than the LOEC did not produce similar responses.

A dose-dependent decrease in the ability of fluoxetine-exposed hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*) to capture prey was correlated with depressions in brain 5-HT levels, but may also have been modified by appetite suppression (Gaworecki and Klaine 2008). Suppression of appetite was also observed in the studies of Stanley et al. (2007), which demonstrated a fluoxetine-induced reduction in feeding rates of fathead minnow. Similarly, the reduced growth at metamorphosis exhibited by tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to 10 μg/L fluoxetine were likely driven by reduced food intake (Conners et al. 2009). Changes in food intake and weight gain in goldfish (*Carassius auratus)* following fluoxetine exposure were correlated with changes in the expression of neuropeptides involved in feeding (Mennigen et al. 2009). Changes in estrogen receptor transcription and circulating plasma estrogens provide evidence that fluoxetine exposure affects both feeding and reproductive processes in this species (Mennigen et al. 2008,

Table 4. $PEC_{SURFACEWATER}$ Refinement Phase II Tier B

	K_{OC} (sludge)	Sweden	Germany	United Kingdom
PEC_{SW} (EMEA 2006)	535[a]	8.5 ng/L	9.8 ng/L	49 ng/L
PEC_{SW} (Joss et al. 2006)	535[a]	9.0 ng/L	10.4 ng/L	52 ng/L
PEC_{SW} (EMEA 2006)	13 629[b]	3.7 ng/L	4.3 ng/L	22 ng/L
PEC_{SW} (Joss et al. 2006)	13 629[b]	0.7 ng/L	0.8 ng/L	4.1 ng/L

[a]Monteiro (2008) measured K_{OC} in sludge (L/kg).
[b]Yamamoto et al. (2005) measured removal/calculated K_{OC} in sludge, derived from 93.1% removal estimate (L/kg).

Table 5. Summary of estimated PEC values and PECs reported in literature

PEC type	PEC value (µg/L)	Estimation	Reference
initial $PEC_{SURFACEWATER}$	0.40	In Phase I according to EMEA (2006) with default market penetration factor	Present study
Initial $PEC_{SURFACEWATER}$	0.010– 0.059	In Phase I according to EMEA (2006) with European prescription data	Present study
Initial $PEC_{GROUNDWATER}$	0.00–0.015	In Phase II Tier A according to EMEA (2006)	Present study
refined $PEC_{SURFACEWATER}$	See Table 4	In Phase II Tier B according to EMEA (2006)	Present study
PEC for US surface water	0.439	Based on consumption data US (2000); no metabolism, no degradation, and no dilution assumed	Brooks et al. (2003a)
Initial $PEC_{SURFACEWATER}$	0.37	Based on consumption data UK (1995); no metabolism, no degradation, and no dilution assumed	Webb (2004)
Initial $PEC_{SURFACEWATER}$	0.23	Based on consumption data Canada; no metabolism, no degradation, and no dilution assumed	Johnson et al. (2005)
Initial $PEC_{SURFACEWATER}$	0.22	Based on maximum daily dose and default market penetration; no metabolism, no degradation, and dilution factor 10 assumed	Johnson et al. (2005)
Refined $PEC_{SURFACEWATER}$	0.003	Based on consumption data UK (1995); 91% removal in WWTP and dilution factor 10 assumed	Webb (2004)
Refined $PEC_{SURFACEWATER}$	0.019	Based on consumption data Canada; 22.58% removal in WWTP assumed, 99^{th} centile of modeled dilution	Johnson et al. (2005)
Refined $PEC_{SURFACEWATER}$	0.182	Based on maximum daily dose and default market penetration; 22.58% removal in WWTP assumed, 99^{th} centile of modeled dilution	Johnson et al. (2005)

2009). With many of these nonstandardized studies reporting endocrine-mediated responses, subtle reproductive effects may be occurring in exposed organisms at environmentally relevant fluoxetine concentrations.

Inclusion of these nonstandardized data would not change the outcome of the ERA for fluoxetine according to the guideline (EMEA 2006) because the NOEC-substitute value derived from the green algae test already resulted in a risk quotient of >1. However, these additional data indicate the potential that more sensitive species or endpoints may be missed by the standardized tests employed in the risk assessment. Assessment factors are applied to address such inherent uncertainties in extrapolating across species and from single species laboratory data to multispecies ecosystems, with the magnitude of the assessment factor applied contingent upon the confidence that $PNEC_{SW}$ is, in fact, representative of the most sensitive phyla from various trophic levels, taxonomic groups, and feeding strategies (European Chemical Bureau 2003). In the case of fluoxetine, the use of the conservative assessment factor of 50 appears to fully compensate for the potential to miss effects on more sensitive species or endpoints. Consequently, the standardized test set was sufficient to detect potential risks, whereas nonstandardized assessments suggest specific mechanisms of toxicity, as well as species which may be more sensitive to the effects of fluoxetine in the long term. Both standardized and nonstandardized tests confirm that the derived $PNEC_{SW}$ of 0.012 µg/L is representative and

Table 6. Additional effect data of fluoxetine (nominal concentrations) on other species, nonstandard endpoints or higher-tier systems

Test	Species	Endpoint	LOEC	NOEC	Source
Single species	*Lemna gibba* (macrophyte)	Several growth parameters	No effect at 10–1000 µg/L	n/a	Brain et al. (2004)
Single species, transgenerational	*Daphnia magna* (Cladocera)	Reduction of growth and reproduction in F1	31 µg/L	8.9 µg/L	Péry et al. (2008)
Single species	*C. dubia* (Cladocera)	Reduction of reproduction	112 µg/L	56 µg/L	Brooks et al. (2003a)
Single species	*Ceriodaphnia dubia* (Cladocera)	Reduction of reproduction	447 µg/L	89 µg/L	Henry et al. (2004)
Single species	*Hyalella azteca* (Amphipoda)	Reduction of survival, growth, and reproduction	100 µg/L (growth), no effect on survival and reproduction	33 µg/L (growth); ≥100 µg/L (survival, reproduction)	Péry et al. (2008)
Single species	*Potamopyrgus antipodarum* (Gastropod)	Embryos production	3.7 µg/L	n/a	Gust et al. (2009)
Single species	*Valvata piscinalis* (Gastropod)	Reproduction	n/a	100 µg/L	Gust et al. (2009)
Single species, reproductive behavior	*Anodonta cygnea* (Bivalve)	Increase in parturition (release of larvae)	0.31 mg/L (maximum effect)	n/a	Cunha and Machado (2001)
Single species, reproductive behavior	*Dreissena polymorpha* (Bivalve)	Induction of spawning	154.5 µg/L (males); 1545 µg/L (females)	30.9 µg/L (males), 309 µg/L (females)	Fong (1998)
Single species, reproductive behavior	*Sphaerium striatum* (Bivalve)	Induction of parturition (release of larvae)	no effect between 0.31 - 30.9 mg/L	≥ 30.9 mg/L	Fong et al. (1998)
Single species, sexual behavior	*Biomphalaria glabrata* (Pulmonata)	Increase in preputium eversion	3.1 mg/L	0.31 mg/L	Fong et al. (2005)
Single species, behavior	*Physa elliptica* (Pulmonata)	Cilia rotation	0.31 µg/L (increase); 31 µg/L (reduction)	n/a	Uhler et al. (2000)
Single species	*P. antipodarum* (Prosobranchia)	Reproduction	16 µg/L	3.2 µg/L	Nentwig (2007)
Single species, embryo development	*P. antipodarum* (Prosobranchia)	Increase in ratio unshelled to shelled embryos	3.2 µg/L	0.64 µg/L	Nentwig (2007)
Single species	*P. antipodarum* (Prosobranchia)	Reduction in number newborn	100 µg/L	33 µg/L	Péry et al. (2008)

(*Continued*)

Table 6. (Continued)

Test	Species	Endpoint	LOEC	NOEC	Source
Single species, embryo development	*P. antipodarum* (Prosobranchia)	Increase in ratio unshelled to shelled embryos	69 µg/L	13 µg/L	Péry et al. (2008)
Multispecies, waterborne exposure in water–sediment system	*Physa acuta*, *Chironomus riparius*, *D. magna*	Reduction in egg mass production (*P. acuta*), reduction in cumulative emergence of F0 and F1 (*C. riparius*), population growth (*D. magna*)	*P. acuta*: 250 µg/L, *C. riparius*: 31.25 µg/L	*P. acuta*: 125 µg/L, *C. riparius*: 31.25 µg/L	Sánchez-Argüello et al. (2009)
Microcosms, waterborne exposure in water–sediment system	Zooplankton and phytoplankton	Community parameters by principal response curve	No effect at 10–100 µg/L	≥10 µg/L	Sánchez-Argüello et al. (2009)
Single species, reproductive parameters	*Oryzias latipes* (Teleostei)	Egg production, rate of fertilization and spawning, hatching success of fertilized eggs, developmental deformities, circulating steroids, in vitro steroidogenesis, gonadosomatic index, vitellogenin	Elevated plasma estradiol level at 0.1 µg/L, no other effects at 0.1–5 µg/L	Observed effect only at lowest tested concentration	Foran et al. (2004)
Single species	*Danio rerio* (Teleostei)	Reduced egg production	3.2 µg/L	0.32 µg/L	Lister et al. (2009)

n/a = not available.

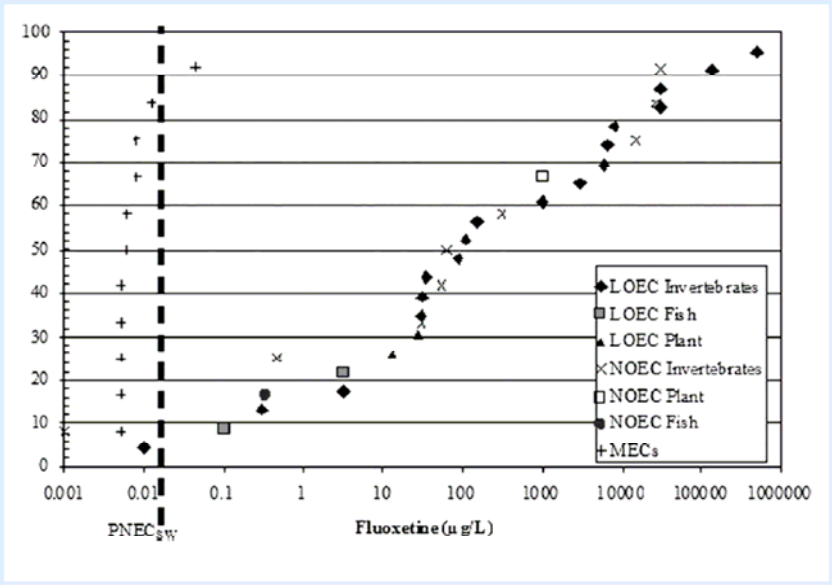


Figure 1. Measured environmental concentrations (MECs, µg/L) of the sum of fluoxetine and norfluoxetine (if the latter was detected) in surface water samples collected from Canada and the United Kingdom, with ranked biological no and low observed effect concentration thresholds (NOECs and LOECs, respectively). MEC, NOEC, and LOEC values were obtained from published literature data. Dashed line = predicted no effect concentration for surface water (PNEC$_{SW}$).

conservative enough to be used in the ERA of fluoxetine. However, uncertainties in estimating the fate of fluoxetine, as expressed in the broad range of derived PEC$_{SW}$ estimates, preclude a definitive conclusion on the risk of fluoxetine to organisms in aquatic environments.

Probabilistic risk assessment for the aquatic environment. NOEC and LOEC values are plotted relative to Canadian and United Kingdom datasets of measured environmental fluoxetine concentrations (MEC$_{SW}$) and the derived PNEC$_{SW}$ as a preliminary risk assessment (Figure 1). While fluoxetine was not detected in many surface water samples, monitoring data from published sources also reported concentrations exceeding the PNEC$_{SW}$. Although MEC$_{SW}$ values exceeding the PNEC$_{SW}$ are suggestive of potential environmental impacts, it should be noted that the vast majority of estimated LOECs represent concentrations well above those routinely detected in the environment (Figure 1). Many of the higher MEC$_{SW}$ were found in samples collected in close proximity to a WWTP discharge. The measured $K_{OC\,sediment}$ values (Table 1) and rapid disappearance of SSRI values below WWTP discharges (Metcalfe et al. 2010) suggest fairly rapid partitioning of fluoxetine to the sediments, indicating MEC$_{SW}$ values collected adjacent WWTPs overestimate the risk fluoxetine may pose to surface waters in general.

Risk assessment for the sediment compartment. An investigation of the potential impacts on sediment-dwelling organisms is requested under the current EU risk assessment framework if a compound demonstrates significant partitioning from the aqueous to the sediment phases (EMEA 2006). To date, few standardized studies evaluating the impact of fluoxetine on aquatic organisms associated with the sediments are reported (Table 7). Initial assessments evaluated *Hyallela azteca* and *Chironomus tentans* exposed for 10 d to sediment concentrations of ≤22.4 and 43.2 mg fluoxetine/kg, respectively (Brooks et al. 2003b). The sediment-derived LC50 for C. *tentans* was 15.2 mg/kg, with a LOEC$_{growth}$ of 1.4 mg/kg, while the sediment derived LC50 for *H. azteca* was >43.2 mg/kg and growth was impaired in all treatments, yielding a LOEC of 5.4 mg/kg (Brooks et al. 2003a). Because *H. azteca* is epibenthic, it is likely that dietary exposure to fluoxetine was less than that experienced by C. *tentans* burrowing directly into the sediment and this, rather than inherent species sensitivities, may contribute to the differing LC_{50} values in sediment (Brooks et al. 2003a). A more recent study by Nentwig (2007) exposed *Chironomus riparius* and the oligochaete *Lumbriculus variegatus* to sediments spiked with fluoxetine ≤5.86 mg/kg. Fluoxetine had no effect on emergence of C. *riparius* except at the highest concentration evaluated (5.86 mg/kg sediment), a concentration where there was also a significant increase in eggs per clutch (Nentwig 2007). The LOEC for C. *riparius* was reported as 1.12 mg/kg sediment, using reduction in emergence as an endpoint (Nentwig 2007). Sánchez-Argüello et al. (2009) similarly found no differences in emergence of C. *riparius* within the F_0 generation, although the sex ratio appeared to be skewed toward females. The lowest fluoxetine concentration employed in this study (32 µg/L corresponding to 0.17 mg/kg measured sediment concentrations at the end of the test) significantly reduced emergence of F_1 C. *riparius* (Sánchez-Argüello et al. 2009). Because higher treatments produced no significant effects, the toxicological relevance of these data must be interpreted with care. Growth in C. *tentans*, which was inhibited at 1.4 mg/kg, appears to be the most sensitive endpoint for fluoxetine (Brooks et al. 2003a). However, considerable variation was observed for effective sediment concentrations even within the same species (Péry et al. 2008; Nentwig 2007; Table 7), perhaps reflecting the influence of sediment parameters or differences in testing protocols.

Table 7. Effects of fluoxetine (nominal concentrations) on sediment organisms

Species	LOEC (endpoint)	NOEC (endpoint)	Source	Guideline
Hyalella azteca Amphipod	5.4 mg/kg (growth) >43.2 mg/kg (reproduction)	<5.4 mg/kg (growth) ≥43.2 mg/kg (reproduction)	Brooks et al. (2003a)	USEPA (2000)
Chironomus tentans Insect larvae	1.4 mg/kg (growth)	<1.4 mg/kg (growth)	Brooks et al. (2003a)	USEPA (2000)
Chironomus riparius Insect larvae	666 mg/kg (survival, growth, emergence, reproduction)	59.5 mg/kg (survival, growth, emergence, reproduction)	Péry et al. (2008)	OECD 218
Chironomus riparius Insect larvae	5.86 mg/kg (emergence)	2.34 mg/kg (emergence)	Nentwig (2007)	OECD 218
Lumbriculus variegates Freshwater worm	No adverse effects	n/a	Nentwig (2007) control did not meet validity criteria	OECD 218

Because NOEC data for sediment-dwelling organisms encompassing 3 different living and feeding strategies are available (amphipods, oligochaetes, insects), an assessment factor of 10 is specified by the Technical Guidance Document (European Chemical Bureau 2003). However, issues may surround the control treatment in the oligochaete study (and despite the finding of no adverse effects); therefore, it is prudent to assume that there is reliable data for only 2 different species representing different living and feeding conditions, resulting in an assessment factor of 50 being applied. Consequently, using the NOEC of $<1.4\ mg\ kg^{-1}$ and an assessment factor of 50, we arrive at an empirically derived $PNEC_{sediment}$ of <28 μg/kg. Calculation of the $PEC_{sediment}$ is not specified in the current guideline (EMEA 2006) and was therefore performed using the default values according to the technical guidance document on risk assessment (European Chemical Bureau 2003). $PEC_{sediment}$ will vary with both the PEC_{SW} estimate and the $K_{OCsediment}$ value used. As a component of ERAPharm, $K_{OCsediment}$ was assessed according to the OECD 106 test methodology (Monteiro 2008; Table 1). However, the derived K_{OC} values used to calculate $PEC_{sediment}$ may yield an underestimation as even following 48 h of equilibration, sorption did not plateau. Because a lower or higher PEC_{SW} value is a direct determinant of the $PEC_{sediment}$ estimate, we used the lowest and highest refined PEC_{SW} estimates of 0.0007 μg/L and 0.052 μg/L, respectively, together with the $K_{OCsediment}$ value for low organic carbon-containing sediments (1% organic carbon dry weight; cation exchange capacity 6.1 mEq 100 g^{-1}) of 10 400 L/kg and the value for high organic carbon content sediments (4% organic carbon dry weight; cation exchange capacity 18.5 mEq 100 g^{-1}) of 8200 L/kg. The lowest $PEC_{sediment}$ value was calculated using the high organic carbon $K_{OCsediment}$ combined with the PEC_{SW} of 0.7 ng/L, which yields a $PEC_{sediment}$ of 0.125 μg/kg. At the other extreme, the highest $PEC_{sediment}$ value was calculated using the low organic carbon $K_{OCsediment}$ with the PEC_{SW} estimate of 0.052 μg/L, which yields a $PEC_{sediment}$ of 11.8 μg/kg. The much higher measured K_{OC} values reported by Kwon and Armbrust (2008) of 2 417–15 356 L/kg (using ranges of organic carbon in sediment of 0.16% to 0.65%) would have resulted in much higher $PEC_{sediment}$ estimates than those measured according to OECD 106 methodologies and expanded the calculated range for the $PEC_{sediment}$ (0.125–11.8 μg/kg) considerably. However, K_{OC} may not be a reliable predictor of fluoxetine $PEC_{sediment}$, because ionization under ambient pH environments implies that partitioning of this cation to sediments may depend less on hydrophobicity than on other parameters such as cation exchange capacity. The risk quotient (PEC/PNEC) for the sediment compartment ranges from 0.0045 to >0.42. Although this range is below the trigger of 1 and hence does not indicate cause for concern, the uncertainty inherent in both the exposure assessment and the PNEC of <28 μg/kg cannot reliably exclude a potential toxic risk to sediment-dwelling organisms exposed to fluoxetine.

Mixture toxicity. Fluoxetine is expected to enter aquatic environments almost exclusively via municipal wastewater effluents (or potentially as runoff from biosolids applied to agricultural land); therefore, exposure to aquatic organisms would rarely be as a single compound, but rather as a complex mixture, often of dynamic composition. Consequently, there is potential for other constituents in the effluent to modify effects seen in single compound studies through competitive exclusion of protein binding sites and receptors. Alternatively, other municipal wastewater effluent constituents could enhance the specific and nonspecific toxicity of fluoxetine by impairing its metabolism, or fluoxetine may inhibit degradation of other compounds metabolized by either cytochrome (CYP) P450 isozymes or monoamine oxidase (Sloley 2004; Rewitz et al. 2006).

Studies of SSRI mixtures (fluoxetine, citalopram, paroxetine, fluvoxamine, and setraline) of varying ratios and compositions using the freshwater algae *Pseudokirchneriella subcapita*, produced additive effects with no indication of synergism or antagonism (Christensen et al. 2007). Similarly, fluoxetine and its metabolite norfluoxetine exhibited additive effects in algae that were consistent with the concept of concentration addition (Neuwoehner et al. 2009). From an environmental risk perspective, such additivity may be important, because complex mixtures containing compounds with a similar mechanism of action could produce effects in exposed organisms commensurate (or approximately so, depending on efficacy), with the sum of their parts. A recent survey of a Canadian municipal wastewater effluent receiving environment measured fluoxetine at approximately 1% (0.02 μg/L) of the total SSRIs (including venlafaxine, citalopram, sertraline, fluoxetine, and their bioactive, demethylated metabolites) which exceeded 2 μg/L (Metcalfe et al., 2010). Under such conditions, a mechanism-based, rather

than compound-specific risk assessment may have merit. Goldfish and fathead minnow exposed to a mixture of fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline (≤100 µg/L concentrations) for 35 d demonstrated EC10 values for increased liver size (determined using a 4-parameter logistic model) of 48 and 270 nM, respectively, in what is one of the lowest effects attributable to SSRIs (Johnson 2004). In other reports, a mixture of fluoxetine (36 µg/L) and clofibric acid (100 µg/L) yielded no apparent effects when tested individually in *D. magna* but produced significant mortality as a mixture (Flaherty and Dodson 2005). Potentially toxic interactions between fluoxetine and β-blockers such as propranolol have also been postulated, likely via inhibition of lipophilic β-blockers by fluoxetine (Drake and Gordon 1994). An additional study using primarily non-SSRI mixtures (ibuprofen and ciprofloxacin) with fluoxetine in microcosms found decreases in phytoplankton and zooplankton diversity but increases in abundance at higher doses (600 and 1000 µg/L; Richards et al. 2004). However, it is difficult to attribute effects in this non-SSRI mixture study to fluoxetine, because effects of individual compounds were not examined (Richards et al. 2004). Relative to other SSRIs evaluated in single compound exposures (citalopram, paroxetine, fluvoxamine, and setraline), fluoxetine was only moderately toxic to *D. magna* suggesting the toxicity in the Flaherty and Dobson (2005) study may be related to fluoxetine enhancing the toxicity of clofibric acid (Christensen et al. 2007).

Tailored testing strategy. The mode of action of a pharmaceutical tailored to elicit a specific biological response in humans may likewise facilitate specific effects in nontarget organisms that might not be detected in standard toxicity tests (Choi et al. 2003; Williams 2005; Fent et al. 2006). Biochemical interactions in target and nontarget tissues, side effects, and dose responses of potential pharmaceuticals are studied intensively in humans and laboratory mammals during the drug development and safety evaluation process. Using a mechanism-based approach, existing data may be useful to guide research efforts when assessing potential specific effects in nontarget organisms such as aquatic invertebrates and fish (Huggett et al. 2003; Carvalho et al. 2004; Williams et al. 2005; Tarazona et al. this issue). The recent review of Kreke and Dietrich (2008) gives an excellent overview of the expected potential effects of fluoxetine in fish based on the physiology of the highly conserved serotonin re-uptake mechanism shared with mammals. While a mechanism-based approach presents obvious advantages for fish and other groups with similarly conserved biochemical mechanisms as humans, this approach encounters drawbacks in other phyla. In invertebrates and unicellular organisms, biochemical mechanisms may be dissimilar to those of humans, and our knowledge of alternative targets is limited. The apparent specific toxicity of fluoxetine and norfluoxetine toward green algae (occurring at concentrations in many cases lower than those causing effects in fish) represents an interesting example of diverging modes of actions of a pharmaceutical in different phyla. Given the intended therapeutic mode of action for fluoxetine, a tailored testing strategy would likely focus on fish, rather than on algal species. Whereas tailoring ERAs is a valuable approach (Tarazona et al. this issue), restricting the testing strategy to investigate only potential effects suggested by the mode of action in humans may overlook unexpected effects such as those observed for fluoxetine in algae.

CONCLUSIONS

The serotonin re-uptake inhibitor fluoxetine was selected as a case study compound within ERAPharm for environmental risk assessment. Environmental persistence and unique properties as an ionizable compound reinforced the selection of fluoxetine as an important candidate for evaluation against the European risk assessment guidelines that recently came into force (EMEA 2006). This current framework, when applied to fluoxetine, provided effects assessment estimates consistent with nonstandard test species and endpoints. After refinement of the PEC_{SW}, the PEC/PNEC ratio was still above the trigger value of 1 under worst-case exposure scenarios, which indicated a potential risk to organisms in the surface water compartment. Similarly, the potential risk of fluoxetine to sediment-dwelling organisms could not be excluded. No risk assessment was conducted for the terrestrial compartment due to a lack of effects data for fluoxetine on soil organisms. No concern was identified with respect to groundwater or microorganisms within the present case study. Exposure assessments for fluoxetine according to the current framework rely heavily on K_{OC} and K_{OW} values. Dependence on partition coefficients developed for nonionic substances can be misleading for weak bases such as fluoxetine, and alternative risk assessment strategies must be developed for compounds which readily ionize at environmentally relevant pH ranges. Because this exposure assessment was hampered by substantial uncertainties, the environmental risk of fluoxetine to the various compartments must still be considered preliminary. Continued testing using higher-tier approaches such as species sensitivity distributions and microcosm studies would allow for further refinement on the effects side of the risk assessment. Yet, in light of the uncertainty surrounding the exposure component of the risk assessment, further research into the environmental fate of fluoxetine is considered of higher relevance. Developing new methods to better predict the fate of ionizable compounds such as fluoxetine is highly recommended, particularly in view of projected increases in SSRI prescription volumes and the considerable representation of ionizable compounds among current pharmaceuticals. An additional option would be monitoring programs within the EU to confirm the presence or absence of fluoxetine-related environmental risks.

Acknowledgment—ERAPharm was funded by the European Commission under the 6th Framework Programme (Contract 511135). The authors thank the anonymous reviewers, whose constructive comments improved the quality of the manuscript and acknowledge the experimental work conducted by colleagues from the ERAPharm consortium (see http://www.erapharm.org). This work has also been financially supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, the Canadian Water Network, and the Canada Research Chairs Program. The views expressed herein by the authors are their own and do not necessarily reflect the views or policies of their respective agencies.

REFERENCES

Adlard M, Okafo G, Meenan E, Camilleri P. 1995. Rapid estimation of octanol–water partition coefficients using deoxycholate micelles in capillary electrophoresis. *J Chem Soc Chem Commun* 21:2241–2243.

Balon K, Riebesehl BU, Muller BW. 1999. Drug liposome partitioning as a tool for the prediction of human passive intestinal absorption. *Pharm Res* 16:882–888.

Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Sanderson H, Sibley PK, Solomon KR. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven day static-renewal test. *Environ Toxicol Chem* 23:371–382.

Brooks BW, Foran CM, Richards SM, Weston J, Turner PK, Stanley JK, Solomon KR, Slattery M, La Point TW. 2003a. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett* 142:169–183.

Brooks BW, Turner PK, Stanley JK, Weston JJ, Glidewell EA, Foran CM, Slattery M, La Point TW, Huggett DB. 2003b. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* 52:135–142.

Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ. 2005a. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem* 24:464–469.

Brooks BW, Richards SM, Weston J, Turner PK, Stanley JK, La Point TW, Brain RA, Glidewell EA, Massengale ARD, Smith W, Blank CL, Solomon KR, Slattery M, Foran CM. 2005b. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine: a review of recent research. In: Dietrich D, Webb S, Petry T, editors. Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment. New York (NY): Academic/Elsevier, p 165–187.

Carvalho F, Barros D, Silva J, Rezende E, Soares M, Fregoneze J, De Castro E, Silva E. 2004. Hyperglycemia induced by acute central fluoxetine administration: role of the central CRH system and 5-HT3 receptors. *Neuropeptides* 38:98–105.

Choi BH, Choi J-S, Ahn HS, Kim MJ, Rhie DJ, Yoon SH, Min DS, Jo YH, Kim MS, Hahn SJ. 2003. Fluoxetine blocks cloned neuronal A-type K+ channels Kv1.4. *NeuroReport* 14:2451–2455.

Christensen AM, Faaborg-Andersen S, Ingerslev F, Baun A. 2007. Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environ Toxicol Chem* 26:85–91.

Chu S, Metcalfe CD. 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1163:112–118.

Conners DE, Rogers ED, Armbrust KL, Kwon J-K, Black MC. 2009. Growth and development of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and sertraline, throughout metamorphosis. *Environ Toxicol Chem* 28:2671–2676.

Cunha EM, Machado J. 2001. Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Can J Zool* 79:95–100.

Cunningham VL. 2004. Special characteristics of pharmaceuticals related to environmental fate. In: Williams RT, editor. Human pharmaceuticals: assessing the impacts on aquatic ecosystems. Pensacola (FL): SETAC.

De Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lürling M, Peeters ETHM. 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 78:209–216.

Dollery C, Boobis AR, Burley D, Davies DM, Davies DS, Harrison PI, Orme MLE, Park BK, Goldberg LI. 1991. Therapeutic drugs. New York (NY): Churchill Livingstone.

Drake WM, Gordon GD. 1994. Heart block in a patient on propranolol and fluoxetine. *Lancet* 343:425–426.

Eli Lilly. 2005. Fluoxetine hydrochloride capsules and tablets. Material safety data sheet. Indianapolis (IN): Eli Lilly.

Eli Lilly, 2006. Fluoxetine, approved labeling enclosure. Approved by US Food and Drug Administration. Indianapolis (IN): NDA 18-936/S-064.

EMEA, 2006. Guideline on environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc Ref EMEA/CHMP/SWP/4447/00. London (UK): European Medicines Agency.

Escher BI, Schwarzenbach RP, Westall JC. 2000. Evaluation of liposome–water partitioning of organic acids and bases. I. Development of a sorption model. *Environ Sci Technol* 34:3954–3961.

European Chemicals Bureau. 2003. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on Risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. European Commission Joint Research Centre. Eur 20418.

Fent K, Weston AA, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76:122–159.

Flaherty CM, Dodson SI. 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61:200–207.

Fong PP. 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol Bull* 194:143–149.

Fong PP, Huminski PT, D'Urso LM. 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *J Exp Zool* 280:260–264.

Fong PP, Olex AL, Farrell JE, Majchrzak RM, Muschamp JW. 2005. Induction of preputium eversion by peptides, serotonin receptor antagonists, and selective serotonin reuptake inhibitors in *Biomphalaria glabrata*. *Invertebr Biol* 124:296–302.

Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, Huggett DB. 2004. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:511–517.

Fu W, Franco A, Trapp S. 2009. Methods for estimating the bioconcentration factor of ionizable organic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 28:1372–1379.

Gaworecki KM, Klaine SJ. 2008. Behavioural and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquat Toxicol* 88:207–213.

Gust M, Buronfosse T, Giamberini L, Ramil M, Mons R, Garric J. 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch molluscs: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ Pollut* 157:423–429.

Henry TB, Kwon J-W, Armbrust KL, Black MC. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem* 23:2229–2233.

Hiemke C, Härtter S. 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 85:11–28.

Huggett DB, Cook JC, Ericson JF, Williams RT. 2003. A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum Ecol Risk Assess* 9:1789–1799.

[IA] Interactive Analysis. 2007. LogP Predictor Program. 08/2007. http://www.logp.com/IMS Health AG 2002. Chemical Country Profile Germany 2000–2001 . Frankfurt, Germany.

Johnson DJ. 2004. Risk assessment of selective serotonin reuptake inhibitors: comparing methods in tiered environmental risk assessment. [MSc thesis]. Guelph (ON), Canada: Univ of Guelph.

Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, Wilson CJ, Bestari KT, Solomon KR. 2005. Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regul Toxicol Pharm* 42:313–323.

Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, Wilson CJ, Solomon KR. 2007. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:128–139.

Joss A, Zabczynski S, Göbel A, Hoffmann B, Löffler D, McArdell CS, Ternes TA, Thomsen A, Siegrist H. 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Res* 40:1686–1696.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211.

Kreke N, Dietrich DR. 2008. Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit Rev Toxicol* 37:215–247.

Kwon J-W, Armbrust KL. 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem* 25:2561–2568.

Kwon J-W, Armbrust KL. 2008. Aqueous solubility, *n*-octanol–water partition coefficient, and sorption of five selective serotonin reuptake inhibitors to sediments and soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 81:128–135.

Laenge R, Steger-Hartmann T, Schweinfurth H. 2006. The environmental risk assessment of human pharmaceuticals in the overall EU regulatory affairs process. *Regul Toxicol Pharmacol* 45:223–228.

Lam MW, Young CJ, Mabury SA. 2005. Aqueous photochemical reaction kinetics and transformation of fluoxetine. *Environ Sci Technol* 39:513–522.

Lienert J, Güdel K, Escher BI. 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environ Sci Technol* 41:4471–4478.

Lister A, Regan C, Van Zwol J, Van Der Kraak GJ. 2009. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic perspective. *Aquat Toxicol* 95:320–329.

Mennigen JA, Martyniuk CJ, Crump K, Xiong H, Zhao E, Popesku J, Anisman H, Cossins AR, Xia X, Trudeau VL. 2008. Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Genom* 35:273–282.

Mennigen JA, Harris EA, Chang JP, Moon TW, Trudeau VL. 2009. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regul Pept* 155:99–104.

Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R. 2003a. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem* 22:2872–2880.

Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J. 2003b. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem* 22:2881–2889.

Metcalfe CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ Toxicol Chem* 29:79–89.

Monteiro SC. 2008. Fate of human-use pharmaceuticals in the soil environment. [PhD thesis]. Heslington, York, (UK): Univ of York.

Munoz-Bellido JL, Munoz-Criado S, Garcia-Rodriguez JA. 2000. Antimicrobial activity of psychotropic drugs, selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Antimicrob Ag* 14:177–180.

Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N. 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70:865–873.

Nentwig G. 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II. The antidepressant drug fluoxetine. *Arch Environ Contam Toxicol* 52:163–170.

Neuwoehner J, Fenner K, Escher BI. 2009. Physiological modes of action of fluoxetine and its human metabolites in algae. *Environ Sci Technol* 43:6830–6837.

[OECD] Organisation for Economic Co-operation and Development. 2001. Guidance document on the use of the harmonised system for the classification of chemicals which are hazardous for the aquatic environment. OECD Series on Testing and Assessment 27. Paris (FR): OECD.

Paterson G, Metcalfe CD. 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74:125–130.

Péry ARR, Gust M, Vollat B, Mons R, Ramil M, Fink G, Ternes T, Garric J. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* 73:300–304.

Ramirez AJ, Mottaleb MA, Brooks BW, Chambliss CK. 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79:3155–3163.

Renner R. 2002. The K_{OW} controversy. *Environ Sci Technol* 36:410–413A.

Rewitz KF, Styrishave B, Lobner-Olsen A, Andersen O. 2006. Marine invertebrate cytochrome P450: emerging insights from vertebrate and insects analogies. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143:363–381.

Richards SM, Wilson CJ, Johnson DJ, Castle DM, Lam M, Mabury SA, Sibley PK, Solomon KR. 2004. Effects of pharmaceutical mixtures in aquatic microcosms. *Environ Toxicol Chem* 23:1035–1042.

Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, Binkley SN, VandenBranden M, Wrighton SA. 2001. Identification of the human P450 cytochromes responsible for in vitro formation of *R*- and *S*-norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1044–1050.

Sánchez-Argüello P, Fernández C, Tarazona JV. 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata), and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. *Sci Total Environ* 407:1937–1946.

Sebastine IM, Wakeman RJ. 2003. Consumption and environmental hazards of pharmaceutical substances in the UK. *Trans Chem* 81B:229–235.

Sloley BD. 2004. Metabolism of monoamines in invertebrates: the relative importance of monoamine oxidase in different phyla. *Neurotoxicology* 25:175–183.

SRC. 2007a. Interactive LogKOW (KOWWin) Demo, Syracuse Research Corporation. 08/2007. Avaible from: http://www.syrres.com/esc/est_kowdemo.htm

SRC. 2007b. SRC PhysProp Database, Syracuse Research Corporation. 07/2007. Avaible from: http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm

Stanley JK, Brooks BW. 2009. Perspectives on ecological risk assessment of chiral compounds. *Integr Environ Assess Manag* 5:364–373.

Stanley JK, Ramirez AJ, Chambliss CK, Brooks BW. 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69:9–16.

Tarazona JV, Escher BI, Giltrow E, Sumpter J, Knacker T. 2010. Targeting the environmental risk assessment of pharmaceuticals: facts and fantasies. *Integr Environ Assess Manag* 6:603–613 (this issue).

Uhler GC, Huminski PT, Les FT, Fong PP. 2000. Cilia-driven rotational behavior in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *J Exp Zool* 286:414–421.

VCCLAB. 2005. ALOGPS 2.1 program. Virtual Computational Chemistry Laboratory, 08/2007. Avaible from: http://www.vcclab.org

Wan H, Rehngren M, Giordanetto F, Bergstrom F, Tunek A. 2007. High-throughput screening of drug-brain tissue binding and in silico prediction for assessment of central nervous system drug delivery. *J Medicinal Chem* 50:4606–4615.

Webb SF. 2004. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. II. Aquatic risk characterisation. In: Kümmerer K, editor. Pharmaceuticals in the environment 2nd ed. Berlin (DE): Springer.

[WHO] World Health Organization. 2007. ATC index with DDDs and guidelines for ATC classification and DDD assignment. Oslo, Norway: World Health Organisation, Collaborating Center for Drug Statistics Methodology.

Williams RT. 2005. Human health pharmaceuticals in the environment—an introduction. In Williams RT, editor. Human pharmaceuticals: assessing the impacts on aquatic ecosystems. Pensacola (FL): SETAC.

Williams RT, Huggett DB, Sager NB. 2005. Human drug development and registration, including an example of how environmental safety is evaluated. In: Williams RT, editor. Human pharmaceuticals: assessing the impacts on aquatic ecosystems. Pensacola (FL): SETAC.

Yamamoto H, Hayashi A, Nakamura Y, Sekizawa J. 2005. Fate and partitioning of selected pharmaceuticals in aquatic environment. *Environ Sci* 12:347–358.

Zhou SN, Oakes KD, Servos MR, Pawliszyn J. 2008. Application of solid-phase microextraction for in vivo laboratory and field sampling of pharmaceuticals in fish. *Environ Sci Technol* 42:6073–6079.

C / BIOACCUMULATION DE LA FLUOXÉTINE ET NORFLUOXÉTINE CHEZ P. ANTIPODARUM ET V. PISCINALIS

A la suite de l'exposition à la fluoxétine, nous avons essayé de comprendre l'origine des différences de sensibilités entre les deux organismes modèles. Différentes hypothèses ont été avancées. L'une d'entre elles reposait sur l'existence d'une différence interspécifique dans la capacité métabolique de la fluoxétine. Comme le métabolite majoritaire de la fluoxétine chez les mamifères, la norfluoxétine, est biologiquement plus actif que le produit parental (Hiemke et Hartter 2000), une métabolisation accrue, pourrait s'accompagner d'une toxicité supérieure. Ceci est d'autant plus vrai que ce métabolite présente, chez les mammifères et les poissons, une clairance inférieure à celle du composé parent (Hiemke et Hartter 2000; Nakamura *et al*., 2008a; Smith *et al*., 2010). La disponibilité de la fluoxétine pourrait également être différente chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis*, du fait de leurs modes alimentaires différents.

Nous avons exploré, en partie, ces hypothèses en mesurant la bioaccumulation différentielle de la fluoxétine et la norfluoxétine chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis*.

Publication n°8:

Differential accumulation of fluoxetine and norfluoxetine in gastropod snails

M. Gust, C. Cren-Olive, A. Bulete, T. Buronfosse, J. Garric

La **fluoxétine** est le principe actif du Prozac®, anti-dépresseur très largement utilisé et fréquemment retrouvé dans les eaux de surface. C'est un perturbateur endocrinien potentiel chez les mollusques du fait de son mode d'action. Dans une précédente étude, ses effets biologique sur la reproduction de *P. antipodarum* et *V. piscinalis* ont été évalués. *P. antipodarum* a présenté une sensibilité supérieure à ce composé. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer cela, dont la meilleure métabolisation en norfluoxétine, son métabolite actif majoritaire chez les mammifères. Les deux espèces ont donc été exposés à la fluoxétine, et les concentrations de fluoxétine et norfluoxétine ont été mesurées dans leurs tissus. Les deux gastéropodes ont bioconcentré de manière importante la fluoxétine. Cependant, *P. antipodarum* a présenté une bioconcentration plus marquée, qui peut être partiellement expliquée par un contenu en triglycérides plus important. En revanche, la *N*-déméthylation en norfluoxétine a été relativement faible chez les deux espèces, et bien moindre que chez les vertébrés (poissons et humains). Cela montre l'existence de cette voie métabolique chez ces espèces, bien que peu efficace. En conclusion, la grande sensibilité de *P. antipodarum* à la fluoxétine peut s'expliquer par sa plus grande **bioconcentration** que chez *V. piscinalis*, mais pas par une **métabolisation** plus active.

Mots-clefs : fluoxétine, *P. antipodarum*, *V. piscinalis*, métabolisation, bioconcentration.

Soumise à *Chemospere*

Differential accumulation of fluoxetine and norfluoxetine in gastropod snails

M. Gust[a,b] , C. Cren-Olivé[c], A. Bulete [c] T. Buronfosse[d], J. Garric[a*]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[b] AgroPariTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris, France.

[c] Service Central d'Analyse du CNRS - USR59, Chemin du Canal, 69360 Solaize, France.

[d] VetAgroSup. Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France.

* Corresponding author.

Present address: Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3 bis quai Chauveau CP 220 69336 Lyon cedex 09, France

Tel.: +33 472208905 ; Fax: +33 478477875

E-mail address: jeanne.garric@cemagref.fr

Abstract

Fluoxetine is a widely used antidepressant, frequently found in aquatic ecosystems, which presented dissimilar effects on the reproduction of two gastropod species, *P. antipodarum* and *V. piscinalis*. Recently it has also been measured in fish downstream of effluent discharges indicating a high bioconcentration capacity in vertebrate aquatic wildlife. However no data is available on fate and metabolism of pharmaceuticals in invertebrates. Species sensitivity is likely to be partly explained by contaminants toxico-kinetic, bioaccumulation and metabolization capacities. Fluoxetine bioconcentration and *in vivo* metabolization into norfluoxetine were thus explored in *P. antipodarum* and *V. piscinalis*. Both gastropods highly bioconcentrated fluoxetine. However, fluoxetine concentration was higher in *P. antipodarum* than in *V. piscinalis*, which can only be partly explained by their lipid content. However, *N*-demethylation into norfluoxetine was similar in both snails, but far less important than in fish. It implied the occurrence of this metabolic pathway in mollusks. The higher sensitivity of *P. antipodarum* to fluoxetine than *V. piscinalis* was at least enlightened by its higher bioaccumulation capacity, but not by higher metabolization into norfluoxetine.

Introduction

Fluoxetine is a widely used antidepressant frequently found in waste water treatment plant (WWTP) effluent and in aquatic ecosystems at concentrations below µg/L (Kolpin *et al*., 2002; Metcalfe *et al*., 2003b; Lajeunesse *et al*., 2008; Metcalfe *et al*., 2010). In humans, fluoxetine is metabolized into its active metabolite, norfluoxetine, by a *N*-demethylation of fluoxetine mainly catalyzed by CYP2D6 (Mandrioli *et al*., 2006). This metabolic pathway also occurs in fish *in vivo* (Brooks *et al*., 2005; Chu et Metcalfe 2007; Nakamura *et al*., 2008b; Paterson et Metcalfe 2008; Ramirez *et al*., 2009; Metcalfe *et al*., 2010). Norfluoxetine was shown to be more toxic than the parent compound in 24 h lethality tests on invertebrate species (Nalecz-Jawecki 2007).

Fluoxetine presents a high persistence in water (Johnson *et al*., 2005; Kwon et Armbrust 2006). It also appears to have moderate potential for bioaccumulation (Paterson et Metcalfe 2008). Lately, both fluoxetine and norfluoxetine have been measured in tissues of fishes sampled or caged in streams downstream of urban and industrialized effluent discharges (Brooks *et al*., 2005; Chu et Metcalfe 2007; Ramirez *et al*., 2009; Metcalfe *et al*., 2010). In laboratory exposures, fluoxetine was also moderately bioconcentrated in the tissues of fishes (Nakamura *et al*., 2008b; Paterson et Metcalfe 2008), and particularly in liver (Nakamura *et al*., 2008b). The half-life of fluoxetine in fish is relatively long (9.4 days, Nakamura *et al*., 2008b; Paterson et Metcalfe 2008) and longer than in humans (Hiemke et Hartter 2000). A recent study, exploring fluoxetine metabolism in fish, suggested inter-species differences and *N*-demethylation being a minor metabolic pathway in fish (Smith *et al*., 2010).

Numerous studies have explored the sensitivity of invertebrates to waterborne fluoxetine (Brooks *et al*., 2003b; Henry *et al*., 2004; Flaherty et Dodson 2005; Nentwig 2007; Pery *et al*., 2008; Gust *et al*., 2009; Sanchez-Arguello *et al*., 2009). However, no data is currently available on bioconcentration and *in vivo* metabolism of pharmaceuticals compounds in invertebrate species and especially mollusk species. Yet, differences of sensitivity are marked within gastropods mollusks. In a previous study, the New Zealand mudsnail, *Potamopyrgus antipodarum*, and the European valve snail, *Valvata piscinalis*, were exposed to waterborne fluoxetine (3.7-100 µg/L) during 42 days. The fecundity of *V. piscinalis* (cumulate number of eggs at day 42) was not affected with a NOEC of 69 µg/L (measured concentration). The mudsnail *P. antipodarum* responded in a biphasic dose-effect curve at low concentrations, with a

significant increase of the embryos in the brood pouch at 1 µg/L and decrease at 69 µg/L (measured concentrations). Several assumptions were proposed to explain these results including dissimilar metabolic capacities or bioavailability of fluoxetine for the snails (Gust *et al*., 2009). In this work we propose to address some of these issues.

Adults *V. piscinalis* and *P. antipodarum* were exposed to fluoxetine (11-100 µg/L) during 7 to 14 days and both fluoxetine and norfluoxetine were measured in the organisms. Both snails are gastropods, living in running waters from small creeks to steams and lakes (Fretter et Graham 1994). However, *P. antipodarum* is an invasive parthenogenetic ovoviviparous freshwater mudsnail (Robson 1926), whereas *V. piscinalis* is hermaphrodite oviparous (Heard 1963). Until recently, they were both considered as prosobranch snails, however, progress in taxonomy have modified this phylogeny and they were affiliated to different order: Caenogastropoda for *P. antipodarum* and Heterobranchia for *V. piscinalis* (Ponder et Lindberg 1997; Dinapoli et Klussmann-Kolb 2010).

The aims of this study were (i) to determine fluoxetine bioconcentration in snails after waterborne exposure to fluoxetine; (ii) to appraise *in vivo* metabolization into norfluoxetine; (iii) to assess if such mechanisms play a significant role in the sensitivity of the two gastropods snails.

Materials and methods

P. antipodarum and *V. piscinalis* were obtained from long term cultures established in our laboratory (Cemagref, Lyon, France). These cultures were initiated with snails that originated from natural populations collected in the Rhone river. The snails were kept at 21±1°C in 20 L in stainless aquaria filled with reconstituted[a] water. They were fed with Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle, Germany) as described previously described (Gust *et al*., 2009).

2.1. Fluoxetine-spiked water exposure

Fluoxetine exposure on both *P. antipodarum* and *V. piscinalis* was performed simultaneously. Snails from each species were placed in the same test beakers filled with 0.5 L to avoid any differences in the exposure conditions. The beakers were set at 21±1°C with a 16:8

[a] Mixture of natural spring water and deionised water

106 h light:dark photoperiod. We used a flow through system which consisted of beakers filled with
107 continuously renewed test water (four renewals a day) and a continuous pumping system. It
108 consisted, for each tested concentration, of clean water and a fluoxetine-spiked solution allowing
109 to obtain the required exposure concentrations after mixing. The stock of the fluoxetine-spiked
110 solution (CAS number 59333-67-4, purchased from Interchim (Montluçon, France)), was
111 renewed every three days and kept at an ambient temperature (18°C) and in darkness, according
112 to its described stability in these conditions (Kwon et Armbrust 2006). The nominal exposure
113 concentrations included 11.1 for *P. antipodarum* only, 33.3 and 100 µg/L and a control for both
114 species. Concentrations were chosen in accordance with the biological effects previously
115 observed in these species (Gust *et al*., 2009). Six replicates per concentration were prepared and
116 exposed for 7 (*V. piscinalis*) and 14 days (*P. antipodarum*). Each replicate contained 25 *P.*
117 *antipodarum* and 17 *V. piscinalis*. Specific conductivity, temperature, and pH, were monitored
118 daily. Organisms were fed with 1.5 mg/individual Tetramin® fish food (Tetrawerke, Melle,
119 Germany) per working day, corresponding to *ad libitum* conditions.
120 Adult snails, with a size of approximately 4.3 mm (± 0.2) and 4.0 mm (± 0.2) for *P.*
121 *antipodarum* and *V. piscinalis*, were used at the start of the experiment.
122
123 *2.2. Fluoxetine and norfluoxetine measurements*
124 *2.2.1. Fluoxetine in water*
125 On day 7 and 14, water samples were collected in each beaker of each concentration and
126 pooled to measure the mean fluoxetine concentration in water. Samples were then stored in glass
127 vessels at –21°C, for less than 30 days before chemical analysis.
128 The system used was an HP 1100 Series (Agilent) coupled to a triple-stage quadrupole
129 mass 3200 QTrap spectrometer (Applied Biosystem) equipped with a turboionspray source. Data
130 were processed with Analyst 1.5.
131 The chromatographic separation was performed on a Synergi Hydro RP (50 x 2 mm, 4
132 µm) (Phenomenex) column with the corresponding guard column. The column oven temperature
133 was set to 30°C; injection volume was 100 µL; the flow rate was 300 µL/min. Samples were
134 analysed in positive mode with the mobile phase (A) water with ammonium acetate 10 mM and
135 (B) methanol, with the following elution program: start at 40% (A), from 40 to 0% in 8 min and
136 from 8 to 13 min, 100% (B). The column was re-equilibrated 5 min between runs.

The multiple reaction monitoring (MRM) mode was chosen for quantification. Fluoxetine was identified by its retention time, two characteristic ion transitions (310>148 and 310>91) and specific ratios of the responses of the transitions (deviation < 20 % with respect to analytical standards ratios). The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for fluoxetine in water samples was respectively 30 and 100 $ng.L^{-1}$.

2.2.2. Fluoxetine and norfluoxetine analysis in snails

Fluoxetine and norfluoxetine levels were measured in snails as described elsewhere (Bulete *et al*., accepted). Briefly, an easy and quick extraction similar to QuEChERS (Anastassiades *et al*., 2003) in a miniature version was developed to analyze both compounds in gastropods. The procedure involves an extraction of about 10 milligrams of matrix by 500 µL of a mixture of acetonitrile:water:hexane (50/20/30) and 100 mg of citrate buffer. Recoveries were 87% for fluoxetine and 86 % for norfluoxetine.

Nano-LC-nano-ESI MS/MS analysis was performed with a nano Ultimate3000 (Dionex®) coupled with a Qtrap3200 detector (AB Sciex®). Data were processed with Analyst 1.5. The chromatographic separation was performed in two step : first a preconcentration step on a precolumn C18 (5 µm, 300 Å, LC Packings®) followed by a separation on a Pepmap C18 column (C18 3 µm x 75 µm x 100 Å, Dionex®). The column oven temperature was set to 60°C; injection volume was 1 µL in µLpickup mode ; the flow rate was 300 nL/min. Samples were analysed in positive mode with the mobile phase (A) CH3CN/FA/H2O (2/0.1/97.9) and (B) CH3CN/FA/H2O (80/0.08/19.92), with the following elution program: start at 60% (A), from 60 to 0% in 5 min and from 5 to 20 min, 100% (B). The column was re-equilibrated 20 min between runs.

MS/MS detection was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using a NanoSpray® II source (AB Sciex®). Fluoxetine and norfluoxetine were identified by their retention time, two characteristic ion transitions (fluoxetine : 310>148 and 310>91, norfluoxetine : 296>134 and 296>30) and specific ratios of the responses of the transitions (deviation < 20 % with respect to analytical standards ratios). The quantification was carried out by double injection. The use of matrix-matched standards (Document SANCO 2009) was selected. The matrix blank (snail) was prepared as for analysis of samples. In practice, fluoxetine and norfluoxetine were added to blank extracts at 6 different concentrations. Six-point

168 calibration curves were built from the injection of these matrix prepared standards. This
169 calibration intended to compensate for matrix effects. In these conditions, the limit of
170 quantification (LOQ) for fluoxetine and norfluoxetine in snail samples was respectively 7.7 and
171 3.8 ng/g.
172
173 *2.2.3.Fluoxetine Accumulation*
174 Fluoxetine accumulation on days 7 and 14, was assessed by calculating
175 bioconcentration factor estimates (BCF) according to Nakamura *et al*. (2008b). The first estimate
176 (BCF_{tot}) was calculated, using the fluoxetine concentrations measured in snails after 7 and 14
177 days (C_{snail}) for *P. antipodarum* and 7 days for *V. piscinalis*,
178 $BCF_{tot} = C_{snail} / C_{water}$
179 However, fluoxetine is a lipophilic compound (Johnson *et al*., 2005) that accumulate
180 preferentially in fatty tissues (Nakamura *et al*., 2008b). Lipids are an important storage
181 compartment and explain in some extent the bioaccumulation of hydrophobic chemicals.
182 Acylglycerols seem to constitute the principal lipid class in mollusks, being used as energy
183 storage while phospholipids and sterols being essentially structural lipids. (Pazos *et al*., 2003).
184 So triglycerids (TG) contents of snails, as proxy of total lipids content, were used to normalize
185 the concentrations of fluoxetine.
186 Thus, a second estimate of a bioconcentration factor estimate (BCF_{TG}) was calculated as
187 the previous estimate balanced by the average triglyceride content in snails of each concentration
188 and time (TG_{snails}), as nmol TG per g, measured during the exposure:
189 $BCF_{TG} = BCF_{tot} / TG_{snails}$
190
191 *2.3. Triglyceride levels in snails*
192 Triglyceride (TG) levels were measured individually in 10 *V. piscinalis* and 10 pools of
193 2 *P. antipodarum* for each condition on days 0, 7 and 14, as previously described (Gust *et al*.,
194 2011a). Briefly, snails were weighted and homogenized in 200 µL PBS and the levels of TG
195 were measured directly by using a Konelab® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise). This
196 device is a robot commonly used for the clinical analysis of biochemical parameters. TG were
197 hydrolysed by a lipase and released glycerol measured at 510 nm. Repeatability and linearity of

198 the reactions were assayed and intra and inter assay variability were less than 5%. Limits of
199 quantification were 4 nmol TG per snail. Results were expressed as µmol of TG per g.
200
201 *2.4. Statistical analysis*
202 Kuskall Wallis tests were performed, followed, if necessary, by a Mann-Whitney U-test
203 for post hoc comparisons of groups, with Bonferroni adjustments. All the statistical tests were
204 performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) at α equal to the
205 5% global level of significance.
206
207 **3. Results and discussion**
208
209 *3.1. Fluoxetine in water*
210 Fluoxetine measured concentrations in water on days 7 and 14 are presented in Table 1.
211 Chemical measurements showed a fluoxetine recovery in the exposure system depending on the
212 tested concentration (from 25 to 98%), with mean measured exposure concentrations of 2.9, 24
213 and 79 µg fluoxetine /L. Even if the gradient of exposure still was present, fluoxetine measured
214 concentrations were lower than expected ones, with the lowest recovery rates for the lowest
215 tested concentration. This is consistent with what was previously observed in similar exposure
216 systems (Gust *et al*., 2009). These lower exposure concentrations can certainly be explained by
217 adsorption on the devices used for exposure system. Fluoxetine can adsorb to organic matter
218 (Johnson *et al*., 2005). However degradation of the parent compound cannot be excluded as the
219 occurrence of metabolites in the water was not explored. Nevertheless, fluoxetine is a persistent
220 SSRI in the environment, relatively recalcitrant to hydrolysis, photolysis and microbial
221 degradation (Kwon et Armbrust 2006). Under laboratory conditions, no significant decrease of
222 its concentration in water has been observed after 3 weeks (Binsumait *et al*., 2001). Thus,
223 adsorption on the exposure system seems a more likely explanation of these low measured
224 concentrations than degradation.
225
226 *3.2. Fluoxetine accumulation in snails*
227 Fluoxetine was measured in both *P. antipodarum* and *V. piscinalis* (Table 2). No
228 significant differences (P>0.05) were noted between the fluoxetine concentrations in *P.*

antipodarum after 7 or 14 days, suggesting that the bioconcentration steady state was achieved after 7 days of exposure in this species. In the Japanese medaka, bioconcentration steady state was achieved after only 3 days of exposure (Paterson et Metcalfe 2008). Thus, we estimated that the steady state was likely to be reached in *V. piscinalis*, too, even if measurements were only performed on day 7.

Comparisons between fluoxetine body burden in the two species were performed on day 7. Concentrations of fluoxetine in *P. antipodarum* were significantly higher ($P<0.05$) than in *V. piscinalis*. The estimate BCF_{tot} were also significantly higher ($P<0.05$) in *P. antipodarum* than in *V. piscinalis* (Table 4). They were about twice higher in *P. antipodarum*, implying a higher bioconcentration of the parent compound in *P. antipodarum* after 7 days of exposure.

As fluoxetine was in the water, the contamination probably preferentially occurred by passive diffusion through the gills. However, fluoxetine can adsorb on food as it does on sediment (Johnson *et al*., 2005; Kwon et Armbrust 2006) and thus exposure could be modified by food consumption. Indeed, both snails have different feeding modes, *P. antipodarum* being a deposit feeder (Dorgelo et Leonards 2001) and *V. piscinalis* being a scarper (Cleland 1954). However, both snails were in the same beakers and fed daily, with the same fish food, so food effect seems unlikely.

The lipophilic nature of fluoxetine associated to a difference in lipid content in both snails could also explain the differences in BCF_{tot}. The TG content in *P. antipodarum* was around seven time higher than in *V. piscinalis* (Figure 1), which explains the higher bioconcentration of fluoxetine in the mudsnail compared to the valve snail. Therefore, the lesser sensitivity of *V. piscinalis* to waterborne fluoxetine compared to *P. antipodarum* (Gust *et al*., 2009) could be at least partly explained by its lesser bioconcentration in the whole body. However, when BCF_{tot} estimates were balanced by TG content in snails (BCF_{TG}), BCF estimates (Table 5) were significantly higher ($P<0.05$) in *V. piscinalis* than in *P. antipodarum*. This suggests other storage sites for fluoxetine in the valve snail.

3.3. Fluoxetine metabolization into norfluoxetine

As for fluoxetine, norfluoxetine was measured in both *P. antipodarum* and *V. piscinalis* (Table 3). To our knowledge, this is the first study to investigate *in vivo* metabolism of a pharmaceutical in mollusk. In humans, fluoxetine undergoes extensive metabolic conversion in

humans (Hiemke et Hartter 2000) and the main metabolite, norfluoxetine, comes from a *N*-demethylation of fluoxetine mainly by CYP2D6 (Mandrioli *et al*., 2006). The occurrence of norfluoxetine in *P. antipodarum* and *V. piscinalis* suggests the presence of this metabolic pathway. CYP genes related to vertebrates CYP from families 1, 2, 3, 4, 17, 20, 26 and 27, have recently been identified in bivalve mollusks using EST (expressed sequence tags) databases (Zanette *et al*., 2010). The *N*-demethylation of fluoxetine could be catalyzed by an orthologue of the human CYP P450, or by other enzymes.

Contrary to parental compound, norfluoxetine concentrations measured in both species were not significantly different ($P>0.05$), but norfluoxetine levels in snails represented less than 1% of total fluoxetine body burden. It seems that norfluoxetine is not the major metabolite of fluoxetine in gastropods. In humans, fluoxetine is extensively metabolized and multiple other metabolites than norfluoxetine are synthesized (Hiemke et Hartter 2000; Mandrioli *et al*., 2006). In fishes norfluoxetine is not the predominant fluoxetine biotransformation product, and *N*-demethylation seems a minor metabolic pathway (Smith *et al*., 2010). As the occurrence of other metabolites was not explored, it cannot be excluded that other metabolic pathways than *N*-demethylation exist in gastropod snails, leading to compounds with different biological effects.

3.4. Comparison to other species

Interestingly, BCF estimates in both snails were far higher than those calculated in fishes. In Japanese medaka, BCFs were around 40 (Nakamura *et al*., 2008b) and 70 (Paterson et Metcalfe 2008) after respectively 30 and 7 days of exposure to 10 and 0.64µg/L of fluoxetine. It is possible that fish global lipid content is less important than in snail. Indeed, fluoxetine was more bioconcentrated in the Japanese medaka liver than in muscle, with BCFs estimates in the same range than in our study (Nakamura *et al*., 2008b), confirming its higher affinity for fat tissue.

Since norfluoxetine was measured in both snails, pseudo-BCFs estimates (pseudo-BCF_{tot}) were calculated according to Nakamura *et al*. (2008b), the denominator being the concentration of fluoxetine in water and not the concentration of norfluoxetine. Pseudo-BCF estimates (Tables 4) were much lower than those determined for fluoxetine. Interestingly, pseudo-BCF estimates were far higher in Japanese medaka than in the mudsnail and the valve snail (Nakamura *et al*., 2008b; Paterson et Metcalfe 2008). Moreover, in fishes, higher

291 norfluoxetine concentrations in comparison to fluoxetine are measured (Brooks *et al*., 2005;
292 Nakamura *et al*., 2008b; Paterson et Metcalfe 2008; Ramirez *et al*., 2009). In contrast, in the
293 present study, norfluoxetine levels in snails were very low compared to total fluoxetine body
294 burden. Thus *N*-demethylation capacity is higher in fishes than in gastropods. In snails, total
295 accumulation of fluoxetine can be reduced to fluoxetine accumulation, contrary to fishes, were
296 metabolization into norfluoxetine is also taken into account (Paterson et Metcalfe 2008).
297 However, BCF in fish, on the whole body, including both fluoxetine and norfluoxetine were still
298 lower than in *P. antipodarum*.
299
300 *3.5. Bioconcentration and biological effects*
301 *P. antipodarum* was more sensitive to fluoxetine than *V. piscinalis* in laboratory studies
302 (Gust *et al*., 2009) which is supported by its higher bioconcentration in the mudsnail. Differences
303 in the toxic compound localization could also determine the accessibility to serotonin receptors
304 which are the target of the toxicological effect of fluoxetine. Moreover, these two snails could
305 have dissimilar serotonin receptors with different affinity for fluoxetine. The pattern of
306 serotonin-receptor phenotype development (time of apparition and number of serotoninergic
307 neurones) is variable between gastropods, between embryos and adults and between two stages
308 of adult development (Goldberg and Krater, 1989). Other hypotheses as difference in metabolic
309 capacities could also be involved. In humans, the *N*-demethylated metabolite is more active than
310 the parent compound (Hiemke et Hartter 2000), as in a protozoan and a crustacean 24h lethality-
311 test (Nalecz-Jawecki 2007). However, the presumed active metabolite is measured in similar
312 quantity in both species. It implies that metabolite activation into norfluoxetine does not explain
313 the interspecific differences previously observed.
314
315 **Conclusion**
316 This study is the first to investigate bioconcentration and metabolization of a
317 pharmaceutical in gastropod mollusks. Both fluoxetine and norfluoxetine were measured in *P.*
318 *antipodarum* and *V. piscinalis*, implying that gastropods are able to metabolize fluoxetine.
319 However, norfluoxetine concentrations were low compared to fish and did not explain the
320 previously detected difference of sensitivity to fluoxetine of both species. Nevertheless,
321 fluoxetine bioconcentration was higher in *P. antipodarum* than in *V. piscinalis*, at least partially

enlightening their response profile to this compound. More work is still needed to assess more precisely pharmaceuticals metabolization in invertebrates.

Acknowledgments

The present work was funded by CNRS INE exploratory project funding PEPS 2009.

The authors wish to thank the BEMT of the National Veterinary School of Lyon for funding the biochemical analysis (Prof. F. Garnier). C. Dussard, R Mons, and C. Noel, are gratefully acknowledged for their technical help,

331 **References**

332 Abad M, Ruiz C, Martinez D, Mosquera G, Sánchez JL. 1995. Seasonal variations of
333 lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibran (Galicia, Spain).
334 Comp. Biochem. Physiol. C. 110, 109-118.

335 Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy
336 multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase
337 extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J. Aoac Internat. 86, 412-431.

338 Binsumait IA, Hadidi KA, Raghib SAA. 2001. Stability of fluoxetine in stored plasma,
339 aqueous, and methanolic solutions determined by HPLC with UV detection. Pharmazie. 56, 311-
340 313.

341 Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, *et al*.
342 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream.
343 Environment. Toxicol. Chem. 24, 464-469.

344 Brooks BW, Turner PK, Stanley JK, Weston JJ, Glidewell EA, Foran CM, *et al*. 2003.
345 Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. Chemosphere 52, 135-142.

346 Bulete A, Baudot R, Wiest L, Cren C. accepted. Micro-QuEChERS-NanoLC-Nano-
347 ESI-MS/MS for the detection and quantification of traces of endocrine disruptors in benthic
348 invertebrates. .

349 Chu S, Metcalfe CD. 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish
350 tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid
351 chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chrom. A. 1163, 112-118.

352 Cleland D. 1954. A study of the habits of *Valvata* (*Cincinna*) *piscinalis* (Müller) and the
353 structure and function of the alimentary canal and reproductive system. Proceedings
354 malacological society London 30, 167-203.

355 Dinapoli A, Klussmann-Kolb A. 2010. The long way to diversity - Phylogeny and
356 evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). Mol. Phyl. Evol. 55, 60-76.

357 Document SANCO. 2009. European Guidance Document on Method Validation &
358 Quality Control Procedures for Pesticides Residues Analysis in food and feed. Fed Reg
359 SANCO/10684/2009

Dorgelo J, Leonards PEG. 2001. Relationship between C/N ratio of food types and growth rate in the snail Potamopyrgus jenkinsi (E. A. Smith). J. North Am. Benthological Soc. 20, 60-67.

Flaherty CM, Dodson SI. 2005. Effects of pharmaceuticals on Daphnia survival, growth, and reproduction. Chemosphere 61, 200-207.

Fretter V, Graham A. 1994. British Prosobranch molluscs. Their fonctional anatomy and ecology. London: Ray Society.

Gust M, Buronfosse T, Geffard O, Coquery M, Mons R, Abbaci K, *et al*. 2011. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Aq. Toxicol. 101, 100-108.

Gust M, Buronfosse T, Giamberini L, Ramil M, Mons R, Garric J. 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: Potamopyrgus antipodarum and Valvata piscinalis. Environ. Pollut. 157, 423-429.

Heard WH. 1963. Reproductive feature of Valvata. Nautilus 77, 64-68.

Henry TB, Kwon JW, Armbrust KL, Black MC. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in Ceriodaphnia dubia. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2229-2233.

Hiemke C, Hartter S. 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. Pharmacol.Therapeutics 85, 11-28.

Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, Wilson CJ, Bestari KT, Solomon KR. 2005. Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. Regul. Toxicol. Pharmacol. 42, 313-323.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, *et al*. 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environ Sci Technol. 36, 1202-1211.

Kwon JW, Armbrust KL. 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. Environment. Toxicol. Chem. 25, 2561-2568.

Lajeunesse A, Gagnon C, Sauve S. 2008. Determination of basic antidepressants and their n-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 80, 5325-5333.

Mandrioli R, Forti GC, Raggi MA. 2006. Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: The role of cytochrome P450. Current Drug Metabolism 7, 127-133.

Metcalfe CD, Chu SG, Judt C, Li HX, Oakes KD, Servos MR, *et al*. 2010. Antidepressants and Their Metabolites in Municipal Wastewater, and Downstream Exposure in an Urban Watershed. Environ. Toxicol. Chem. 29, 79-89.

Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J. 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2881-2889.

Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N. 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (Oryzias latipes): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. Chemosphere 70, 865-873.

Nalecz-Jawecki G. 2007. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. Chemosphere 70, 29-35.

Nentwig G. 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 52, 163-170.

Paterson G, Metcalfe CD. 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (Oryzias latipes). Chemosphere 74, 125-130.

Pery ARR, Gust M, Vollat B, Mons R, Ramil M, Fink G, *et al*. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. Chemosphere 73, 300-304.

Ponder WF, Lindberg DR. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: Analysis using morphological characters. Zool. J. Linnean Soc. 119, 83-265.

Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, *et al*. 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2587-2597.

Robson GC. 1926. Parthenogenesis in the Mollusc *Paludestrina jenkinsi* - Part I. J. Exp. Biol. 1, 65-78.

Sanchez-Arguello P, Fernandez C, Tarazona JV. 2009. Assessing the effects of fluoxetine on Physa acuta (Gastropoda, Pulmonata) and Chironomus riparius (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. Sci. Total Environ.407, 1937-1946.

Smith EM, Chu SG, Paterson G, Metcalfe CD, Wilson JY. 2010. Cross-species comparison of fluoxetine metabolism with fish liver microsomes. Chemosphere 79, 26-32.

Zanette J, Goldstone JV, Bainy ACD, Stegeman JJ. 2010. Identification of CYP genes in Mytilus (mussel) and Crassostrea (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. Mar. Environ. Res. 69, S1-S3.

426 Table 1: Measured concentrations of fluoxetine (µg/L) in water. LD: limit of detection.
427 Table 2: Fluoxetine concentration (µg/g) in snails (N=3). LD: limit of detection.
428 Table 3: Norfluoxetine concentration (µg/g) in snails (N=3). LD: limit of detection, LOQ: limit
429 of quantification.
430 Table 4: Bioaccumulation factors (BCF_{tot}) of fluoxetine and pseudo-bioaccumulation factors
431 (pseudo-BCF_{tot}) of norfluoxetine in *P. antipodarum* and *V. piscinalis*.
432 Table 5: Bioaccumulation factors (BCF_{TG}) of fluoxetine and pseudo-bioaccumulation factors
433 (pseudo-BCF_{TG}) of norfluoxetine in *P. antipodarum* and *V. piscinalis* balanced by mean
434 triglyceride (TG) content in snails.
435
436 Figure 1: Levels of triglycerides (TG) in snails in µmol/g (mean value and standard deviation,
437 n=10)
438
439
440

Table 1: Measured concentrations of fluoxetine (µg/L) in water. LD: limit of detection.

Nominal concentration (µg/L)		**Control**	**11 µg/L**	**33 µg/L**	**100 µg/L**
Measured concentration (µg/L)	D7	0.4	2.7	21.4	98.1
	D14	<LD	3.1	26.7	60.3

443 Table 2: Fluoxetine concentration (µg/g) in snails (N=3). LD: limit of detection.

444

Fluoxetine (µg/L)			Control	11 µg/L	33 µg/L	100 µg/L
Fluoxetine (µg/g)	*P. antipodarum*	D0	< LD			
		D7	< LD	1.199 ± 0.277	5.474 ± 0.240	32.473 ± 4.213
		D14	< LD	1.755 ± 0.309	6.272 ± 0.503	33.478 ± 4.312
	V. piscinalis	D0	< LD			
		D7	< LD		2.827 ± 1.136	13.862 ± 3.226

445

446

446 Table 3: Norfluoxetine concentration (µg/g) in snails (N=3). LD: limit of detection, LOQ: limit
447 of quantification.
448

Fluoxetine (µg/L)			**Control**	**11 µg/L**	**33 µg/L**	**100 µg/L**
Norfluoxetine (µg/g)	***P. antipodarum***	**D0**	< LD			
		D7	< LD	< LOQ	0.009 ± 0.002	0.099 ± 0.014
		D14	< LD	0.004	0.012 ± 0.003	0.060 ± 0.014
	V. piscinalis	**D0**	< LD			
		D7	< LD		0.008 ± 0.003	0.058 ± 0.026

449
450

450 Table 4: Bioaccumulation factors (BCF_{tot}) of fluoxetine and pseudo-bioaccumulation factors
451 (pseudo-BCF_{tot}) of norfluoxetine in *P. antipodarum* and *V. piscinalis*.
452

Average measured fluoxetine concentration (µg/L)			**3 µg/L**	**24 µg/L**	**79 µg/L**
BCF_{tot} (L/g)	***P. antipodarum***	**D7**	400	228	411
		D14	585	261	424
	V. piscinalis	**D7**		118	175
Pseudo-BCF_{tot} (L/g)	***P. antipodarum***	**D7**	-	0.4	1.3
		D14	1.3	0.5	0.8
	V. piscinalis	**D7**		0.3	0.7

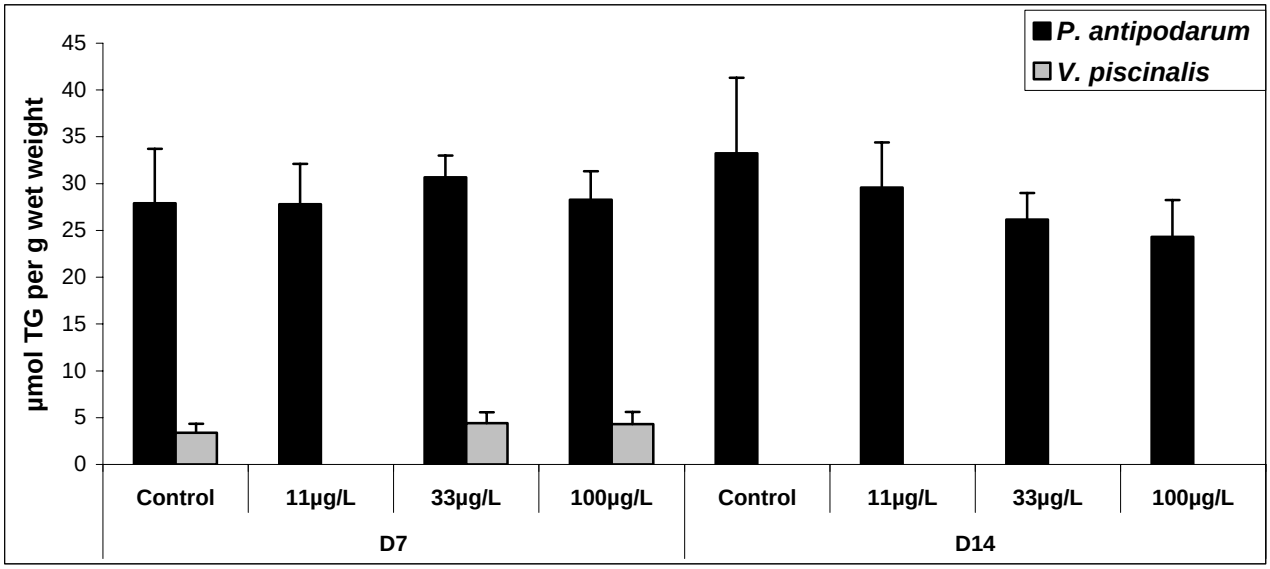
453
454

454 Table 5: Bioaccumulation factors (BCF_{TG}) of fluoxetine in *P. antipodarum* and *V. piscinalis*
455 balanced by mean triglyceride (TG) content in snails.
456

Average measured fluoxetine concentration (µg/L)			**3 µg/L**	**24 µg/L**	**79 µg/L**
BCF_{TG} (L/µmol)	***P. antipodarum***	**D7**	14.4	7.4	14.5
		D14	19.8	10.0	17.4
	V. piscinalis	**D7**		26.8	40.8

457
458

458 Figure 1: Levels of triglycerides (TG) in snails in µmol/g (mean value and standard deviation,
459 n=10)



460
461
462

Une exposition de laboratoire a été réalisée avec succès à un reprotoxique, permettant :

- La comparaison des sensibilités des deux espèces,
- L'application d'une partie des différents marqueurs précédemment développés.

P. antipodarum s'est avéré plus sensible que *V. piscinalis*. Les raisons de cette **différence de sensibilité interspécifiques** n'ont pas été étudiées plus en avant (mode de reproduction, métabolisme, présence de récepteurs à la sérotonine…).

La fluoxétine est accumulée de manière deux fois plus importante chez *P. antipodarum* que chez *V. piscinalis*, alors qu'aucune différence n'est observée concernant la bioaccumulation de norfluoxétine.

CHAPITRE 5 :

EVALUATION DE STRESS REPROTOXIQUE *IN SITU*

A l'heure actuelle, l'évaluation de la qualité biologique des milieux aquatiques repose principalement sur l'utilisation de diverses mesures biologiques basées sur le **suivi des populations et des communautés biologiques**, notamment les invertébrés. Ces mesures ont prouvé leur utilité pour décrire l'état d'un écosystème et mettre en évidence des perturbations, mais elles se confrontent à plusieurs limites dans l'étude de l'**impact des contaminants**.

L'état des organismes observés à ces niveaux d'organisation peut intégrer aussi bien l'influence de variables physiques (habitat) que chimiques et ne permettent pas d'identifier le type de contaminant incriminé. De plus, les variations de ces mesures résultent de l'influence de paramètres environnementaux à de grandes échelles temporelles et spatiales. Pour s'affranchir de ces limites, il est nécessaire de revenir à des systèmes biologiques moins complexes (niveau biologique moins élevé) que sont la cellule ou l'organisme (Matthiessen *et al*., 1999).

Ainsi, les **tests *in situ***, par encagement d'organismes non natifs, représentent une amélioration par rapport aux méthodes de suivi des populations, du fait de leur bas coût et de leur facilité d'application. Ils permettent la translocation d'organismes pour examiner des sites d'intérêt. Ils fournissent une évaluation de la qualité environnementale reflétant l'exposition sur plusieurs semaines (Regoli *et al*., 2006). Ces approches permettent de répondre, en partie, aux limites des suivis de populations natives. En effet, les encagements d'organismes permettent d'accéder à des **variables biologiques** (reproduction, croissance, survie...) difficilement abordables sur les organismes du milieu. Les organismes exposés sont ceux issus de populations connues de laboratoire ou de terrain. Enfin, ces expositions, de relativement courte durée, permettent d'intégrer les fluctuations des caractéristiques physico-chimiques des milieux (température, conductivité, débit…), qui peuvent fortement influencer la bio-disponibilité et donc la toxicité des contaminants .

Les bivalves et les gammares sont souvent utilisés dans les tests *in situ*. Cependant, des espèces additionnelles devraient être ajoutées pour complémenter les espèces couramment utilisées, afin de mieux prendre en compte la diversité d'espèce et améliorer l'évaluation de risque environnemental (Breitholtz *et al*., 2006). Ainsi l'utilisation de gastéropodes, dits « prosobranches » peut s'avérer très intéressante.

Ce chapitre présente la mise en place de la méthodologie d'exposition, et de son application à des rejets divers (effluents de STEP et miniers). Les marqueurs développés ont été utilisés afin de mieux comprendre les mécanismes d'apparition des effets toxiques. Une exposition a également été réalisée en utilisant les deux organismes modèles conjointement pour évaluer leurs différentes réponses.

A / MISE AU POINT DE LA METHODOLOGIE D'EXPOSITION IN SITU

1. Les expositions *in situ* chez les mollusques

Les **bivalves** ont été utilisés lors d'encagements pour évaluer des pollutions localisées (Tableau V-1). De nombreux **biomarqueurs** ont été utilisés pour évaluer les impacts de ces pollutions sur différents processus physiologiques : métallothionéines (MT), génotoxicité, Vn et Vn-like, évaluation du stress oxydant, neurotoxicité (AChE), modulation de l'immunité… Cependant les effets sur la reproduction au niveau de l'individu (fécondité), n'avaient jamais été évalués lorsque nous avons initié ce travail. De plus, très peu d'études s'intéressaient aux prosobranches.

A notre connaissance, la seule étude utilisant d'encagement *in situ* de prosobranches a été réalisée sur *P. antipodarum*. Elle consistait en l'évaluation de l'effet de décharges toxiques sur la **mortalité** de *P. antipodarum* (Brown 1980). L'auteur avait conclu que *P. antipodarum* présentait des caractéristiques d'intérêt pour l'encagement en rivière. Depuis, cette espèce a été utilisée dans des canaux expérimentaux (Watton et Hawkes 1984; Jobling *et al*., 2003), ainsi qu'un autre gastéropode, dit « pulmoné », *Planorbarius corneus* (Clarke *et al*., 2009). Depuis que nous avons commencé notre travail, une étude a été publiée, très peu de temps après la nôtre (Gust *et al*., 2010b), utilisant *P. antipodarum* dans des expositions *in situ* (Lance *et al*., 2010a; Schmitt *et al*., 2010b).

Dans ces conditions, nous avons développé une méthode d'exposition de *P. antipodarum* à des rejets d'effluents de STEP dans des hydrosystèmes très divers.

Espèce	Lieu d'exposition	Durée et type d'exposition	Mortalité	Biomarqueurs étudiés	Type pollution	Référence
Elliptio complanata	Effluent St Laurent, 1 site amont, 2 avals (8 et 11 km)	1 an cages benthiques	18% en aval	MT, LPO, Dommage à ADN, Activité GST, Taux monoamine Transport ATP-dépendant et activité MAO	Urbaine : coliformes, coprostanol, pyrene, médicaments	(Gagné *et al*., 2004)
				Facteur condition, GSI, Sex ratio, ALP		(Blaise *et al*., 2003)
	Effluent St Laurent, 1 site amont (1.5km), 1 aval (5km)	62 jours		Protéines vtg-like dans l'hémolymphe Lipides totaux, carbohydrate et protéines dans la gonade		(Gagné *et al*., 2001)
				MT, EROD, Dommage ADN, Lipides totaux, Vn Activité phagocytose hémocytes		(Gagne *et al*., 2002)
Mytilus edulis	Zone contaminée en cuivre Norvège 4 sites en gradient de contamination	3 semaines		ALP dans les gonades Histochimie des réponses lysosomales Histologie des gonades et de la glande digestive	Cuivre	(Zorita *et al*., 2006)
	Côte danoise 6 stations	29 et 64 jours		Essai comète, Ache, stabilité lysosomale membranaire	Métaux lourds, OP	(Rank *et al*., 2007)
Dreissena polymorpha	Effluent STEP	112 jours	0.9%	ALP, Taux cholestérol et nonylphénol	Œstrogénique (E2, EE2, BPA)	(Quinn *et al*., 2004)
	Effluent St Laurent, 1 site amont (1.5km), 1 aval (5km)			MT, EROD, Dommage ADN, Lipides totaux, Vn		(Gagne *et al*., 2002)
	Site de référence et 4 sites en gradient de pollution sur la Zava	1 mois		Micronucléus, essai comète		(Klobucar *et al*., 2003)

Unio tumidus	Site témoin Fensh, 4km amont effluent et aval proche et 2.5km aval éloigné	15-30 jours		Se-GPX, non-Se-GPX, GRd, activité catalase et SOD, taux GSH et GSSG, peroxidation lipidique dans les branchies et glande digestive.	HAP, PCB	(Cossu *et al*., 1997)
Argopecten gibbus	Décharge en amont (14km) et aval (50 et 900m, 2.7km)	2 mois		MT, LPO, Vn, GST, Dommages ADN, Facteur de condition		(Quinn *et al*., 2005)

Tableau V-1 : Récapitulatif des expositions in situ réalisées chez les mollusques.

Ache : acétyl-cholineestérase, GSI : index gonadosomatique, GRd : gluthation réductase, GST : glutathion-S-transférase, Se-GPX : glutathione peroxidase Se-dépendante, non Se-GPX : glutathione peroxidase non Se-dépendante, GSH : gluthation réduit, GSSG : gluthation oxydé, LPO : péroxydation des lipides, MT : métalothionéine, SOD : superoxyde dismutase.

2. Exposition *in situ* de *P. antipodarum*

Une méthode d'encagement *in situ* de *P. antipodarum* a été développée, afin d'étudier les effets de pollutions localisées sur sa fécondité (nombre d'embryons dans la poche embryonnaire). Dans un premier temps, l'objectif était de déterminer si nous étions capable d'encager *P. antipodarum*, c'est-à-dire de le nourrir, de mettre au point des systèmes adaptés… Trois expositions indépendantes ont été réalisées, dans des rivières et bassins versants très différents, afin de tester la faisabilité et robustesse de la méthodologie.

Dans un deuxième temps, qui a eu lieu simultanément, nous voulions évaluer la capacité de discrimination entre des sites amonts et avals d'une pollution diffuse. Des rejets de STEP ont été choisis, car les effluents de STEP sont connus comme source de composés reprotoxiques dans l'environnement. Les trois expositions se sont donc faites en amont et aval des trois STEP très différentes.

La mortalité, la fécondité et les titres de stéroïdes sexuels ont été suivis.

Publication n°9:

In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray): example of WWTP effluent discharges.

M. Gust, T. Buronfosse, O. Geffard, R. Mons, H. Queau, J. Mouthon, J. Garric

Les mollusques, et *P. antipodarum* en particulier, sont sensibles aux EDCs à des concentrations environnementales. Une source majeure de contamination du milieu aquatique est représentée par les **effluents de station d'épuration**. *P. antipodarum* a déjà été utilisé pour des expositions i*n situ*, dans lesquelles, seule la mortalité avait été évaluée. Le but de l'étude était donc de développer une méthode de **suivi de la reproduction** sur des individus encagés.

Les effets de trois effluents de STEP sur la survie, reproduction, le poids et les titres de stéroïdes sexuels ont donc été évalués. Les paramètres physico-chimiques (conductivité, température), hydrologiques (débit de la rivière), les types de bassins versants (urbain, industriel ou agricole) et les tailles de STEP étaient très différents afin de couvrir une large gamme de type d'environnement et pollution. Dans tous les cas, des effets significatifs ont été observés en aval des décharges des effluents. Quelle que soit la rivière, la survie des adultes n'a pas été affectée, alors que la reproduction (embryons non coquillés) a été très réduite en aval des décharges après 3 à 4 semaines d'exposition (60 à 70% de diminution par rapport à l'amont), indiquant un fort effet **reprotoxique** des effluents.

Les concentrations de **stéroïdes** ont aussi été très affectées en aval des effluents de STEP. Une **bioaccumulation** de T et d'œstrone, composés vraisemblablement relargués dans les effluents, a été observée chez les escargots, respectivement sous forme de **T et E2 estérifiés**. Ce phénomène, décrit en laboratoire, est observé pour la première fois en aval d'une STEP. Sur un site, la diminution des titres d'E2 associée à une augmentation de ceux de T, en aval suggère la présence de polluants de type **fongicide** qui auraient modulé la synthèse des stéroïdes par inhibition de l'aromatase.

En conclusion, nous avons développé une méthode d'exposition qui semble **robuste** et assez **peu sensible** aux variations de **facteurs abiotiques**. Elle permet, en outre la **discrimination** entre des sites amont et aval d'une pollution. La mesure des stéroïdes sexuels est un marqueur de pollution organique.

Mots-clés: *P. antipodarum*, reproduction, stéroïdes, encagement, effluent de STEP

Water Research, 2010, 44, 4517-4528

Author's personal copy

WATER RESEARCH 44 (2010) 4517–4528

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges

Marion Gust [a,b], *Thierry Buronfosse* [c], *Olivier Geffard* [a], *Raphael Mons* [a], *Herve Queau* [a], *Jacques Mouthon* [d], *Jeanne Garric* [a,*]

[a] *Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau, 69009 Lyon, France*
[b] *AgroParisTech ENGREF, 19 Avenue du Maine, 75732 Paris, France*
[c] *Université de Lyon. Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France*
[d] *Cemagref, UR MALY, Laboratoire DYNAM, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 November 2009
Received in revised form
1 June 2010
Accepted 8 June 2010
Available online 15 June 2010

Keywords:
Waste water treatment plant effluent
Potamopyrgus antipodarum
Reproduction
Steroids hormones
Caging experiment

ABSTRACT

Mollusk species have been shown to be sensitive to various endocrine disrupting compounds (EDC) at environmentally relevant concentrations. Waste water treatment plant (WWTP) effluents are a major source of potential or known EDC in the aquatic environment. The aim of this study was to develop an *in situ* exposure method using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Molluska, Hydrobiidea) to assess the impact of water quality on the life traits of this species, by focusing on its reproduction. The impact of three WWTP discharges on three different receiving rivers was studied. The effects of WWTP effluent on adult survival, weight, reproduction and vertebrate-like sex-steroid levels in snails were monitored for three to four weeks. Although the physico-chemical and hydrological parameters varied greatly between the rivers, the caging experiments allowed us to detect significant impairment of the life traits of snails when exposed downstream of the WWTPs discharge. While adult survival was not affected by exposure, reproduction was significantly impacted downstream from the WWTP effluent discharges (60–70% decrease of embryos without shells after three to four weeks exposure) independently of the river. Modulations of steroid levels proved to be an informative parameter with an increase of testosterone downstream of the discharges, and increases and decreases of 17β-estradiol levels according to site. The endpoints used proved to be an adapted method for field exposures and allowed the discrimination between upstream and downstream sites.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* *Corresponding author*. Present address: Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 09, France. Tel.: +33 472208739; fax: +33 478477875.
E-mail addresses: marion.gust@cemagref.fr (M. Gust), thierry.buronfosse@inserm.fr (T. Buronfosse), Olivier.geffard@cemagref.fr (O. Geffard), raphael.mons@cemagref.fr (R. Mons), herve.queau@cemagref.fr (H. Queau), jacques.mouthon@cemagref.fr (J. Mouthon), jeanne.garric@cemagref.fr (J. Garric).
0043-1354/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.watres.2010.06.019

Author's personal copy

1. Introduction

In situ approaches are an improvement in comparison to current monitoring techniques because of their low cost and ease of application. They also allow the translocation of organisms to investigate selected sites even in the absence of native organisms. In addition, they provide a time-integrated assessment of environmental quality, reflecting exposure over several weeks (Regoli et al., 2006). *Gammarus* or bivalves are the main aquatic species used in field caging experiments (see for example Dedourge-Geffard et al., 2009; Gagné et al., 2001, 2004; Gagne et al., 2002; Blaise et al., 2003; Quinn et al., 2004). Additional species must be introduced to replace or complement the species currently used in ecotoxicology to take better account of species diversity and improve environmental risk assessment (Breitholtz et al., 2006). The addition of a gastropod species such as *Potamopyrgus antipodarum* (Molluska, Hydrobiidea) in a battery of experimental methodologies could help ensuring better representativeness of the biological sensitivity of aquatic macroinvertebrates, particularly when reprotoxic effects are assessed.

The freshwater mudsnail *P. antipodarum* has been proposed as a suitable test species to assess the impact of EDC on invertebrates and has been recommended for use in the development of reproduction tests within the OECD guideline "Ad hoc Expert Group on Invertebrate Testing" (Duft et al., 2007). Also, it is currently considered to be the most promising species for use in partial lifecycle testing (Matthiessen, 2008). Indeed, known endocrine disrupting compounds (EDC) have been shown to impair mollusk reproduction at environmentally relevant concentrations (Duft et al., 2003; Oehlmann et al., 2006) although certain results are contradictory (Aufderheide et al., 2006; Selck et al., 2006), due to the high variability of results obtained from the endpoints measured, and lack of knowledge of their endocrinology. *P. antipodarum* is an invasive parthenogenetic ovoviviparous freshwater mudsnail now common in European countries. It thrives in running water from small creeks to streams, lakes and estuaries, in mud and sand, on rocks, gravel and aquatic plants (Winterbourn, 1970) and it a sensitive test organism already used in laboratory tests and experimental streams. It displays comparable response and relative sensitivity when compared to fish species exposed to WWTP effluent (Jobling et al., 2003). *In situ* exposure of caged *P. antipodarum* has been successfully performed to measure the effects of pollutant discharges on its survival (Brown, 1980).

The effects of WWTP effluent on gastropod reproduction have been demonstrated by several studies using experimental streams (Watton and Hawkes, 1984; Jobling et al., 2003; Clarke et al., 2009), and shown a significant increase of their fecundity when exposed to an estrogenic effluent. However no *in situ* studies have yet described effects at the individual level in mollusks. The effects of point source pollution on mollusks in the field are mainly related to biochemical effects, through the use of different biomarkers on bivalves (metallothionein, vitellin, DNA damage, metabolic activities, stress biomarkers, etc.), either measured on autochthonous (Gagné et al., 2007) or caged organisms (Gagné et al., 2001, 2004; Gagne et al., 2002; Blaise et al., 2003; Quinn et al., 2004). However, few of these biomarkers are potentially indicative of endocrine disruption. Although debate continues on the biological relevance of steroids debated, many observations support a physiological role of vertebrate-like sex steroids in mollusk reproduction (reviewed in Matthiessen, 2008), which could make their measurement a useful tool in endocrine disruption assessment. Vertebrate-like sex steroids have been identified in *P. antipodarum* by using both radioimmunoassay and LC-MS analysis (Gust et al., 2009).

Our study aimed to develop an efficient *in situ* biotest to assess the impact of point source pollution on *P. antipodarum* life traits and biomarkers. To achieve this objective we exposed organisms in three rivers receiving WWTP effluent discharges of varying quantities and characteristics, since WWTP effluents are a major source of pollution in aquatic environments and contain thousands of chemicals including many potential or known EDC (natural hormones produced by animals and humans, synthetic steroids found in contraceptive pills, pesticides, surfactants, plasticizers, etc. Kolpin et al., 2002). The decline of certain freshwater mollusk populations in North America is to a certain extent due to effluent discharges, although numerous other factors exist (Lydeard et al., 2004).

The specific purposes of this study were threefold: (i) to determine the suitability of *P. antipodarum* to assess the impact of point source WWTP effluent on field exposure; (ii) to determine the effects of effluent discharges on its survival, weight reproduction and sex-steroid levels; (iii) and finally to determine if similar response patterns occurred in the three rivers tested.

2. Material and methods

Adult *P. antipodarum* organisms were obtained from natural populations collected in a canal close to the Rhone River one month before the beginning of the experiments. The juveniles were obtained from long-term cultures raised in our laboratory (Cemagref, Lyon, France). These cultures were initiated with snails that originated from the previous natural populations.

2.1. *In situ exposure of snails*

The organisms were exposed upstream and downstream of three WWTP effluent discharges. These waste water treatment plants were located on three rivers characterised by quite different watersheds, about 30 000, 750 and 220 km^2 for the Saone, Bourbre and Ardiere Rivers, respectively. The Saone and Bourbre Rivers drain densely populated urban and industrial areas, while the downstream Ardiere watershed is mainly characterised by large vineyards (Fig. 1). The three WWTPs treat 30 000 (Saone), 78 000 (Bourbre) and 7900 (Ardiere) equivalent inhabitants (see Table S1: Table S2 and Fig. S1 in Supplementary Information, SI, for more data).

Adult snails were placed in rigid plastic containers with both extremities replaced by mesh. These containers were placed in cages specifically designed for exposure in rivers. One cage per site was exposed and contained six replicates. The remaining space in the cages was loaded with rocks to

Author's personal copy

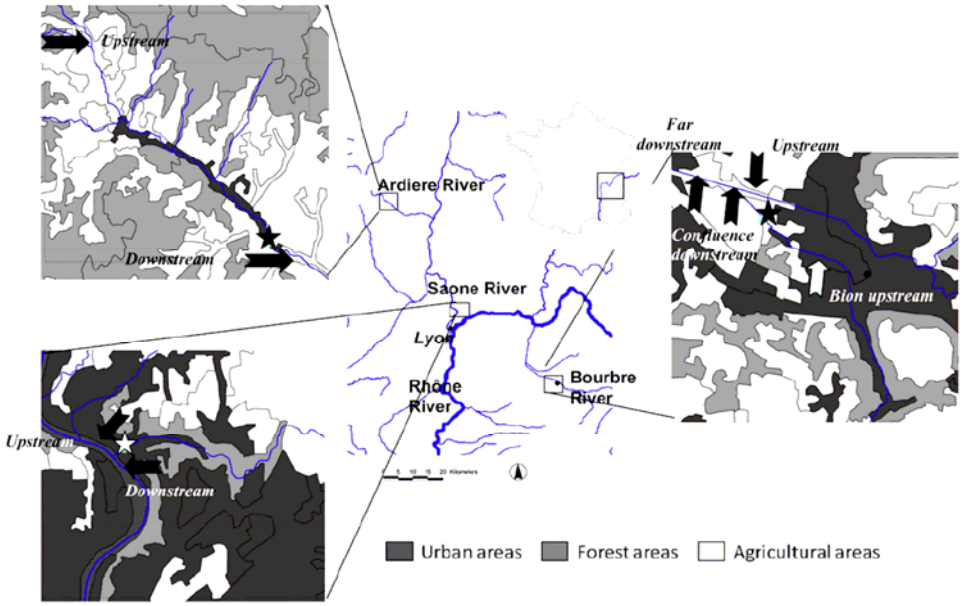


Fig. 1 – Site localisation (the star represents the WWTP effluent discharge localisation and the arrows the sampling site localisations).

ballast the cages and rocks covered with biofilm collected from a reference site (Morcille, Rhone, France) were introduced in the containers to provide food. Temperature monitoring probes were fixed to one cage at each site. Conductivity was measured at least weekly in parallel with the biological measurements. The daily river and effluent flows were provided by the water body authorities and WWTP administrators (http://www.hydro.eaufrance.fr/) and are displayed in Fig. S1 (SI). The size (4.2 ± 0.2 mm) and weight (9.5 ± 1.2 mg) of the adults were measured one day before putting them in the exposure chambers.

Experimental designs were similar in the Ardiere and Saone Rivers. One cage was placed in an easily accessible upstream site with characteristics similar to the downstream site (about 20 m in the Saone River and about 7 km in the Ardiere River) and about 50 m downstream of the WWTP effluent discharge (Fig. 1). Six replicates per site were deployed, each with 50 adults and 10 juveniles. The exposures lasted 28 days in the Saone River, from 10 June to 8 July 2008, and 21 days in the Ardiere River, from 10 to 30 June 2008, due to weather conditions.

In the Bourbre River exposure also lasted 28 days, from 3 to 30 September 2008. It was performed on two upstream and two downstream sites. One of the upstream sites (Bion upstream) was located in a small tributary of the main stream into which the effluent is discharged. The other (Bourbre upstream) was located in the Bourbre River about 100 m of the confluence of the Bourbre River with the mixed effluent – Bion stream, where the first downstream site was situated (Confluence downstream). The last cage was immerged farther downstream (Bourbre downstream), several hundred meters from the confluence (Fig. 1). Six replicates of 100 adults and three replicates of 30 juveniles were deployed at each site.

2.2. Biological measurements

Mortalities of adults were counted every week directly in the field. The cages were opened and the organisms were observed.

Fecundity was assessed on days 0, 7, 21 and 28 on 30 adults randomly taken from the 6 replicates (5 per replicate) and preserved in the river water until the measurements were performed. The embryos in the brood pouch were counted at the laboratory using a technique adapted from Duft et al. (2003): the number of shelled and unshelled embryos (new embryos) was counted under a binocular microscope.

Adult weight was measured again after 21 days exposure.

2.3. Steroids measurements

The total levels of total testosterone (T), progesterone (P) and 17β-estradiol (E2) using a radioimmunoassay (RIA) technique were measured on days 0, 7, 21 and 28 on pools of 2 *P. antipodarum* (5–10 pools of 2 snails according to exposure) randomly taken from the containers and preserved in the water river until they were frozen. We used a previously published technique (Gust et al., 2010b). Briefly, pools of 2 snails were homogenized in 1% (v/v) trifluoro acetic acid and extracted twice with methylene chloride. After saponification, steroids were extracted twice with methylene chloride and resuspended in 80 μL 1% steroid free Bovine Serum Albumin (BSA). The samples were assayed using commercial RIA kits for E2 (Orion Diagnostic, Espoo, Finland) and T and P (Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA).

2.4. Statistical analysis

Normality distribution and homogeneity of variance of the data were tested and one-way ANOVAs were performed.

Author's personal copy

Significance was set at $p \leq 0.05$. In the case of rejection of H_0, an *a posteriori* LSD (Least Significant Difference) test was applied. When necessary, a Kruskal–Wallis test followed by a Mann–Whitney *U*-test were performed. All statistical analyses were performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Saone River

After 28 days of exposure, adult mortality was low (5%) and not significantly different between any upstream and downstream site. Adult weight was similar between upstream and downstream sites and did not differ from day 0 (Table 1). On day 7, no significant effects ($p > 0.05$) were detected on the number of embryos in adult snails between upstream and downstream sites. On the contrary, on day 21 the shelled, unshelled and total number of embryos fell ($p < 0.05$) downstream versus upstream (decreases of 60%, 48% and 54% respectively). The decrease of the unshelled embryos was sharper on day 28 compared to day 21 (60% decrease downstream versus upstream) and the total number of embryos and the shelled embryos continued to fall (48% and 37%, Table 1). At the upstream site, the total number of embryos did not vary significantly ($p > 0.05$) between the beginning and end of exposure, nevertheless the unshelled embryos significantly increased ($p < 0.05$) on day 21 and 28 compared to day 0 and 7 (Fig. 2A).

On both upstream and downstream sites, depending on the steroids, we measured significant ($p < 0.05$) modifications of their levels during exposure with an increase of T and P levels compared to day 0. Moreover steroid levels in the snails were clearly impacted by the WWTP effluent discharges, with an increase of E2 levels downstream of the effluent discharge versus the upstream site, but it was only significant ($p < 0.05$) on day 21 (Fig. 3A). Testosterone levels were also significantly higher ($p < 0.05$) downstream versus upstream on days 21 and 28 (Fig. 4A). No significant differences between upstream and downstream P levels in the snails were measured (Fig. 5A).

3.2. Ardiere River

After 21 days of exposure, 5% and 12% of the adult snails were dead in the upstream and downstream site respectively. Adults exposed at the downstream site for 21 days weighed more than those of the upstream site and day 0 (Table 1). The experiment was stopped at this point to assess the effect on adult fecundity. Once again no significant effect ($p > 0.05$) of exposure was detected on the fecundity of the snails located upstream of the discharge during the period. The total

Table 1 – Effects of in situ exposures upstream and downstream of WWTP effluent discharges on P. antipodarum life traits (mean values and standard deviation). Bold characters indicate significant difference (P < 0.05, Dunnett-t test or Mann–Withney U-test) from the upstream site.

			Saone River		Ardiere River		Bourbre River			
			Upstream	Downstream	Upstream	Downstream	Bion upstream	Bourbre upstream	Confluence downstream	Bourbre downstream
Adult mortality			5%	5%	5%	12%	2%	1%	2%	2%
Reproduction	Day 7	"New" embryos	2.72 (3.24)	2.85 (3.10)	5.57 (3.56)	5.96 (3.43)	7.46 (2.99)	6.19 (3.33)	**3.50 (2.83)**	5.29 (2.87)
		Shelled embryos	5.75 (4.68)	7.26 (4.38)	9.83 (6.66)	6.55 (3.79)	7.04 (3.81)	5.19 (2.69)	4.89 (3.60)	**3.10 (2.52)**
		Total embryos	9.52 (6.43)	10.11 (5.67)	15.40 (8.85)	12.24 (6.29)	14.50 (5.52)	11.37 (4.43)	8.39 (4.75)	8.20 (3.44)
	Day 21	"New" embryos	6.20 (2.81)	**3.28 (2.58)**	4.54 (2.98)	**1.26 (1.73)**	9.63 (4.97)	8.20 (4.85)	**4.37 (5.34)**	**5.17 (5.34)**
		Shelled embryos	8.24 (4.57)	**3.50 (5.03)**	6.82 (4.03)	5.29 (4.41)	7.32 (4.75)	6.67 (5.57)	**3.80 (3.74)**	7.24 (4.73)
		Total embryos	14.44 (5.51)	**6.78 (6.68)**	11.36 (4.91)	**6.55 (4.66)**	16.44 (5.80)	14.79 (6.50)	**10.60 (7.10)**	12.41 (7.62)
	Day 28	"New" embryos	5.03 (3.53)	**2.03 (2.18)**			10.03 (6.12)	10.27 (3.95)	**3.07 (5.10)**	**5.27 (4.15)**
		Shelled embryos	5.97 (5.15)	**3.77 (3.85)**			7.73 (4.45)	5.73 (3.38)	**5.53 (3.65)**	5.97 (4.05)
		Total embryos	11 (6.76)	**5.81 (5.14)**			17.77 (6.89)	16.00 (5.93)	**8.60 (7.11)**	**11.23 (6.93)**
E2/T	Day 7		0.57	0.55	0.29	**0.12**				
	Day 21		0.25	0.31	0.29	**0.06**	0.18	0.15	0.19	0.14
	Day 28		0.29	0.22			0.21	0.17	0.31	0.21
Weight mg/ad	Day 0		8.37		8.37		10.67			
	Day 21		8.21	8.39	8.48	9.13	12.53	12.60	12.90	12.97

Author's personal copy

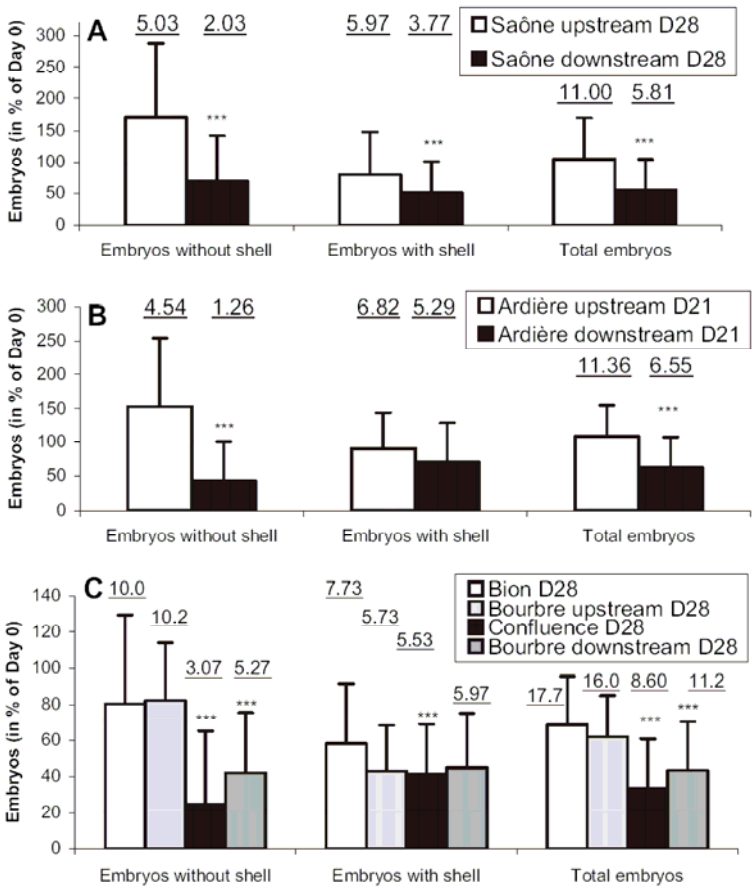


Fig. 2 – Number of embryos in the brood pouch per adult *P. antipodarum* at the end of the exposures in percentage of day 0 (mean value and standard deviation). Underlined values: mean absolute number of embryos. * indicates significant differences from the upstream site (*P < 0.01, Dunnett-t test). A. Saone River. B. Ardiere River. C. Bourbre River. N = 6 pools of 5 snails.**

number of embryos varied from 10.5 (day 0) to 11.2 (day 21), with an increase of the proportion of the unshelled embryos at the end of exposure compared to day 0 (Fig. 2B). On the contrary, the shelled embryos and the total number of embryos were significantly lower ($p < 0.05$) downstream compared to upstream on day 7. On day 21, the numbers of unshelled embryos and total embryos in the downstream site were also significantly affected ($p < 0.05$) compared to those recorded upstream, with falls of respectively 72% and 44% compared to the upstream snails (Table 1).

In both upstream and downstream sites E2 levels in the snails were not significantly different ($p < 0.05$) during the exposure compared to day 0. E2 levels were lower in the downstream snails compared to upstream, particularly on day 21 (43% decrease, Fig. 3B). On the contrary T levels were significantly higher ($p < 0.05$) compared to day 0 throughout the whole exposure and on both sites except in the upstream snails on day 21. Once again, T levels were significantly higher ($p < 0.05$) in downstream snails compared to those upstream on days 7 (216% upstream) and 21 (290% upstream, Fig. 4B). Progesterone levels in the snails increased during the exposure, but no significant differences were noted between upstream and downstream snails. The highest levels were observed on day 7 (Fig. 5B).

3.3. *Bourbre River*

Adult mortality was low (less than 5%) and not significantly different between upstream and downstream sites after 28 days of exposure. Adult weight after 21 days was slightly higher in downstream snails, but clearly increased for all snails compared to day 0 (Table 1).

Adult fecundity was quite similar on the two upstream sites, with a reduction of about 30% of the total embryos after 28 days exposure compared to day 0 (Fig. 1C). Nevertheless we measured a significant ($p < 0.05$) decrease of unshelled embryos at the Confluence (49%) and Bourbre downstream (33%) sites compared to the upstream sites on day 7. On day 21 unshelled embryos were lower ($p < 0.05$) at both downstream sites (51% and 42%) compared to the upstream sites, whereas the number of shelled embryos ($p < 0.05$) was lower only at the Confluence site (46%). As in the Saone River, the effects

Author's personal copy

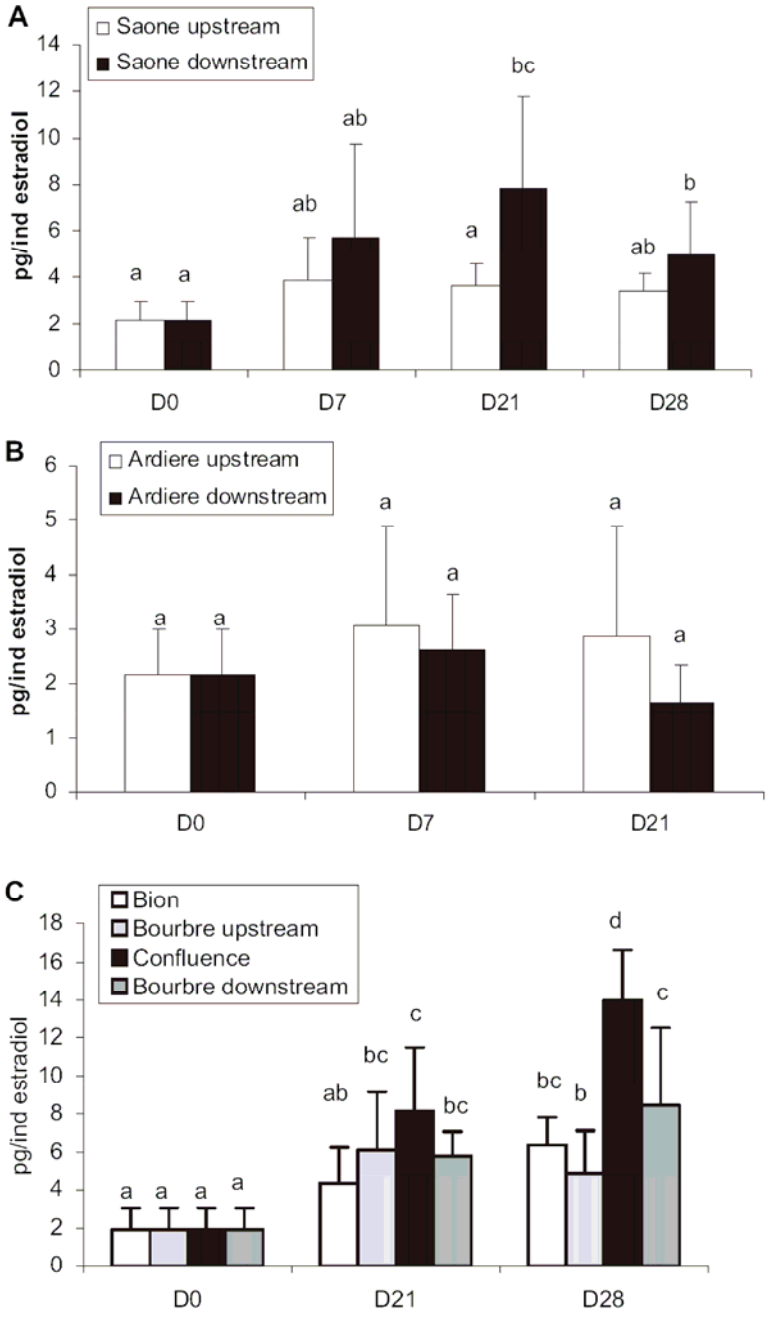


Fig. 3 – 17β-estradiol levels (mean value and standard deviation) in the snails exposed upstream and downstream of WWTP effluent discharge at day 0, 7, 21 and 28 (a < b < c < d; P < 0.05, Mann–Withney U-tests). A. Saone River (N = 6 pools of 2 snails). B. Ardiere River (N = 6 pools of 2 snails). C. Bourbre River (N = 10 pools of 2 snails).

were more pronounced on day 28. The decrease ($p < 0.05$) of the number of unshelled embryos was higher in the snails closest to the discharge (Confluence: 70% compared to the upstream site) than in the Bourbre downstream (48%). The number of shelled and total embryos also was lower ($p < 0.05$) on day 28 at both downstream sites compared to the upstream sites (49% and 18% for the Confluence and 33% and 11% for the Bourbre downstream, Table S2).

Contrary to the two other exposures, E2 levels in snails increased significantly ($p < 0.05$) for all sites and days compared to day 0 (except for Bion, day 21). They were significantly ($p < 0.05$) higher at the Confluence compared

Author's personal copy

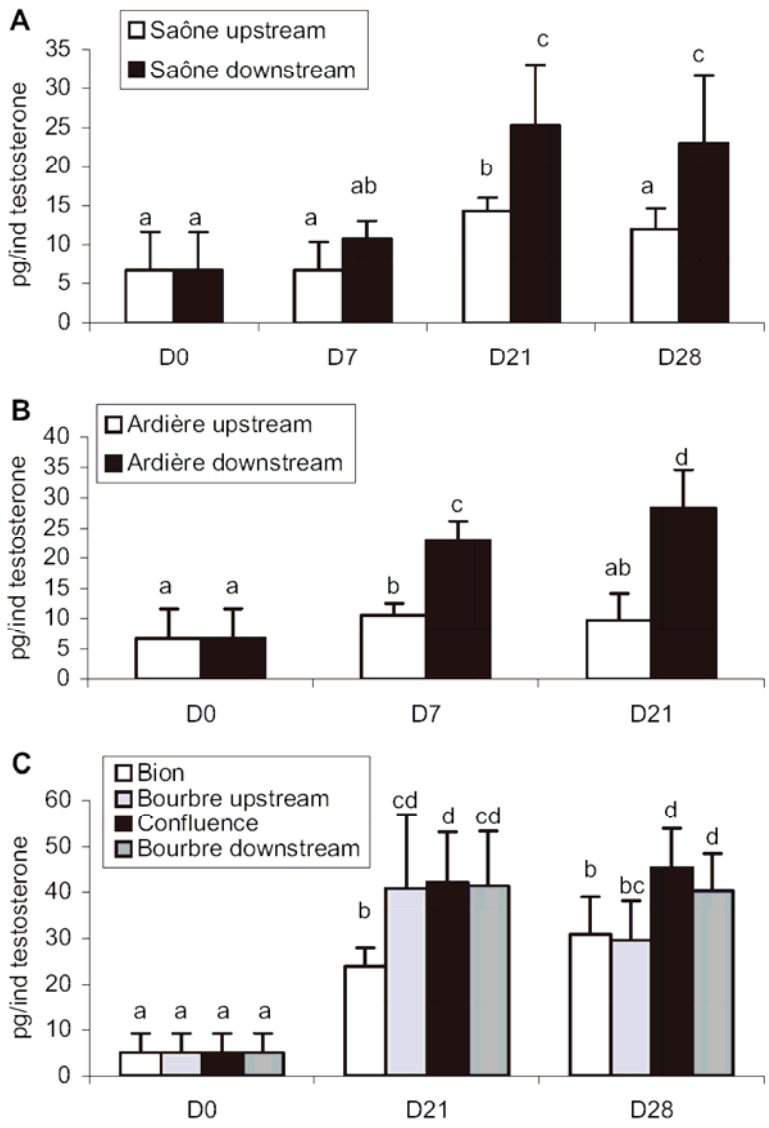


Fig. 4 – Testosterone levels (mean value and standard deviation) in the snails exposed upstream and downstream of WWTP effluent discharge at day 0, 7, 21 and 28 (a < b < c < d; P < 0.05, Mann–Withney U-tests). A. Saone River (N = 6 pools of 2 snails). B. Ardiere River (N = 6 pools of 2 snails). C. Bourbre River (N = 10 pools of 2 snails).

to both upstream sites on day 28. E2 levels were slightly lower at the Bourbre downstream site compared to the Confluence, but remained higher than upstream. On day 28, E2 level was highest at the Confluence site, with an increase of 726% compared to day 0 ($p < 0.05$), and 219% and 286% compared to Bion ($p < 0.05$) and the second upstream site ($p < 0.05$; Fig. 3C). As for the other sites, T levels significantly ($p < 0.05$) increased during the exposure and were significantly higher on both downstream sites compared to upstream sites on day 28 (Fig. 4C). As with the other rivers, P levels in snails increased with exposure duration but did not vary significantly between upstream and downstream sites (Fig. 5C).

4. Discussion

4.1. *Exposure conditions and water quality*

Snails were exposed in streams with different surroundings (urban, agricultural and industrial) and hydrological characteristics, and subjected to effluent treated by WWTPs with different characteristics (see SI). The conductivity between rivers ranged from 100 to 800 µS/cm. The highest temperatures were measured in the Saone River and the lowest in the Bourbre River. Whatever the river, exposure temperatures ranged from 14 to 21 °C. However the physicochemical

Author's personal copy

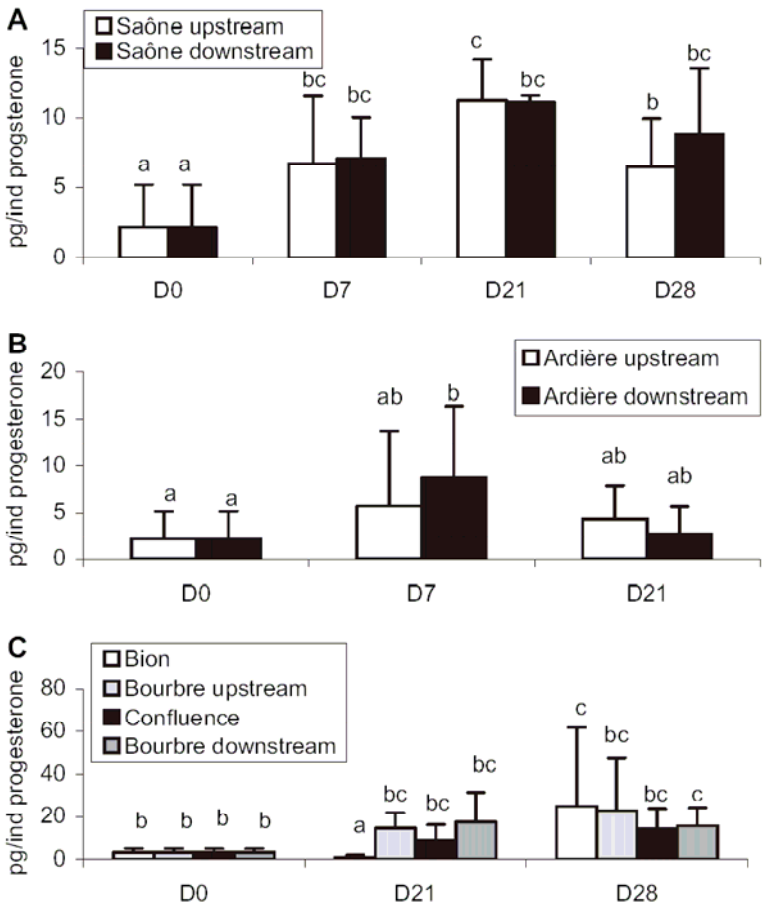


Fig. 5 – Progesterone levels (mean value and standard deviation) in the snails exposed upstream and downstream of WWTP effluent discharge at day 0, 7, 21 and 28 (a < b < c < d; $P < 0.05$, Mann–Withney *U*-tests). A. Saone River ($N = 6$ pools of 2 snails). B. Ardiere River ($N = 6$ pools of 2 snails). C. Bourbre River ($N = 10$ po ols of 2 snails).

parameters were very similar between upstream and downstream sites.

Chemical analysis performed simultaneously with ecotoxicological experiments showed that the three streams were heavily contaminated by beta-blocker pharmaceuticals (around 100 ng/L), estrogenic compounds (alkylphenols: 50–200 ng/L) and steroid hormones downstream from the discharge (Bourbe > Saone > Ardiere). No estrogenic hormones were found in the Ardiere River, while estriol was measured at the downstream site (10 ng/L) in the Saone River and estrone in the Bourbre upstream (2 ng/L) and downstream (15 and 5 ng/L in the immediate vicinity and farther downstream) (Jacquet et al., 2008). In addition, the Ardiere River was contaminated at the downstream site with pesticides (herbicides and fungicides) that were measured throughout the year (Chambre Agriculture Rhone, 2008), in particular tebuconazole (up to 0.47 μg/L in June 2007).

Although physicochemical and hydrological parameters were rather different depending on the river, we observed high survival rates and no loss of weight in the snails exposed at the upstream sites. *P. antipodarum* is not sensitive to variations in abiotic factors (Lassen and Kristensen, 1978). This supports the suitability of our exposure methodology. However, some variations of fecundity and steroid levels were observed during exposure in the upstream sites. Indeed reproduction was generally constant during exposure in the Saone and Ardiere Rivers, while it decreased in the Bourbre River. T and P levels increased in all three upstream sites during exposure, while E2 levels either increased in the Bourbre River or changed little in the Saone and Ardiere Rivers, upstream. These variations could be linked to the period of the experiment in the year as they match annual variations of fecundity and steroid levels in the natural population used for the experiments (unpublished results). Indeed the Bourbre experiment was performed in fall, while the others were performed in summer. During the summer experiments, snails were just beginning to reproduce and water temperature increased during the exposure. On the contrary, at the beginning of the Bourbre experiment, the snails had reached their highest reproduction capacities. Their fecundity was higher than in previous exposures. In September the temperature of the Bourbre River decreased throughout exposure and rapidly fell below 16 °C, with fecundity decreasing

Author's personal copy

in both upstream sites. As shown by Clarke et al. (2009), it is important to consider the time of exposure in the year in relation to the snails' breeding season. The upstream and downstream snails in the same experiment were considered to have the same physiological status, thus the temporal variation of reproduction observed upstream was considered physiological. As environmental factors modulate the observed endpoints, comparisons can only be made between upstream and downstream sites of the same river, but not between exposures.

4.2. *Responses of* P. antipodarum*'s life traits to field exposure upstream and downstream of WWTP discharges*

To our knowledge, this experiment is the first using caging experiments to assess the effects on water quality downstream of point source pollution (WWTP effluent discharges), using reproductive parameters and biomarkers in a mollusk species. Exposure to effluents did not lead to *P. antipodarum* adult mortality but clearly impacted their reproduction. The causes of such a sub lethal impact need further elucidation.

No food was provided to the snails during the exposure, and organisms were fed only with biofilm present on rocks. Issues can be raised due to the possible starvation of the organisms leading to decreased reproduction. Nevertheless, we can hypothesize that the snails were in similar feeding conditions because the adults did not lose weight after 21 days exposure, with increased (but not significant) biomass downstream of the effluent compared to upstream. This could indicate increased food supply at the downstream sites. Moreover, no significant mortality was observed downstream of the discharges. These results allow us to interpret the effects of the exposures on the snails' fecundity independently of the food resources in the same way as Clarke et al. (2009). Moreover as *P. antipodarum* feeds on detritus-decomposing bacteria, they are able to feed naturally in submerged cages (Brown, 1980). Thus the decrease of fecundity observed can be reasonably linked to the effluents discharged in the rivers.

P. antipodarum fecundity was a very sensitive parameter with a significant reduction of embryo production downstream of all three of the WWTPs discharges.

P. antipodarum has already been used to assess the effect of effluents in experimental streams at ambient temperature (Jobling et al., 2003; Clarke et al., 2009). Such semi-field or *ex situ* exposures have already proved the usefulness of this species in ecotoxicology testing. Contrary to the results found in the literature (Watton and Hawkes, 1984; Jobling et al., 2003; Clarke et al., 2009) where fecundity was mostly induced by effluent exposures, we observed that reproduction decreased downstream from the discharges. We have no clear hypothesis to explain these results in contradiction to those already described in snails exposed to diluted WWTP effluent in experimental streams. In both studies where fecundity was induced, the tested effluent was estrogenic to fish and contained a variety of environmental estrogens and natural and synthetic steroid estrogens (Jobling et al., 2003; Clarke et al., 2009). These chemicals were similar to those measured in our exposure, but the concentrations were much lower for the alkylphenols in our rivers (Jacquet et al., 2008). In the experimental streams used by these authors, dilution was controlled, and the minimum concentration of the effluent was 12.5% (Jobling et al., 2003), i.e. much higher than that which occurred during our exposures (Table S1). As WWTP effluents are very complex mixtures of many chemicals in various proportions, the different natures of the effluents tested could also explain these contradictory observations. It is unlikely that our exposure conditions were stressful enough downstream of the discharges to mask any potential induction of reproduction due to the presence of known inducing compounds for snails such as alkylphenols, BPA, etc. (Duft et al., 2003; Jobling et al., 2003; Oehlmann et al., 2006), as biomass increased. However, the induction of fecundity in the presence of effluent rich in organic matter may be the result of improved food supply, as already shown in other studies using experimental streams (Watton and Hawkes, 1984). Nevertheless it would appear that the various compounds (steroids, pharmaceuticals, etc.) released into the rivers by the effluent discharges interfered with the reproductive performance of *P. antipodarum*. The mechanisms of the fall in reproduction observed are still unknown.

4.3. *Variations of steroid levels during exposure*

This is the first report of steroid measurement and variations in the freshwater gastropod *P. antipodarum* exposed in a river downstream of a WWTP effluent discharge. Vertebrate-like steroids, including 17β-estradiol (E2) and testosterone (T), have been identified in several bivalve and gastropod mollusks. Their origin (exogenous or endogenous), however, remains unclear, although the main steps of their endogenous synthesis have been described (reviewed in Janer and Porte, 2007). Moreover, certain temporal variations in their levels have been linked to the reproductive cycle in bivalves (reviewed in Lafont and Mathieu, 2007) and gastropods (Sternberg et al., 2008). In prosobranch gastropods, estrogen receptors (ER) have been identified (Bannister et al., 2007; Castro et al., 2007; Sternberg et al., 2008). They are orthologues of *Octopus vulgaris* ER, which is a strong constitutive transcriptional activator, but does not bind E2 and is unresponsive to vertebrate steroid hormones (Keay et al., 2006). The biological relevance of steroids is still being debated, but these observations support the assumption that sex steroids play a physiological role in mollusk reproduction, although their mode of action remains unknown.

Increased steroid levels can be either explained by the bioaccumulation of estrogenic, androgenic and progesteronic compounds released by WWTPs, or by an increase in their biosynthesis. Bioaccumulation of T and E2 is described in several gastropod and bivalves species. Conjugation of steroids (T, E2) with fatty acids can regulate the level of free hormones, which are assumed to be the physiologically active fraction (Gooding and LeBlanc, 2001; Labadie et al., 2007). The enzymes involved in these mechanisms can be impaired by chemicals (Janer et al., 2006). The RIA technique used in this study to measure sex steroids is specific and permitted measuring the total levels of steroids, both free and conjugated.

The P levels increased in all three exposures compared to day 0, independently of the exposure site. As no strong modulation of this steroid was observed, the measurement of this synthesis intermediary does not seem very informative.

On the contrary, E2 and T levels were strongly modulated by the effluent discharges. The increase in T levels observed at all

Author's personal copy

downstream sites were several-fold above the physiological values observed during the annual cycle of our reference population of *P. antipodarum* (personal data). This compound is also easily bioaccumulated in gastropods (Gooding and LeBlanc, 2001). No T measurements were performed downstream of the discharges studied, but they had already been shown to be released by WWTP effluents (Kolodziej et al., 2003). Thus it can be assumed that the increased T levels finally observed in the snails encaged in the three rivers compared to those observed at the beginning of the exposures can be attributed more due to bioaccumulation than biosynthesis.

The E2 levels observed in the Bourbre and Saone downstream were also up to 15-fold above the physiological values of *P. antipodarum* (personal data). Moreover, the E2 levels in snails in the Bourbre River were in line with the measured estrone concentrations in the River, pointing toward the hypothesis of bioaccumulation. Indeed waterborne estrone is metabolized in E2 and bioaccumulated in *Mytilus edulis* (Labadie et al., 2007). In the Saone River, only estriol was measured, and estriol is not susceptible to metabolization in E2 in mollusks. This could explain the lower increase of E2 levels at the downstream site compared to the upstream sites of the Saone River (150%) than those of the Bourbre River (290%). In the Ardiere River, no bioaccumulation of E2 was observed downstream of the effluent discharge and no steroids or estrogens were detected at the downstream site. Although very high levels of T and E2 were measured in the downstream sites compared to basal levels, the reproductive effects observed downstream from the effluent discharge are difficult to link to a toxic effect of steroid hormone bioaccumulation. The consequences of steroid bioaccumulation on reproduction remain to be assessed and raise the issue of long-term exposure to steroids and the effects of their bioaccumulation on natural populations.

The decrease of E2 levels combined with the sharp increase of the T levels downstream of the effluent discharge in the Ardiere River which drains vineyards could be connected to a modulation of biosynthesis as observed with certain toxicants in gastropods subjected to exposure in the laboratory (Bettin et al., 1996; Gust et al., 2010a). Contrary to the other two rivers, where the E2/T ratio was comparable between upstream and downstream sites, for the snails exposed at the Ardiere sites, the ratio was 0.29 at the site upstream and 0.12 at those downstream on day 7, and 0.29 and 0.06 on day 21. These observations are consistent with the mode of action of certain fungicides that inhibit the aromatase and metabolization of T into E2. Tebuconazole is a fungicide also known for its inhibitory action on aromatase activity (Trösken et al., 2004). The reduced fecundity downstream of the discharge could be partially explained by such a mechanism. Indeed, it was previously shown that a specific aromatase inhibitor (fadrozole) could inhibit reproduction (80% decrease of unshelled embryos compared to a control) of *P. antipodarum* and lead to a similar decrease of E2/T (Gust et al., 2010a).

In our experiments reproduction impairment and total steroid level cannot be linked, as a decrease of reproduction was observed whatever the steroid levels downstream of the discharges. Nevertheless, steroid levels measured in snails showed different patterns of response when they were exposed in sites contaminated differently. Regarding these caging experiments it appears that an increase of both E2 and T levels above their physiological values strongly indicates global organic pollution.

5. Conclusion

Our results confirm that *P. antipodarum* can be a suitable organism for assessing the impact of point source pollution on freshwater systems, as it is tolerant to abiotic factor variations (temperature, conductivity, flow). Indeed *P. antipodarum* is (i) capable of surviving in a wide range of systems (lakes, rivers, brackish and estuarine waters), (ii) it is responsive to toxics, (iii) it is easily maintained as a viable stock population in the laboratory, and is capable of providing suitable specimens for analysis throughout the year, (iiii) and it feeds on detritus-decomposing bacteria that develop easily in submerged cages. Reproduction is a suitable endpoint for assessing the impact of point source pollution as fecundity can be monitored easily. Our exposure methodology allowed observing discriminative effects on snail fecundity between upstream and downstream sites. Hormone ratios appeared useful for detecting the exposure of snails to steroid biosynthesis pathway disruptors and steroid measurements appear to be indicative of organic pollution. However, more work is required to better characterise the natural variability of the endpoints used in field studies. The effects of biotic and abiotic parameters such as season of exposure, suspended matter, food, etc. on its life traits must also be assessed in greater detail.

Acknowledgments

The present work was partly funded by the *French water agency* ONEMA (*Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques*). The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon (Prof. F. Garnier) for the financial grant provided for RIA analysis. Solange Couturier and Claire Plantarose are gratefully acknowledged for their technical help as is Hervé Pella for the maps. We also thank Clothilde Billat (Grand Lyon), Pierre-Yves Bigot and Stephane Faure (Lyonnaise des Eaux) for providing the WWTP effluent flows, Banque Hydro (http://www.hydro.eaufrance.fr/) and the Compagnie Nationale du Rhône for providing the river flows.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.watres.2010.06.019.

REFERENCES

Aufderheide, J., Warbritton, R., Pounds, N., File-Emperador, S., Staples, C., Caspers, N., Forbes, V., 2006. Effects of husbandry parameters on the life-history traits of the apple snail, *Marisa cornuarietis*: effects of temperature, photoperiod, and population density. Invertebrate Biology 125, 9–20.

Author's personal copy

Bannister, R., Beresford, N., May, D., Routledge, E.J., Jobling, S., Rand-Weaver, M., 2007. Novel estrogen receptor-related transcripts in *Marisa cornuarietis*; a freshwater snail with reported sensitivity to estrogenic chemicals. Environmental Science and Technology 41, 2643–2650.

Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E., 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. Helgolander Meeresuntersuchungen 50, 299–317.

Blaise, C., Gagne, F., Salazar, M., Salazar, S., Trottier, S., Hansen, P.D., 2003. Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent. Fresenius Environmental Bulletin 12, 865–870.

Breitholtz, M., Ruden, C., Hansson, S.O., Bengtsson, B.E., 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety 63, 324–335.

Brown, L., 1980. The use of *Hydrobia jenkinsi* to detect intermittent toxic discharges to a river. Water Research 14, 941–947.

Castro, L.F.C., Melo, C., Guillot, R., Mendes, I., Queiros, S., Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2007. The estrogen receptor of the gastropod *Nucella lapillus*: modulation following exposure to an estrogenic effluent? Aquatic Toxicology 84, 465–468.

Chambre Agriculture Rhone, C.A., 2008. Protection des Eaux en Beaujolais viticole. Caractérisation et Suivi de la Qualité de L'eau. Chambre départementale d'Agriculture, Rhone, 50 pp.

Clarke, N., Routledge, E.J., Garner, A., Casey, D., Benstead, R., Walker, D., Watermann, B., Gnass, K., Thomsen, A., Jobling, S., 2009. Exposure to treated sewage effluent disrupts reproduction and development in the seasonally breeding ramshorn snail (subclass: Pulmonata, *Planorbarius corneus*). Environmental Science and Technology 43, 2092–2098.

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes on *Gammarus fossarum*: an in situ experiment. Chemosphere 77, 1569–1575.

Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals – an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Ecotoxicology 16, 169–182.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aquatic Toxicology 64, 437–449.

Gagne, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P., Salazar, M., 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. Environmental Toxicology 17, 149–159.

Gagné, F., Blaise, C., Hellou, J., 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 138, 33–44.

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., André, C., 2007. Neuroendocrine disruption in *Mya arenaria* clams during gametogenesis at sites under pollution stress. Marine Environmental Research 64, 87–107.

Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S., Hansen, P.D., 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 128, 213–225.

Gooding, M.P., LeBlanc, G.A., 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. General and Comparative Endocrinology 122, 172–180.

Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J., 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. Environmental Pollution 157, 423–429.

Gust, M., Garric, J., Giamberini, L., Mons, R., Abbaci, K., Garnier, F., Buronfosse, T., 2010a. Sensitivity of gastropod *Potamopyrgus antipodarum* to a specific aromatase inhibitor. Chemosphere 79, 47–53.

Gust, M., Vulliet, E., Giroud, B., Garnier, F., Couturier, S., Garric, J., Buronfosse, T., 2010b. Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like sex-steroids in prosobranch molluscs. Journal of Chromatography B. doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.046.

Jacquet, R., Miege, C., Soulier, C., Budzinski, H., Coquery, M., 2008. Comparison of POCIS and SPMD for In Situ Sampling of Moderately Hydrophobic Molecules. European Meeting on Environmental Chemistry, Girona.

Janer, G., Lyssimachou, A., Bachmann, J., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Porte, C., 2006. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in the gastropod *Marisa cornuarietis*: the effect of xenoandrogenic compounds. Steroids 71, 435–444.

Janer, G., Porte, C., 2007. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. Ecotoxicology 16, 145–160.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology 65, 205–220.

Keay, J., Bridgham, J.T., Thornton, J.W., 2006. The *Octopus vulgaris* estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. Endocrinology 147, 3861–3869.

Kolodziej, E.P., Gray, J.L., Sedlak, D.L., 2003. Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2622–2629.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buston, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. Environmental Science and Technology 36, 1202–1211.

Lafont, R., Mathieu, M., 2007. Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology 16, 109–130.

Labadie, P., Peck, M., Minier, C., Hill, E.M., 2007. Identification of the steroid fatty acid ester conjugates formed in vivo in *Mytilus edulis* as a result of exposure to estrogens. Steroids 72, 41–49.

Lassen, H.H., Kristensen, J.H., 1978. Tolerance to abiotic factors in mudsnails (Hydrobiidae). Natura Jutlandica 20, 243–250.

Lydeard, C., Cowie, R.H., Ponder, W.F., Bogan, A.E., Bouchet, P., Clark, S.A., Cummings, K.S., Frest, T.J., Gargominy, O., Herbert, D.G., Hershler, R., Perez, K.E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E.E., Thompson, F.G., 2004. The global decline of nonmarine mollusks. Bioscience 54, 321–330.

Matthiessen, P., 2008. An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. Integrated Environmental Assessment and Management 4 ISSN 1551–3777(print)|1551–3793(electronic).

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oetken, M., Bachmann, J., Lutz, I., Kloas, W., Ternes, T.A., 2006. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gasteropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant

Author's personal copy

concentrations. Environmental Health Perspectives 114, 127–133.
Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Aquatic Toxicology 66, 279–292.
Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. Environmental Health Perspectives 114, 63–69.
Selck, H., Aufderheide, J., Pounds, N., Staples, C., Caspers, N., Forbes, V., 2006. Effects of food type, feeding frequency, and temperature on juvenile survival and growth of *Marisa cornuarietis* (Mollusca: Gastropoda). Invertebrate Biology 125, 106–116.
Sternberg, R.M., Hotchkiss, A.K., LeBlanc, G.A., 2008. The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. General and Comparative Endocrinology 156, 15–26.
Trösken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Völkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W. K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. Endocrine Research 30, 387–394.
Watton, A.J., Hawkes, H.A., 1984. Studies on the effects of sewage effluent on gastropod populations in experimental streams. Water Research 18, 1235–1247.
Winterbourn, M., 1970. The New Zealand species of *Potamopyrgus* (Gasteropoda: Hydrobiidae). Malacologia 10, 283–321.

B / EXPOSITION A UNE CONTAMINATION METALLIQUE

Après avoir développé notre méthode d'encagement avec *P. antipodarum*, nous avons voulu l'appliquer à un type de pollution très différent, pour évaluer la capacité des marqueurs à orienter sur les mécanismes de toxicité impliqués. Nous avons donc choisi un site connu pour sa pollution forte en métaux lourds (principalement Cd et Zn). Les effets sur la reproduction au niveau de l'individu et sub-individu ont été évalués.

Publication n°10:

Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)

M. Gust, T. Buronfosse, O. Geffard, M. Coquery, R. Mons, K. Abbaci, L. Giamberini, J. Garric

L'estuaire de la gironde présente une pollution importante et connue en métaux lourds (principalement **Cd** et **Zn**), provenant d'un affluent du Lot. Cet affluent (Riou-Mort) draine une ancienne fonderie, qui contamine depuis de très nombreuses années le bassin versant. Nous avons effectué une exposition sur 5 sites, le long de ce gradient de pollution. Des adultes et juvéniles *P. antipodarum* ont été exposés pendant 4 semaines.

Une forte **accumulation** de Cd et Zn a été mesurée dans les organismes pendant l'exposition, correspondant au gradient de pollution du milieu. La survie des adultes et des juvéniles a été excellente, confirmant la validité de la méthodologie d'encagement. Les effets observés sur les différents marqueurs individuels (survie, croissance, reproduction) et sub-individuels (histologie de la glande digestive et des gonades, statut énergétique et titres de stéroïdes) étaient globalement **dose-dépendants**.

Les lésions histologiques ont été les plus sensibles à la pollution métallique. La **reproduction** a été très fortement impactée dans le site le plus contaminé. Ceci peut s'expliquer par les importantes **lésions digestives** observées, qui ont certainement induit la **diminution** des **réserves énergétiques**, et de la **croissance**. Ces lésions étaient caractéristiques d'une toxicité métallique (hypertrophie et multiplication des cellules à calcium et vacuolisation des cellules digestives). Cependant, l'importance des effets sur ce site ne peut pas être exclusivement attribuée à ces effets tissulaires, mais également à **d'autres mécanismes d'action** du Cd ou l'existence de facteurs confondants. L'accumulation de stéroïdes dans les organismes semble être un **marqueur de pollution organique** du milieu.

Mots-clefs : *P. antipodarum*, reproduction, encagement, Cd, Zn, histologie, réserves énergétiques, stéroïdes.

Aquatic Toxicology, 2011, 101, 100-108

Author's personal copy

Aquatic Toxicology 101 (2011) 100–108

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)

M. Gust[a,b], T. Buronfosse[c], O. Geffard[a], M. Coquery[d], R. Mons[a], K. Abbaci[a], L. Giamberini[e], J. Garric[a,*]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau, 69009 Lyon, France
[b] AgroParisTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris, France
[c] Université de Lyon, Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France
[d] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'analyses physico-chimiques des milieux aquatiques, 3b quai Chauveau, 69009 Lyon, France
[e] Laboratoire des interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, campus Bridoux, 57000 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 March 2010
Received in revised form
10 September 2010
Accepted 14 September 2010

Keywords:
Potamopyrgus antipodarum
Field study
Caging experiment
Cd
Zn

ABSTRACT

The Lot River is known to be contaminated by metals, mainly cadmium and zinc, due to a former Zn ore treatment plant in the watershed of the Riou-Mort, a tributary of the Lot River. Many studies have been performed to characterize contamination, but few have assessed its consequences on the biological responses of organisms along the gradient. We exposed adult and juvenile New Zealand freshwater mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* at several sites along the gradient of metal contamination for 28 days. Biological responses were monitored at different levels: individual (survival, growth and fecundity), tissue and biochemical (energy status and vertebrate-like sex steroid levels) to better understand the toxicity mechanisms involved. Accumulation of Cd and Zn was high during exposure. Most of the biological effects observed could be linked to this contamination and were concentration-dependent. Histological lesions of the digestive gland were observed, with hypertrophy of calcium cells and vacuolization of digestive cells. Such effects are likely to explain the decrease of energy status (triglycerides and proteins), juvenile growth and adult fecundity observed at the most polluted site. However the magnitude of the fall in fecundity cannot be attributed only to these tissular effects, indicating another mode of action of Cd or possible confounding factors. Steroid accumulation in snails indicated only organic pollution. Histopathological effects proved the most sensitive endpoint to metal (Cd and Zn) contamination.
© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Lot River and Gironde estuaries are known to be contaminated by metals, mainly cadmium and zinc. The main source of contamination is located in the former Zn ore treatment plant at Decazeville, in the watershed of the Riou-Mort, a tributary of the Lot River. Zn and Cd concentrations in water and suspended particulate matter are high (Coynel et al., 2007) and reach 30 μg Cd/L and 1500 μg Zn/L at the most contaminated site (Morin et al., 2008), i.e. a hundred times the European Environmental Quality Standard (EQS) for bodies of surface water for Cd (European Union, 2008).

As remedial action has just begun to decrease this waterborne metal concentration, studies have been performed to assess the current impact of this contamination on the polluted hydrosystems. Such impact assessments on freshwater ecosystem quality are usually based on chemical data and compliance with EQS, and on biological indicators such as biotic index macroinvertebrates. Experimental approaches designed to give specific insights into chemical stressors likely to cause biological disturbances and monitor the effect of specific remedial actions are seldom used. However, *in situ* approach based on the translocation of organisms to investigate selected sites is well suited to this task, providing a time-integrated assessment of environmental quality and reflecting exposure over several weeks (Regoli et al., 2006). Thus our study aims at assessing the responses of adult and juvenile mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* exposed to such a metallic pollution gradient in a complex field situation.

We selected the New Zealand mudsnail *P. antipodarum* (Gray) because it is a sensitive test organism already used in laboratory testing, and experimental stream and field studies (Brown, 1980; Duft et al., 2003; Jobling et al., 2003; Gust et al., 2010a). It is not sensitive to abiotic factor variations (Lassen and Kristensen,

* Corresponding author. Present address: Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 09, France. Tel.: +33 472208905; fax: +33 478477875.
E-mail addresses: marion.gust@cemagref.fr (M. Gust), thierry.buronfosse@inserm.fr (T. Buronfosse), olivier.geffard@cemagref.fr (O. Geffard), marina.coquery@cemagref.fr (M. Coquery), raphael.mons@cemagref.fr (R. Mons), khedidja.abbaci@cemagref.fr (K. Abbaci), giamb@sciences.univ-metz.fr (L. Giamberini), jeanne.garric@cemagref.fr (J. Garric).

0166-445X/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.007

Author's personal copy

1978) and its reproduction and steroid levels seemed unaffected by the high range of conductivities and flows measured in the other *in situ* exposures performed previously (Gust et al., 2010a). It allows measuring effect data at sub–individual and individual levels simultaneously, in particular effects on growth and reproduction. It is an invasive parthenogenetic ovoviviparous freshwater mudsnail now common in European countries that thrives in running waters from small creeks to streams, lakes and estuaries, in mud and sand, and on rocks, gravel and aquatic plants (Fretter and Graham, 1994).

The toxic effects of Cd on freshwater invertebrates have been largely documented. Among the phyla represented, gastropods have been studied, though attention has mainly been given to terrestrial and pulmonate species (Laskowski and Hopkin, 1996; Gomot, 1998; Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000; Coeurdassier et al., 2003, 2004; Notten et al., 2006; Gimbert et al., 2008; Ansaldo et al., 2009). In these taxa, Cd impaired energy status, decreased fecundity, embryonic survival and growth, and increased time to hatching. Cd can also affect the digestive gland of mollusks (Najle et al., 2000). Some studies were also performed on *P. antipodarum*: effects on size at birth, time to first reproduction, growth rate, reproductive output and reduced feeding rates at concentrations above 1 μg/L have been described (Jensen et al., 2001).

Consequently, several endpoints were measured in order to build a response profile of snails to water quality and provide evidence of the toxicity of metal contamination.

The specific purposes of this study were to assess (i) the bioaccumulation and the effects of a metal gradient in a complex field situation on the life traits of the mudsnail (survival, juvenile growth, fecundity), the histopathology of the gonads and digestive gland, energetic status and vertebrate-like sex-steroids levels and (ii) the different sensitivities of the measured endpoints of this gradient.

2. Materials and methods

Adult *P. antipodarum* were collected from a known natural population in St Savin (France) one month before the experiments started. As juveniles of same size could not been sampled in sufficient number at this period of the year, they were obtained from long term cultures established in our laboratory (Cemagref, Lyon, France).

2.1. Study site

The Decazeville area is known for its polymetallic pollution due to former open-cast coal mining and Zn ore treatment and is drained by a tributary of the Lot River (Riou-Mort). Since 1971 remediation works have been carried out on waste deposits, by collecting and treating the water leaching through the mineral ore, and by confining part of the waste deposits in storage basins with underlying and overlying mud. Nevertheless, large quantities of these waste deposits are still exposed to rainwater and thus leached and eroded (Audry et al., 2004; Morin et al., 2008). Five sites were selected for our study (Fig. 1): (1) Moulin on the Riou-Viou River, upstream of the smelting plant but still slightly contaminated by Cd, (2) Decazeville and (3) Joanis, respectively, upstream and downstream of the plant on the Riou-Mort River, and (4) Lot upstream and (5) downstream of the Riou-Mort River confluence. The Joanis site is that most contaminated by Cd and Zn (respectively, around 30 and 1500 μg/L in Morin et al., 2008), and also by organic and domestic pollutants (Lemaire et al., 2006), while both the Lot Upstream and Decazeville sites were considered as reference sites, with relatively low metal concentrations (Andres et al., 1999; Morin et al., 2008). Intermediate metal contamination was measured at the Lot downstream and Moulin sites, the latter being the more contaminated of the two (Grousset et al., 1999). According to the European Directive 2008/105/CE (European Union, 2008) on EQS for bodies of surface water, Decazeville and Lot upstream are listed as class 1 sites (best chemical status), Lot downstream as class 4, and Moulin and Joanis as class 5 (worst chemical status).

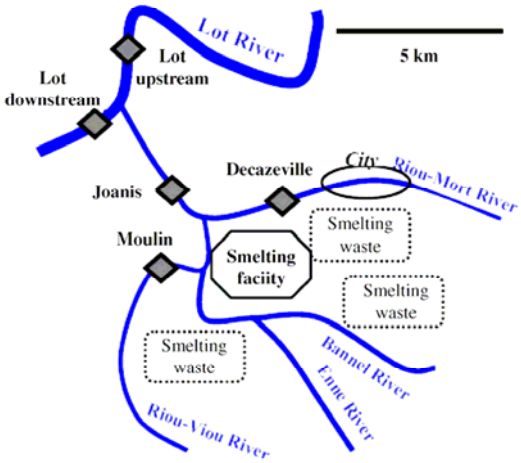


Fig. 1. Site localization. Diamonds represent the five sites.

2.2. In situ exposure of snails

Adult and juvenile snails were placed in rigid plastic containers with both extremities replaced by mesh (500 μm). Each cage, specifically designed for exposure in rivers, contained 5 replicates, with 25–80 adults and 25 juveniles. The remaining space in the cages was loaded with rocks to ballast them. In addition, rocks covered with biofilm collected from a reference site (Morcille, Rhone, France) were introduced in the containers to provide food. Temperature monitor probes were fixed to one cage at each site. Conductivity was measured weekly simultaneously with the biological measurements. The daily flows of the Lot and Riou-Mort were provided by water body authorities (http://www.hydro.eaufrance.fr/). The size of the adults (4.4 ± 0.4 mm) and juveniles (2.1 ± 0.2 mm) were measured one day before being placed in the exposure chambers. The exposures lasted 28 days, from 19 May to 17 June 2009.

2.3. Biological measurements

Mortalities of adults and juveniles were counted every week directly in the field. Fecundity was assessed on days 0, 21 and 28 on 30 adults taken randomly in the replicates from each site and preserved in the river water until the measurements were performed. The embryos in the brood pouch were counted at the laboratory using a technique adapted from Duft et al. (2003). Shells were measured for length and then cracked using a vice. The shell parts were removed in order to observe the embryos through the epithelia. After carefully opening the brood pouch, the number of shelled embryos and unshelled new embryos was counted under a binocular microscope. On day 28 the size of the juveniles was measured under a binocular microscope.

Author's personal copy

Table 1
Metal concentrations in sites and whole *P. antipodarum* (µg/g *dw*) and survival, size of juveniles and energy reserve levels in *P. antipodarum* (a < b < c < d; $P < 0.005$, Mann–Whitney *U*-tests or LSD test).

	Lot upstream	Lot downstream	Decazeville	Moulin	Joanis
Cd					
In water (µg/L) (dissolved Cd)	nd[1]	0.8 µg/L[1]	"Cd-Free[3]"		26 µg/L[1]; 30 µg/L[3]
In suspended particulate matter (µg/g)		16 mg/kg[2]		40 mg/kg[2]	
Zn					
In water (µg/L) (dissolved Zn)	nd[1]	50 µg/L[1]	"Zn-Free[3]"		900 µg/L[1]; 1500 µg/L[3]
In suspended particulate matter (µg/g)		600 mg/kg[2]		1600 mg/kg[2]	
Cd (µg/g *dw*)					
Day 0	0.32 (0.03)				
Day 7	0.52 (0.07)^{a}	1.16 (0.08)^{b}	0.59 (0.04)^{a}	1.82 (0.01)^{c}	2.62 (0.42)^{d}
Day 14	0.62 (0.02)^{a}	2.80 (0.12)^{b}	0.63 (0.06)^{a}	3.61 (0.42)^{c}	7.47 (0.63)^{d}
Zn (µg/g *dw*)					
Day 0	14.3 (4.1)				
Day 7	37.3 (4.6)^{a}	41.9 (4.2)^{a}	37.2 (3.7)^{a}	46.3 (2.3)^{b}	95.1 (7.5)^{c}
Day 14	14.6 (1.3)^{a}	34.1 (2.6)^{c}	22.0 (2.2)^{b}	41.9 (5.6)^{c}	201.5 (14.3)^{d}
Survival on day 28					
Adult	99%	95%	95%	96%	95%
Juveniles	98%	98%	93%	96%	99%
Size (mm) of the juveniles after 28 days	2.49 (0.31)^{a}	2.47 (0.31)^{a}	3.20 (0.50)^{b}	2.52 (0.34)^{ab}	2.44 (0.27)^{a}
Triglycerides (nmol/ind) on day 14	62.31 (15.47)^{b}	74.10 (11.78)^{b}	56.07 (16.11)^{b}	58.27 (18.09)^{b}	36.19 (8.84)^{a}
Proteins (µg/ind) on day 14	156 (32)^{ab}	172 (32)^{b}	174 (26)^{b}	152 (25)^{ab}	123 (24)^{a}

nd: not detected.
[1] Andres et al. (1999).
[2] Grousset et al. (1999).
[3] Morin et al. (2008).

2.4. Chemical analysis

2.4.1. Metal bioaccumulation

Strict protocols for cleaning laboratory equipment and for sample handling were applied to avoid any risk of contamination. On days 0, 7 and 14 three pools of 10 adults were collected per site and the bioaccumulation of metals was assessed. After sampling, the samples were transported in the river water to the laboratory and then transferred to polyethylene bottles for metal analyses. They were kept frozen at −80 °C, then freeze dried before analysis. Results are expressed on a dry weight basis.

Ten metals (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd and Pb) were analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Thermo X7 series II). Samples were first mineralized with nitric acid in a microwave oven. Individuals of *P. antipodarum* were pooled (10 organisms per sample) to obtain an average mass of 0.09 g dry weight. Blank tests were carried out systematically to detect any possible contamination along the analytical chain. Certified reference materials (CRM, TORT-2, lobster hepatopancreas; IAEA-407, fish) were used for quality control. The limits of quantification were about 0.02–0.03 µg/g for Cd, Co and Pb; 0.08 µg/g for Cr, Ni, Cu, As; 0.17 µg/g for Se; 0.33 µg/g for Ag and Zn. Typically reference values deviated maximally 5–20% from the measured value depending on the element and the CRM results were generally well within certified values.

2.4.2. Energy reserves

On day 14, protein (P) and triglyceride (TG) levels were measured on 10 pools of two dissected and embryo-emptied *P. antipodarum* taken randomly from the containers and preserved in river water until being frozen at −20 °C. The snails were homogenized in 200 µL PBS 1× and energetic status was measured directly by using a Konelab® (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise). This device is a robot commonly used for the clinical analysis of biochemical parameters. Measurements were based on colorimetric methods (Burtis and Ashwood, 2001). Briefly, TG were hydrolysed by lipase and glycerol measured at 510 nm. The bond between proteins and red pyrogallol–molybdate complexes was measured at 600 nm. The repeatability and linearity of the reactions were assayed for each parameter. Intra-assay variability was less than 5%.

2.4.3. Steroid measurements

The levels of total testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) using a radioimmunoassay (RIA) technique were measured on days 0 and 28 on 10 pools of two *P. antipodarum* taken randomly from the containers and preserved in river water until being frozen. We used the same technique as that described previously (Gust et al., 2010c). Briefly, the snails were homogenized in 1% (v/v) trifluoro acetic acid and extracted twice with methylene chloride. After saponification, steroids were extracted twice with methylene chloride and resuspended in 80 µL 1% steroid-free bovine serum albumin (BSA). The samples were assayed using commercial RIA kits for E2 (Orion Diagnostic, Espoo, Finland) and T (Diagnostic Systems Laboratories, Texas, USA).

2.5. Histology of gonads and digestive gland

At the end of the 28-day exposure period, three adults per site were taken randomly for histological analysis. Samples were preserved for 48 h in Bouin liquid, then washed and desiccated using baths of ethanol with growing concentrations (starting with 70%). Afterwards, the snails were embedded in paraffin. Serial cross sections of 5 µm were cut and colored with hematoxylin–eosin.

2.6. Statistical analysis

Normality distribution and homogeneity of variance of the data were tested. Depending on the data, either one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskall–Wallis tests were performed, followed, if necessary, by a either a Mann–Whitney *U*-test or LSD test for post hoc comparisons of groups, with Bonferroni adjustments. All the statistical tests were performed using Statistica® 7.1 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) at α equal to the 5% global level of significance.

Author's personal copy

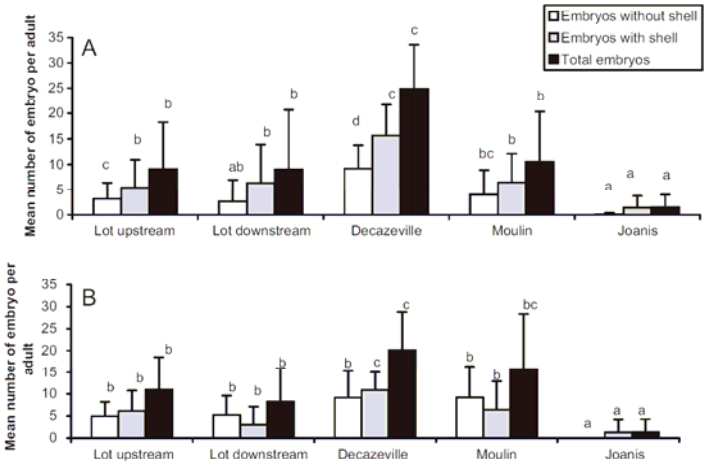


Fig. 2. Number of embryos in the brood pouch of *P. antipodarum* (mean value and standard deviation) as a function of exposure sites (a < b < c < d; $P < 0.005$, Mann–Whitney *U*-tests). $N = 30$ snails. (A) Embryos in the brood pouch per adult *P. antipodarum* on day 21. (B) Embryos in the brood pouch per adult *P. antipodarum* on day 28.

3. Results

During our exposure period, the mean flow of the Riou-Mort River was 0.88 m^3/s and that of the Lot River at Cahors 81 m^3/s. The median temperature was highest at the Decazeville site (18.0 °C), lowest at the Moulin site (15.5 °C) and intermediate at the Joanis, and Lot upstream and downstream sites (respectively, 17.4 °C, 15.8 °C and 16.4 °C). The range of conductivity measured was wide: 132 and 207 µS/cm at the Lot upstream and downstream sites, 199 µS/cm at Moulin, 1056 µS/cm at Joanis and 1125 µS/cm at Decazeville. The variations of these factors are presented in supplementary data.

3.1. Biological measurements

Adult and juvenile mortalities were not significantly different between sites and ranged from 1% to 7% after 28 days of exposure (Table 1).

The reproduction of the snails was within the range of those observed in other caging experiments (Gust et al., 2010a) and in a natural population (unpublished results). Growth was observed at all sites after 28 days. At the Decazeville site, growth after 28 days was significantly ($P < 0.005$) higher than at all the other sites except Moulin (Table 1).

Effects of exposure site were detected on reproduction (Fig. 2A and B). Shelled, unshelled and total number of embryos were significantly decreased ($P < 0.005$) at the Joanis site compared to all the other sites on days 21 and 28. The total number of embryos was significantly higher ($P < 0.005$) at the Decazeville site compared to all the other sites on days 21 and 28 (except Moulin on day 28). No significant ($P < 0.005$) differences in the total number of embryos at the three remaining sites were noted.

3.2. Chemical analysis

3.2.1. Metal bioaccumulation

Results of Cd and Zn bioaccumulation are presented in Table 1. Significant ($P < 0.005$) effects of exposure site and time were observed. Variations in Cd and Zn levels were the most significant. After 7 and 14 days of exposure, concentrations of Cd and Zn were significantly higher than on day 0 ($p < 0.005$) at all sites, except for Zn on day 14 at Lot upstream. At all three contaminated sites, bioaccumulation after 14 days did not reach any plateau. Joanis was the most contaminated site, with Cd and Zn concentrations that reached 7.5 and 201.5 µg/g *dw*, 24 and 14-fold higher than day 0, respectively. Snails exposed in Moulin also showed notable bioaccumulation after 14 days: 3.6 µg Cd/g *dw* and 41.9 µg Zn/g *dw*, respectively, 12- and 3-fold higher than day 0. Lot downstream appeared to be the least contaminated area, with bioaccumulation on day 14 only 9- and 2-fold higher than day 0 for Cd and Zn (2.8 µg Cd/g *dw* and 34.1 µg Zn/g *dw*).

The levels of Cr, Cu, As, Se, Ag and Pb did not depend on the Cd contamination gradient. Levels of Co and Ni were higher ($P < 0.005$) in Decazeville and Joanis than at the other sites (data not shown), indicating that the "reference" site of Decazeville was impacted by other pollutants, probably linked to urban activity.

3.2.2. Energy reserves

TG levels were significantly ($P < 0.005$) decreased in Joanis compared to other sites on day 14, as were P levels, compared to Decazeville and Lot downstream (Table 1).

3.2.3. Steroid levels

E2 levels were significantly ($P < 0.005$) increased on day 28 at the Decazeville, Moulin and Joanis sites compared to both Lot sites and day 0. T levels on day 28 were significantly ($P < 0.005$) increased compared to day 0 at all the other sites. At the Decazeville and Joanis sites, T levels were significantly ($P < 0.005$) higher than at the other sites on day 28 (Fig. 3).

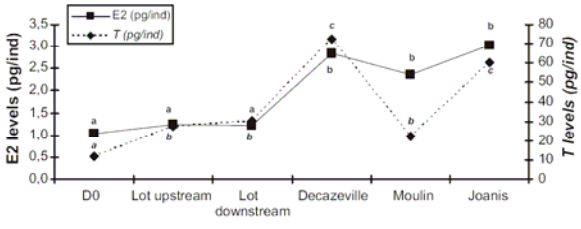


Fig. 3. Testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) levels in snails on days 0 and 28 (a < b < c; $P < 0.005$, Mann–Whitney *U*-tests). $N = 10$ pools of two snails.

Author's personal copy

3.3. Histopathology

The main effects of metallic contamination were observed on the digestive gland. In *P. antipodarum* from both upstream sites, the digestive gland consisted in branched blind-ending tubules (Fig. 4A1 and C1). Three cell types were identified in these tubules: digestive cells, calcium cells and basophilic cells (Fig. 4A2 and C2). Digestive cells were the cells most frequently observed, with a columnar shape, nuclei in the basal region, granules in the apical part and microvilli. There were lower numbers of basophilic cells and calcium cells. The basophilic cells were pyramidal and contained vacuoles while the calcium cells were located at the base of the epithelium and filled with spherical calcium granules. At the Lot downstream site, this structure was still present (Fig. 4B1 and B2). In snails exposed at Moulin, hypertrophy of the calcium cell was observed, and the number of these cells was higher (Fig. 4D3). Slight vacuolization of the digestive cells was also detected (Fig. 4D3) while the digestive tubules were at different stages of maturation (Fig. 4D1 and D2); the latter observations were more obvious for snails exposed at Joanis. A loss of digestive gland structure was noted (Fig. 4E1), with vacuolization of the digestive cells, but without apical loss. Calcium cells were present in greater numbers than at the upstream sites, and hypertrophied (Fig. 4E2). We also observed diapedesis of hemocytes (Fig. 4E3) and the presence of several maturation stages of the digestive tubules (data not shown).

4. Discussion

As the Lot and both Riou Rivers are very different ecological systems, comparison of the physiological endpoints can only be performed between Lot upstream and downstream on the one hand, and Decazeville, and Joanis (Riou-Mort) on the other hand. This is confirmed by the different life-trait response patterns observed at both upstream sites (Lot upstream and Decazeville). Moulin is located on a different stream (Riou-Viou) in an ecological system similar to that of the Riou-Mort, but with lower conductivity and intermediate Cd and Zn contamination. Conductivity is unlikely to affect the endpoints observed, since it does not appear to act as a confounding factor, as previously observed (Gust et al., 2010a). However, it is possible that the difference in river conditions (flow, etc.) could influence the conditions inside the cages and that this possibility could have influenced the results. The range of temperature variations between the exposure sites is unlikely to directly affect the reproduction endpoints, as shown by laboratory studies (unpublished results). Nevertheless, environmental conditions such as temperature can affect the toxicity of Cd on *P. antipodarum* (Moller et al., 1994).

Whatever the site, mortalities were low for both juveniles and adults, indicating the good suitability of our exposure methodology and tolerance to metals, as in the case of other snail species (Laskowski and Hopkin, 1996; Coeurdassier et al., 2003). No effect of Cd on *P. antipodarum*'s mortality has been described in laboratory studies (Jensen et al., 2001), which also appears to be confirmed under field conditions. However, Cd concentrations in these laboratory studies were lower (around 1 μg/L) than those observed at the most polluted site in the present study.

4.1. Effect of the metal gradient on Zn and Cd bioaccumulation

As in other mollusks, bioaccumulation of Cd was proportional to water concentrations, whereas that of Zn was not (Andres et al., 1999; Coeurdassier et al., 2003). The bioaccumulation observed at the contaminated sites agrees with previously published results for *Corbicula fluminae* after 20 days exposure at the Lot upstream, downstream and Joanis sites (Andres et al., 1999). Cd bioaccumulation in *P. antipodarum* was proportionally more significant than Zn bioaccumulation, although Zn has an antagonistic effect on Cd bioaccumulation in gastropods (Daka and Hawkins, 2006). Interestingly, we observed average concentration of Zn at day 0 far greater than Cd concentrations (45-fold higher), which is also the case for *C. fluminae*, and this must have serious consequences on bioaccumulation mechanisms. The higher values of Zn concentrations on day 7 compared to day 14 at all sites except Joanis could be linked to Zn regulation, as observed in other mollusk species (Andres et al., 1999). Zn levels at the Joanis site seem to exceed the regulation capacity of *P. antipodarum*. Regarding exposure with *C. fluminae*, Cd concentrations reached a plateau at both the Joanis and Lot downstream sites after several weeks of exposure (Andres et al., 1999). As our exposure was far shorter, it is very likely that this phase could not be reached.

4.2. Biological responses to the metal gradient

No effects on the measured endpoints were detected between Lot upstream and downstream, even with a Cd concentration 4-fold higher in the downstream snails. On the contrary, in previous exposures performed with a bivalve species (*C. fluminae*) at the same two sites, growth decreased slightly after 21 days exposure at the downstream Lot site compared to the upstream site, with comparable metal bioaccumulation (Andres et al., 1999).

In the Riou-Mort and Riou-Viou rivers, reproduction output, juvenile growth and energy reserves were significantly lower at the Joanis site compared to Decazeville and Moulin. In Moulin, reproduction and growth were also lower than at Decazeville. These effects appear to be concentration-dependent as they follow the metal gradient. The measured effects were detected at water Cd and Zn concentrations lower than the toxic concentrations observed in *P. antipodarum* and other gastropods in laboratory studies. Indeed, growth inhibition of *P. antipodarum* exposed to 25 μg Cd/L (Dorgelo et al., 1995) and 200 μg Cd/L (Forbes et al., 1995; Moller et al., 1996) has been described. Dorgelo et al. (1995) also described growth inhibition in the mudsnail at 100 μg Zn/L, indicating that *P. antipodarum* is more sensitive to Cd than Zn. This is consistent with the effects observed in our field study. The effects observed were in accordance with Cd toxicity under laboratory conditions for terrestrial (Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000; Gimbert et al., 2008) and freshwater pulmonate snails (Gomot, 1998; Coeurdassier et al., 2003, 2004; Ansaldo et al., 2006, 2009). Finally, *P. antipodarum* is a parthenogenetic species, consequently the importance of clones should not be neglected. Different clones of *P. antipodarum* displayed high variability in their sensitivity to Cd toxicity (Jensen et al., 2001), the most sensitive clones showing growth inhibition or decreased fecundity for concentrations around 1 μg/L. This matches the concentrations at Moulin, indicating comparable sensitivity for our clone.

The effects were far greater at the Joanis site, where bioaccumulation of both Cd and Zn reached high levels, possibly signifying a combined effect of both metals though other factors could be incriminated. These effects could be explained by additional organic pollution at this site described by certain authors (Lemaire et al., 2006) or by the temperature of exposure. Indeed, Cd toxicity in *P. antipodarum* augments with increasing exposure temperature in laboratory exposures (Moller et al., 1994). The Joanis site had the highest temperature of the Cd-contaminated sites. As the snails exposed at Joanis showed the most marked responses, this could indicate possible increase of Cd toxicity at this site.

4.3. Histological responses

The three cell types observed in the digestive gland of *P. antipodarum* are consistent with what has been described in

G Model
AQTOX 2879 1–9
ARTICLE IN PRESS

some gastropods (Dimitriadis and Hondros, 1992), even if they do not occur in all taxa (Marigomez et al., 1990; Rebecchi et al., 1996).

Histological lesions were observed in the digestive gland, which is the preferential site of metal bioaccumulation in gastropods (Marigomez et al., 2002). Disorganization of digestive gland tissue has also been described in transplanted mussels in copper contaminated sites (Zorita et al., 2006). Interestingly, lesions were observed at the Moulin site, although reproduction, growth and energy status were not significantly impaired, indicating that histological observations provided early and sensitive indicators of environmental impact (Najle et al., 2000). The lesions observed at the Moulin site and in particular that of Joanis are known effects of metal toxicity.

In prosobranch mollusks, Cd has an adverse effect on the digestive gland epithelium, with loss of the entire structure of the digestive gland, characterized by lesions localized in digestive and basophilic cells and hemocyte diapedesis across the digestive gland epithelium (Marigomez et al., 1990; Najle et al., 2000). At Joanis, we observed hemocyte diapedesis and lesions in two cell types: digestive cells (vacuolization without loss of the apical cytoplasm) and, at both Moulin and Joanis site, calcium cells (proliferation and hypertrophy). The lesions of these two cell types are certainly linked to their role in regulation and possible detoxification of Zn and Cd (reviewed in Marigomez et al., 2002). Contrary to the literature, the structure of basophilic cells did not seem to be affected, despite an apparent increase in their relative number. This is consistent with epithelial cell type replacement of digestive cells by basophilic cells (Zaldibar et al., 2007). Another consequence of this process could be the different maturation stages of the digestive tubules present in the snails exposed at Moulin and Joanis.

4.4. Steroid level variations

Cd is considered to be a metalloestrogen which activates ERα through the ligand binding domain in vertebrates (Byrne et al., 2009) and can stimulate the biosynthesis of steroid hormones in *Asterias rubens* (Voogt et al., 1987). Although debate on the biological relevance of steroids is still in progress, many observations give credence to the physiological role of vertebrate-like sex steroids in mollusk reproduction, particularly *P. antipodarum* (Matthiessen, 2008; Gust et al., 2010b). However, no link could be made between E2 and T concentrations and metal site contamination in our study. Steroid hormone concentrations were higher at the three urban sites (Decazeville, Moulin and Joanis). This could indicate bioaccumulation of steroid compounds, as already described in this species

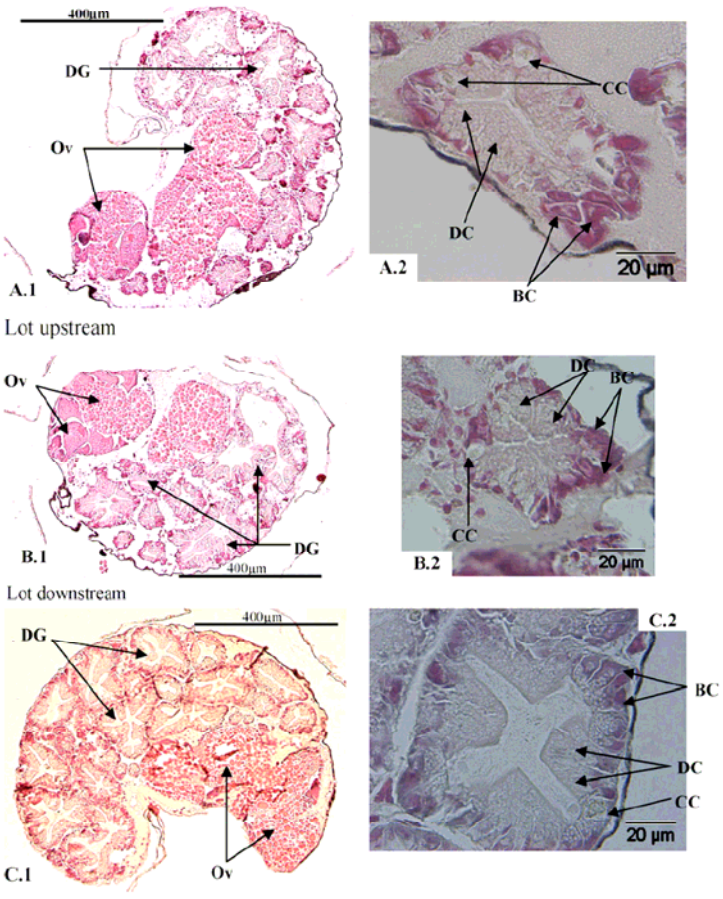


Fig. 4. Light microscopic view of typical cross section of *P. antipodarum* after 28 days exposure in different sites. (A) Lot upstream, (1) digestive gland and gonad, (2) digestive tubule; (B) Lot downstream, (1) digestive gland and gonad, (2) digestive tubule; (C) Decazeville, (1) digestive gland and gonad, (2) digestive tubule; (D) Moulin, (1 and 2) gonad and digestive gland at different developing stages, (3 and 4) digestive tubules; (E) Joanis, (1) digestive gland and gonad, (2) digestive tubule, (3) hemocyte diapedesis. BC: basophilic cell, CC: calcium cell, DC: digestive cell, DG: digestive gland, He: hemocytes, Ov: ovocytes, Tub: digestive tubule.

Please cite this article in press as: Gust, M., et al., Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). Aquat. Toxicol. (2010), doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.007

Author's personal copy

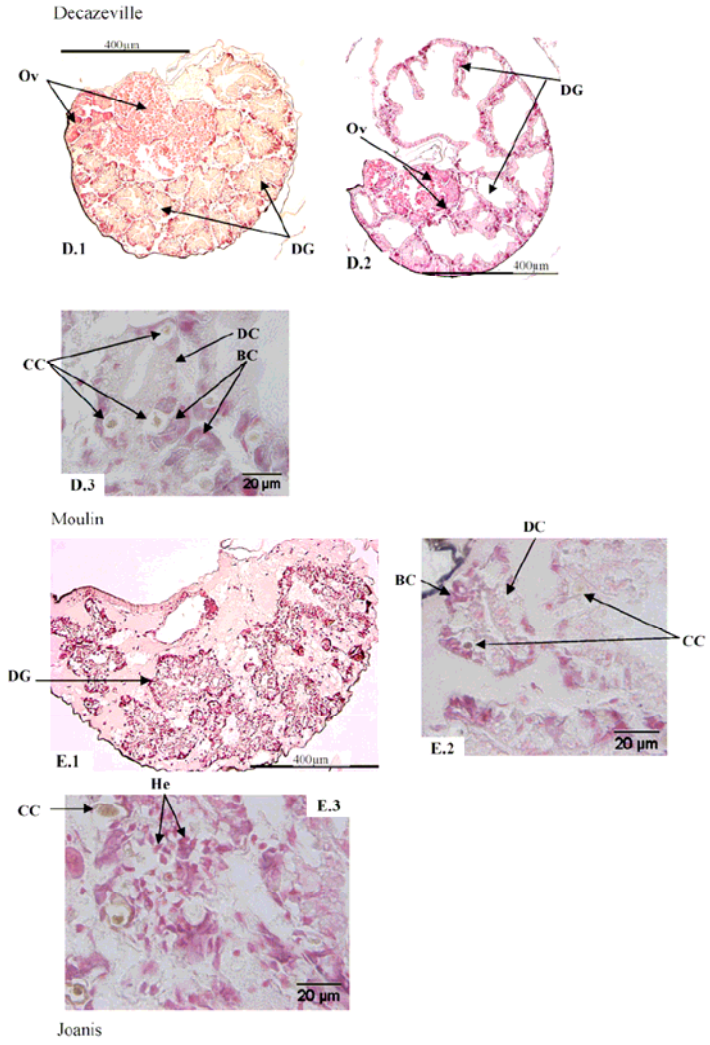


Fig. 4. (*Continued*)

(Zaldibar et al., 2007). Another consequence of this process could be the different maturation stages of the digestive tubules present in the snails exposed at Moulin and Joanis.

4.4. Steroid level variations

Cd is considered to be a metalloestrogen which activates ERα through the ligand binding domain in vertebrates (Byrne et al., 2009) and can stimulate the biosynthesis of steroid hormones in *Asterias rubens* (Voogt et al., 1987). Although debate on the biological relevance of steroids is still in progress, many observations give credence to the physiological role of vertebrate-like sex steroids in mollusk reproduction, particularly *P. antipodarum* (Matthiessen, 2008; Gust et al., 2010b). However, no link could be made between E2 and T concentrations and metal site contamination in our study. Steroid hormone concentrations were higher at the three urban sites (Decazeville, Moulin and Joanis). This could indicate bioaccumulation of steroid compounds, as already described in this species downstream from wastewater treatment plant effluent discharges (Gust et al., 2010a). However, the bioaccumulation observed in this study is low compared to what can be observed downstream of WWTP effluent discharges. Steroid levels in snails suggest organic contamination of these rivers.

4.5. Possible effect occurrence mechanisms

Digestive damage probably deteriorated the digestion and adsorption processes of food material (Najle et al., 2000), leading to decreased energy reserves, fecundity and growth. The effects on the digestive gland observed at the Joanis site are similar to those observed in terrestrial snails subject to prolonged starvation (Dimitriadis and Hondros, 1992; Porcel et al., 1996). It is, however, improbable that the observed decrease of reproduction at this site was strictly due to starvation; indeed juvenile growth was as high as at the other reference site (Lot upstream). Moreover, additional experiments (unpublished results) carried out in our laboratory,

Author's personal copy

showed that embryos were still present in the brood pouch of mudsnails after 14 days of starvation, with TG and P levels lower than at the Joanis site.

In *Hydrobia ulvae*, a species close to *P. antipodarum*, Cd caused a partial shift from aerobic to anaerobic metabolic pathways (Forbes and Depledge, 1992), which is probably an additional explanation of the decreased energy reserves observed at the Joanis site and Cd probably directly impaired reproduction there. The absence of unshelled embryos at Joanis could be a sign of early disruption of embryonic development due to Cd, as in freshwater pulmonate snails (Gomot, 1998; Coeurdassier et al., 2003). The fact that shelled embryos were still counted on days 21 and 28, points towards delayed hatching, as has been observed in other gastropod species (Gomot, 1998; Gimbert et al., 2008; Ansaldo et al., 2009), or a pause of embryo development just before hatching (Coeurdassier et al., 2003). Moreover, Cd has been thought to disrupt the neuroendocrine control of egg-laying (Gomot, 1998).

5. Conclusion

We assessed the effects of a field gradient of Cd and Zn contamination on several life traits and endpoints of *P. antipodarum*. Our exposure methodology allowed discrimination between the different sites, with significant effects at the two main polluted sites. Histological lesions of the digestive gland were the most sensitive endpoint, followed by decreases of fecundity, growth and energy reserve levels. No effects were observed at the Lot downstream site, indicating that the toxicity thresholds of Cd and Zn were not reached at this site. *P. antipodarum* is sensitive to metal toxicity compared to other gastropods and this study allowed proposing a range of internal concentrations of metals in mudsnails for which no effect could be observed. The use of the combined endpoints allowed highlighting specific effects of metal contamination in *P. antipodarum*, and underlining other possible stresses. The magnitude of the effects observed at the Joanis site is certainly due not only to the combined effects of high Cd and Zn contaminations, but also to other factors. The next step of this work will aim to assess the effect of the remediation process on water quality and responses in snails.

Acknowledgements

The present work was funded by ONEMA and ANR 08-CES-014 RESYST. The authors wish to thank the Endocrinology Laboratory of the National Veterinary School of Lyon for funding the RIA and biochemical analysis (Prof. F. Garnier). S. Couturier, L. Dherret, C. Dussard, C. Noel, C. Plantarose and E. Vray are gratefully acknowledged for their technical help, J. Mouthon for his help in collecting the snails and M. Ferréol for providing the biological indexes.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.007.

References

Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France). I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2462–2471.

Ansaldo, M., Nahabedian, D.E., Di Fonzo, C., Wider, E.A., 2009. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. Sci. Total Environ. 407, 1923–1928.

Ansaldo, M., Nahabedian, D.E., Holmes-Brown, E., Agote, M., Ansay, C.V., Guerrero, N.R.V., Wider, E.A., 2006. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. Toxicology 224, 119–127.

Audry, S., Schafer, J., Blanc, G., Jouanneau, J.M., 2004. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). Environ. Pollut. 132, 413–426.

Brown, L., 1980. The use of *Hydrobia jenkinsi* to detect intermittent toxic discharges to a river. Water Res. 14, 941–947.

Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 2001. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1091 pp.

Byrne, C., Divekar, S.D., Storchan, G.B., Parodi, D.A., Martin, M.B., 2009. Cadmium—a metallohormone? Toxicol. Appl. Pharmacol. 238, 266–271.

Coeurdassier, M., De Vaufleury, A., Badot, P.M., 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 102–109.

Coeurdassier, M., de Vaufleury, A., Scheifler, R., Morhain, E., Badot, P.M., 2004. Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72, 1083–1090.

Coynel, A., Schafer, J., Dabrin, A., Girardot, N., Blanc, G., 2007. Groundwater contributions to metal transport in a small river affected by mining and smelting waste. Water Res. 41, 3420–3428.

Daka, E.R., Hawkins, S.J., 2006. Interactive effects of copper, cadmium and lead on zinc accumulation in the gastropod mollusc *Littorina saxatilis*. Water Air Soil Pollut. 171, 19–28.

Dimitriadis, V.K., Hondros, D., 1992. Effect of starvation and hibernation on the fine-structural morphology of digestive gland-cells of the snail Helix-Lucorum. Malacologia 34, 63–73.

Dorgelo, J., Meester, H., vanVelzen, C., 1995. Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae). Hydrobiologia 316, 199–210.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aquat. Toxicol. 64, 437–449.

2008. Off. J. Eur. Union, 84–97.

Forbes, V.E., Depledge, M.H., 1992. Cadmium effects on the carbon and energy-balance of mudsnails. Mar. Biol. 113, 263–269.

Forbes, V.E., Moller, V., Depledge, M.H., 1995. Intrapopulation variability in sublethal response to heavy-metal stress in sexual and asexual gastropod populations. Funct. Ecol. 9, 477–484.

Fretter, V., Graham, A., 1994. British Prosobranch Molluscs. Their Functional Anatomy and Ecology. Ray Society, London.

Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Badot, P.M., 2008. Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 70, 138–146.

Gomot-de Vaufleury, A., Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64, 434–442.

Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. Ecotoxicol. Environ. Saf. 41, 288–297.

Grousset, F.E., Jouanneau, J.M., Castaing, P., Lavaux, G., Latouche, C., 1999. A 70 year record of contamination from industrial activity along the Garonne River and its tributaries (SW France). Estuar. Coast. Shelf Sci. 48, 401–414.

Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Mons, R., Queau, H., Mouthon, J., Garric, J., 2010a. *In situ* biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. Water Res. 44, 4517–4528.

Gust, M., Garric, J., Giamberini, L., Mons, R., Abbaci, K., Garnier, F., Buronfosse, T., 2010b. Sensitivity of gastropod *Potamopyrgus antipodarum* to a specific aromatase inhibitor. Chemosphere 79, 47–53.

Gust, M., Vulliet, E., Giroud, B., Garnier, F., Couturier, S., Garric, J., Buronfosse, T., 2010c. Development, validation and comparison of LC–MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrate-like sex-steroids in prosobranch molluscs. J. Chromatogr. B 878, 1487–1492.

Jensen, A., Forbes, V.E., Parker, E.D., 2001. Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*: linking toxicant effects on individuals to the population level. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2503–2513.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquat. Toxicol. 65, 205–220.

Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 34, 59–69.

Lassen, H.H., Kristensen, J.H., 1978. Tolerance to abiotic factors in mudsnails (*Hydrobiidae*). Natura Jutlandica 20, 243–250.

Lemaire, E., Blanc, G., Schafer, J., Coynel, A., Etcheber, H., 2006. Dissolved trace metal-organic complexes in the Lot-Garonne River system determined using the C18 Sep-Pak system. Aquat. Geochem. 12, 21–38.

Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microsc. Res. Tech. 56, 358–392.

Author's personal copy

Marigomez, I.A., Cajaraville, M.P., Angulo, E., 1990. Histopathology of the digestive gland-gonad complex of the marine prosobranch Littorina-Littorea exposed to cadmium. Dis. Aquat. Org. 9, 229–238.
Matthiessen, P., 2008. An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. Integr. Environ. Assess. Manag. 4, 1551–3777.
Moller, V., Forbes, V.E., Depledge, M.H., 1994. Influence of acclimation and exposure temperature on the acute toxicity of cadmium to the fresh-water snail Potamopyrgus-Antipodarum (Hydrobiidae). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1519–1524.
Moller, V., Forbes, V.E., Depledge, M.H., 1996. Population responses to acute and chronic cadmium exposure in sexual and asexual estuarine gastropods. Ecotoxicology 5, 313–326.
Morin, S., Duong, T.T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schafer, J., Winterton, P., Blanc, G., Coste, M., 2008. Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. Environ. Pollut. 151, 532–542.
Najle, R., Elissondo, M., Gentile, S., Gentile, M., Vacarezza, G., Solana, H., 2000. Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to cadmium. Sci. Total Environ. 247, 263–268.
Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2006. Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. Ecotoxicology 15, 295–304.
Porcel, D., Bueno, J.D., Almendros, A., 1996. Alterations in the digestive gland and shell of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata) after prolonged starvation. Comp. Biochem. Physiol. A 115, 11–17.
Rebecchi, B., Franchini, A., Fantin, A.M.B., 1996. The digestive gland of *Viviparus ater* (Mollusca, Gastropoda, Prosobranchia): an ultrastructural and histochemical study. Tissue Cell 28, 731–739.
Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. Environ. Health Perspect. 114, 63–69.
Voogt, P.A., Den Besten, P.J., Kursters, C.M., Messing, M.W.J., 1987. Effects of cadmium and zinc on steroid metabolism and steroid levels in the sea star *Asterias rubens* L. Comp. Biochem. Physiol. 86C, 83.
Zaldibar, B., Cancio, I., Marigomez, I., 2007. Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. Aquat. Toxicol. 81, 183–196.
Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquat. Toxicol. 78, S109–S116.

C / EXPOSITION A DES EFFLUENTS DE STATION D'EPURATION

A la suite du développement de la méthodologie d'exposition *in situ* de *P. antipodarum*, et de son application dans un contexte de rejet minier, nous avons voulu exposer simultanément *P. antipodarum* et *V. piscinalis* afin de mieux les comparer. Les expositions au laboratoire nous avaient déjà montré d'importantes différences de sensibilité interspécifique, que nous voulions explorer plus en avant.

Nous avons choisi de reprendre un site où nous avions déjà fait une expérimentation auparavant (la Bourbre et la STEP de Bourgoin-Jailleu). Les objectifs de cette exposition étaient multiples. Nous voulions (i) comparer les réponses des deux espèces (survie, reproduction, accumulation de stéroïdes, niveaux de Vn et réserves énergétiques) ; (ii) comparer les réponses de *P. antipodarum* à celles qui avaient été obtenues lors de la précédente exposition sur ce même site (Gust *et al*., 2010b) ; (iii) comparer les réponses des organismes biologiques à celles d'un test *in vitro* (test YES) ; (iv) et enfin évaluer si un lien pouvait être fait avec des polluants organiques dosés dans la rivière.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, les résultats des dosages des polluants organiques, présents dans la rivière, n'étaient pas encore disponibles, ce qui ne permet pas de répondre au quatrième objectif fixé. Une publication sera réalisée ultérieurement à partir des résultats présentés ici et de ceux manquants.

L'exposition a duré 42 jours (6 octobre au 18 novembre 2009) pour *P. antipodarum* et 14 jours (6 au 21 octobre) pour *V. piscinalis*. Les adultes *P. antipodarum* (4.5 ± 0.2 mm) et *V. piscinalis* (4.3 ± 0.2mm) ainsi que les juvéniles *P. antipodarum* (2.5 ± 0.1 mm) ont été mesurés la veille de la mise dans les systèmes.

Les sites d'exposition ont été les mêmes que dans l'expérimentation précédente (Gust *et al*., 2010b). Deux sites amont, sur le Bion et la Bourbre, un site aval immédiat (la confluence) et l'aval éloigné sur la Bourbre (Figure V-1). *V. piscinalis* n'a pas été exposé au niveau de la Confluence.

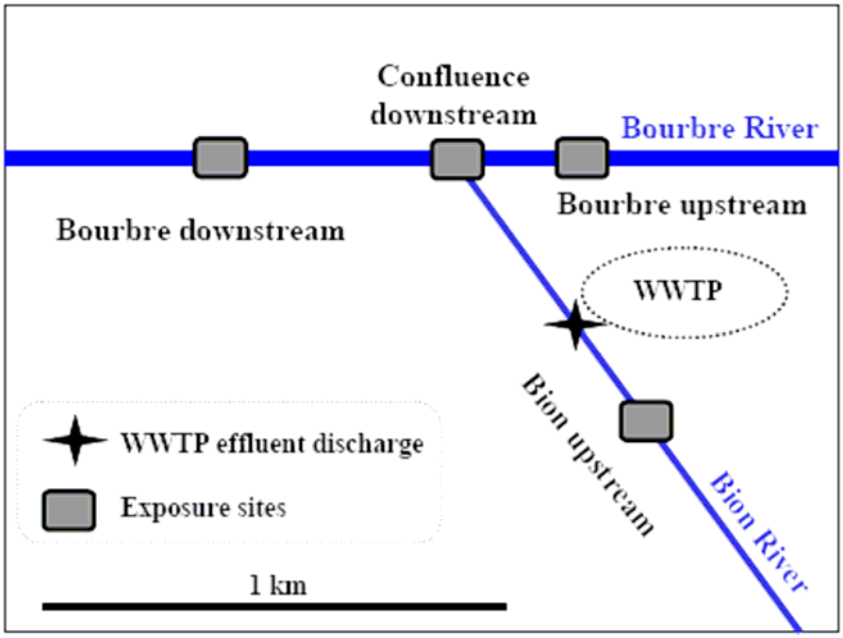


Figure V-1 : Carte des sites d'exposition de la Bourbre

Une caisse a été posée sur chaque site, avec cinq réplicats, contenant 80 adultes et 10 juvéniles *P. antipodarum*, et 30 *V. piscinalis* adultes chacun.

Chaque semaine, les réplicats ont été ouverts, et la survie des organismes évaluée. Des épinards ont été ajoutés pour l'alimentation des individus. Les masses de *V. piscinalis* ont été comptées et récupérées, si il y en avait. La fécondité (nombre d'embryons avec et sans coquille) de *P. antipodarum* a été évaluée à J0, 14, 21, 28 et 42 sur 50 individus pris aléatoirement dans les réplicats (10 par réplicats). A la fin de l'exposition, la croissance des juvéniles *P. antipodarum* a été mesurée.

Les réserves énergétiques (TG, protéines et cholestérol) ont été mesurées à J0, 14, 28 et 42 sur 10 réplicats de 2 *P. antipodarum* disséqués et à J0 et 14 sur 10 *V. piscinalis* disséqués. Les stéroïdes sexuels ont été mesurés à J0, 14, 21, 28 et 42 sur 10 réplicats de 2 *P. antipodarum* entiers et à J0 et 14 sur 10 *V. piscinalis* entiers. Les ALL *et al*P ont été mesurées sur 3 réplicats de 10 *P. antipodarum* (J0, 14, 28 et 42) et *V. piscinalis* disséqués (J0 et 14).

L'activité œstrogénique de l'eau des sites a été mesurée par un test YES à J0, 14, 28 et 42. En parallèle, il est prévu de doser des hormones et polluants organiques (E2, Œstrone, P, T, Acetate de megestrol, Tamoxiféne, 4-tert-OP, OP, 4-tert-NP, NP, BPA, Résorcinol, 2,4-dichlorophénol, 4-tert-butylphénol, 3,4-Dichloroaniline, 4 methylbenzyliden camphre, 3 Bezyliden camphre, carbamazépine, diclofénac, Thirame, Linuron, Atrazine, Acétochlore,

Alachlore, Carbendazime, Prochloraz, Iprodione, Zirame, Diuron, Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)) dans l'eau à J0, 14, 28 et 42, ainsi que dans les sédiments prélevés sur les sites. Ces dosages seront effectués par le Service Central d'Analyse du CNRS.

Les conditions hydrologiques et physico-chimiques lors de l'exposition sont résumées dans le tableau V-2 et la figure V-2. La température moyenne d'exposition était relativement semblable suivant les sites et autour de 12-13°C. Ces basses températures nous ont obligés à poursuivre l'exposition pendant 42 jours afin de pouvoir observer un effet sur la fécondité de *P. antipodarum*, comme nous avait permis de déterminer la publication n°2.

Il est aussi intéressant de noter que la conductivité était plus élevée en aval du rejet de la STEP.

	Temperature				Conductivity	pH
	T°C moy	T°C med	T°C min	T°C max	(µS/cm)	
Bion	13.0	12.7	11.2	16.0	650	7.91
Bourbre upstream	11.5	11.1	8.6	16.4	615	8.10
Confluence	13.5	13.4	10.2	16.9	850	7.80
Bourbre downstream	12.7	12.5	10.2	16.9	750	7.95

Tableau V-2 : Conditions physico-chimiques lors de l'exposition Bourbre 2009

Le débit de la Bourbre a été relativement constant (en moyenne 0.6 m^3/s), avec seulement un évènement pluvieux qui a été à l'origine d'une hausse brutale du niveau d'eau au début du mois de novembre. De même, l'effluent de station d'épuration a eu un débit compris entre 0.11 et 0.27 m^3/s. En revanche, en début d'expérimentation, l'effluent représentait plus de 80% du débit de la rivière, pour ne représenter plus que 20% environ en fin. Cette dilution en cours d'exposition est à mettre en relation avec l'augmentation du débit de la Bourbre.

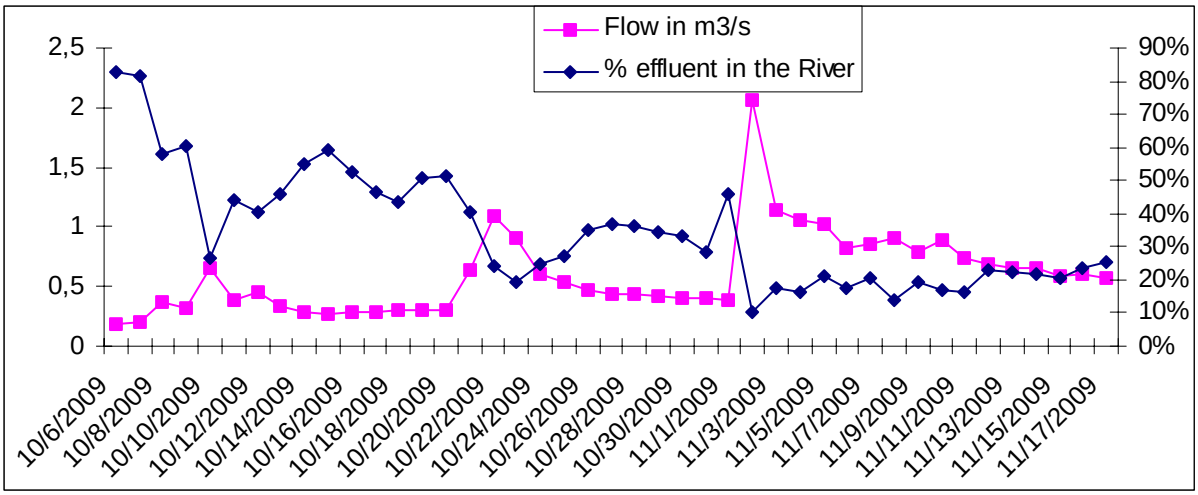


Figure V-2 : Débit de la Bourbre lors de l'exposition et pourcentage d'effluent de STEP dans la rivière

Comme en 2008 (Gust *et al*., 2010b), les taux de survie de *P. antipodarum* ont été très bons (Tableau V-3). En revanche, la survie de *V. piscinalis* (Tableau V-4) a été plus limitée, ce qui nous a contraints d'arrêter l'exposition pour cette espèce après seulement deux semaines. Aucune reproduction n'a pu être observée chez cette espèce.

Les résultats obtenus chez *P. antipodarum* (Figure V-3) sont marqués et correspondent à ce qui avait été observé en 2008 (Gust *et al*., 2010b) : une forte diminution du nombre d'embryons non coquillés en aval immédiat du rejet de la STEP (Confluence) et une récupération sur l'aval éloigné (Bourbre downstream). La diminution de fécondité est observée dès 28 jours d'exposition (Figure V-3A), mais est nettement plus importante après 42 jours (Figure V-3B), avec le nombre d'embryons non coquillés à la Confluence et à l'aval éloigné correspondant seulement à 13 et 25%, respectivement des embryons comptés sur les sites amonts. Aucun effet n'a été mis en évidence sur les embryons coquillés. De manière intéressante, le nombre total d'embryons a augmenté sur les sites amonts, entre le début de l'exposition et la fin (passage de 14 à 20 embryons), alors qu'il avait diminué en 2008 (Gust *et al*., 2010b). Cela suggère que l'ajout d'épinards dans les systèmes d'exposition permet une meilleure alimentation des organismes.

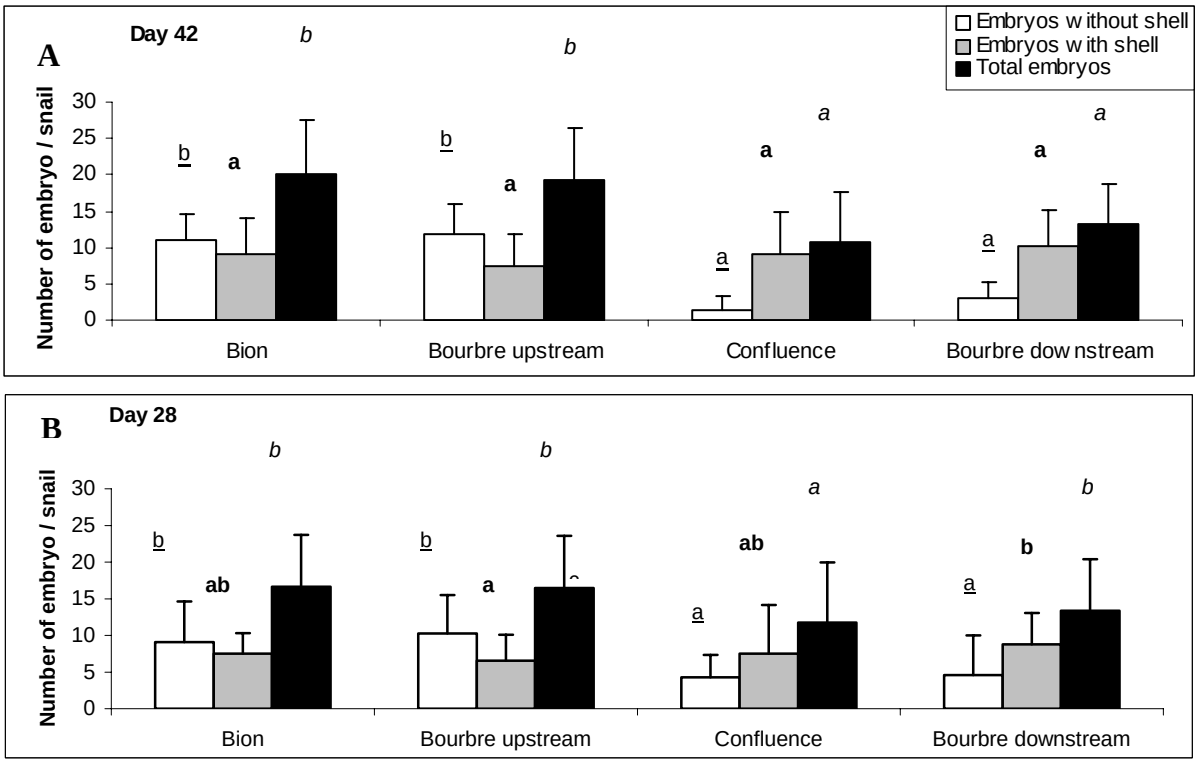


Figure V-3 : Effets de l'exposition in situ à des effluents de station d'épuration sur le nombre d'embryons de *P. antipodarum* après 28 (B) et 42 jours (A). (a<b; P<0.01, LSD-test, les caractères soulignés représentent les différences d'embryons non coquillés entre sites à un temps donné, les caractères gras représentent les embryons coquillés et les caractères italiques les embryons totaux).

Aucune différence significative n'a été notée sur la croissance des juvéniles *P. antipodarum* entre les différents sites. Il en est de même pour les réserves énergétiques et les mesures de protéines Vn-like chez les deux espèces (Tableaux V-3 et V-4).

De manière intéressante, dans les deux cas, le statut énergétique a augmenté entre le début et la fin de l'expérimentation. Cela soulève plusieurs réflexions :

- Nous sommes en mesure d'alimenter de manière satisfaisante les organismes lors d'expositions *in situ*, ce qui permet d'obtenir une fécondité dans les normes physiologiques.
- La diminution de reproduction observée en aval du rejet chez *P. antipodarum* n'est, *a priori*, pas provoquée par une ressource alimentaire insuffisante, mais bien par l'effet reprotoxique de l'effluent.
- Nos méthodes d'élevage sont peut-être à remettre en cause. En effet, les niveaux observés chez *P. antipodarum* en début d'expérimentation étaient assez proches de ceux que nous avions obtenus après une période de mise à jeun. En revanche, après 42 jours, les valeurs sont tout à fait comparables avec celles du suivi annuel. La fécondité en début d'expérimentation était, elle aussi basse (14

embryons par individus en moyenne) par rapport à celle décrite dans le suivi annuel (Publication n°1), alors qu'elle a augmenté jusqu'à un niveau comparable à ce qui est observé dans ce même suivi (Figures V-3). La fécondité et les réserves énergétiques sont donc peut-être à lier dans ce cas.

- Il est très important de mesurer les réserves énergétiques lors d'expositions terrain. En effet, des inductions de reproduction ont été décrites chez *P. antipodarum* par certains auteurs (Schmitt *et al*., 2010b). Outre les niveaux de reproduction extrêmement bas des témoins, qui sont discutés par ailleurs (Publication 1), il paraît raisonnable de se demander si ces inductions ne sont pas dues à une meilleure ressource alimentaire, plus qu'à un effet reprotoxique. Dans ce cas précis, les individus chez qui la reproduction est induite présentent en moyenne 20 embryons, ce qui correspond à la reproduction de nos témoins ! L'induction paraît donc plutôt physiologique que toxique. La connaissance du statut énergétique semble donc très pertinente.

Chez les deux espèces testées, l'exposition à un rejet de STEP n'a eu aucun effet sur les protéines Vn-like (Tableaux V-3 et V-4).

L'absence d'effet sur les niveaux de protéines Vn-like chez *P. antipodarum* alors que la fécondité a été très fortement diminuée, suggère que la disruption de la reproduction a lieu au moment du passage de l'ovocyte à l'embryon. En effet, les mesures d'ALL et d'ALP se font sur des individus dont la poche embryonnaire a été préalablement vidée. Dans la mesure où aucun lien n'a pu être fait entre la variation des niveaux d'ALL ou d'ALP et la fécondité chez *P. antipodarum*, la pertinence de ce marqueur dans l'évaluation du stress reprotoxique chez cette espèce reste encore à démontrer. Concernant *V. piscinalis*, il est difficile de conclure sur l'utilisation de ce marqueur, car aucun effet n'a pu être observé sur la reproduction non plus.

		Bion upstream	Bourbre upstream	Confluence downstream	Bourbre downstream
Survival	**Adults**	99%	95%	95%	96%
	Juveniles	97%	95%	96%	96%
Juvenile size after 42 days (mm)		2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.3
TG (nmol/ind)	**D0**	27.83 ± 6.15			
	D42	82.8 ± 18.2	85.6 ± 14.6	81.9 ± 18.0	91.1 ± 25.3
Cholesterol (nmol/ind)	**D0**	22.42 ± 3.91			
	D42	41.2 ± 4.2	43.1 ± 6.0	42.2 ± 2.6	44.4 ± 7.1
Protein (µg/ind)	**D0**	141.4 ± 14.3			
	D42	248.4 ± 29.9	270.9 ± 29.3	263.6 ± 17.2	269.80 ± 45.62
PBL (mg/ind)	**D0**	6.16 ± 0.25			
	D42	5.20 ± 2.16	4.21 ± 0.26	4.41 ± 0.26	4.44 ± 0.32
ALP (mg/ind)	**D0**	0.27 ± 0.04			
	D42	0.38 ± 0.08	0.43 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.46 ± 0.03
PBL/ALP (mg/ind)	**D0**	22.74 ± 3.40			
	D42	15.02 ± 10.13	9.76 ± 1.19	11.15 ± 0.51	9.66 ± 0.63

Tableau V-3 : Effets de l'expositions à un rejet de STEP sur la survie, croissance, les réserves énergétiques et les protéines Vn-like *chez P. antipodarum*

		Bion upstream	Bourbre upstream	Bourbre downstream
Survival		52%	68%	56%
E2 (pg/ind)	**D0**		35.46 ± 3.80	
	D14	35.21 ± 6.92	44.21 ± 3.56	46.11 ± 2.54
T (pg/ind)	**D0**		93.95 ± 23.20	
	D14	101.07 ± 45.25	219.49 ± 116.01	255.00 ± 68.41
TG (nmol/ind)	**D0**		37.06 ± 12.40	
	D14	84.80 ± 24.18	140.83 ± 20.17	128.35 ± 48.74
Cholesterol (nmol/ind)	**D0**		28.07 ± 8.35	
	D14	39.35 ± 12.41	60.27 ± 9.62	54.30 ± 11.33
Protein (µg/ind)	**D0**		250.34 ± 45.03	
	D14	348.68 ± 30.19	452.26 ± 53.13	413.40 ± 86.12
PBL (mg/ind)	**D0**		7.66 ± 1.50	
	D14	11.30 ± 1.18	13.82 ± 0.43	16.50 ± 1.40
ALP (mg/ind)	**D0**		0.40 ± 0.01	
	D14	0.56 ± 0.14	0.51 ± 0.03	0.60 ± 0.02
PBL/ALP	**D0**		19.02 ± 4.12	
	D14	19.49 ± 2.53	26.91 ± 1.46	27.68 ± 3.00

Tableau V-4 : Effets de l'expositions à un rejet de STEP sur la survie, les niveaux de stéroïdes, les réserves énergétiques et les protéines Vn-like chez *V. piscinalis*

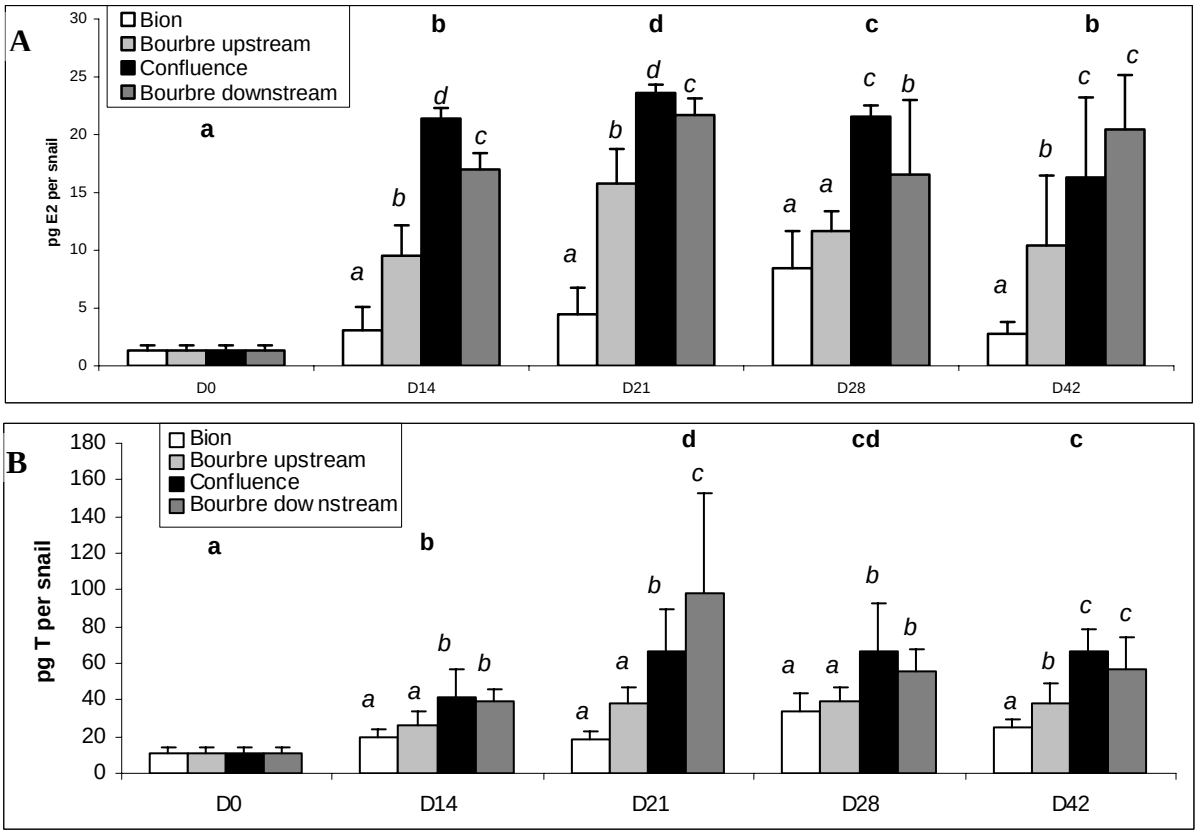


Figure V-4 : Effets de l'exposition in situ à des effluents de station d'épuration sur les niveaux d' E2 (A) et T(B) de *P. antipodarum*. (a<b<c<d; P<0.01, LSD-test, les caractères gras représentent l'effet du temps, et italique les différences entre sites à un temps donné).

Chez les deux espèces exposées, une bioaccumulation de T et E2 sous forme conjuguée a été observée au cours de l'exposition, comme observé chez d'autres espèces (Janer *et al*., 2005a; Fernandes *et al*., 2010) et précédemment sur ce rejet (Gust *et al*., 2010b). Un seul temps d'arrêt (J14) est disponible pour *V. piscinalis*, et indique une bioaccumulation aussi bien de T et d'E2 sur les deux sites de la Bourbre (Tableau V-4). Le site Bourbre aval est à peine plus impacté que l'amont, ce qui suggère un effet limité du rejet de la STEP. De plus, les niveaux d'E2 et T sont peu augmentés par rapport à J0 (d'un facteur respectivement de 1.3 et 2.7).

Les résultats obtenus sur *P. antipodarum* sont beaucoup plus contrastés. Les niveaux de départ d'E2 et T sont dans la gamme de ceux décrits dans le cycle annuel. En revanche, dès J14, une forte bioaccumulation d'E2 est observée, surtout sur les deux sites en aval du rejet. Le facteur de bioaccumulation est de 13. Ces résultats seront à mettre en parallèle des dosages de composés organiques dans l'eau, et notamment d'œstrone, qui seront disponibles ultérieurement.

Au cours de l'exposition précédente (Gust *et al*., 2010b), la facteur de bioaccumulation n'était que de 4 sur ce même site, à échéance comparable. En revanche, la T est nettement moins bioaccumulée que l'E2.

Cette exposition suggère, comme celle à la fluoxétine, que *P. antipodarum* bioaccumule nettement plus aisément que *V. piscinalis* les composés organiques.

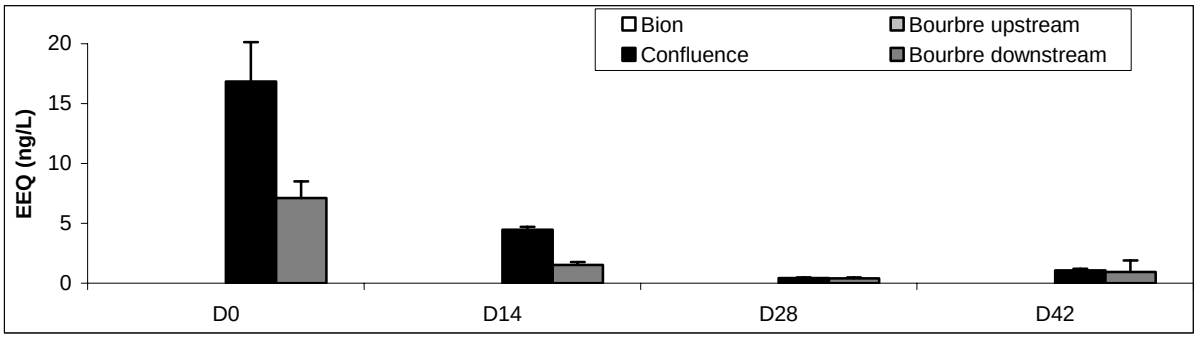


Figure V-5 : Valeur des équivalents œstrogènes (EEQ) en ng/L des eaux des sites d'exposition de la STEP de Bourgoin

Les mesures d'équivalent œstrogènes grâce au YES réalisées au sein du laboratoire (Figure V-5) sont également en faveur de l'hypothèse de la bioaccumulation d'E2 chez *P. antipodarum*. En effet, en début d'exposition, lorsque l'effluent est très concentré dans la rivière, son potentiel œstrogénique est élevé en aval du rejet. Ensuite, il diminue au cours de l'expérimentation. Or, la bioaccumulation d'E2 est très forte en début d'expérimentation, et reste ensuite relativement stationnaire jusqu'à la fin.

En conclusion, cette expérimentation confirme les résultats obtenus précédemment chez *P. antipodarum*, c'est-à-dire une diminution forte de la reproduction an aval de rejet de STEP, conjointement à une bioaccumulation non négligeable de stéroïdes. En revanche *V. piscinalis* bioaccumule moins de stéroïdes et reste très difficile à exposer convenablement. Cette étude montre également qu'il est intéressant d'utiliser différents outils biologiques et chimiques pour évaluer l'état des milieux.

P. antipodarum a été exposé avec succès par encagement et semble être une espèce très **prometteuse** pour les expérimentations ***in situ*** du fait de sa faible sensibilité aux facteurs abiotiques et de la facilité du suivi de sa fécondité (comptage des embryons dans la poche embryonnaire).

Les **stéroïdes sexuels** (E2 et T) sont fortement **bioaccumulés** en aval des rejets d'effluents de STEP lorsque ceux-ci relarguent des hormones (notamment de l'œstrone).

Il semble que la mesure de l'E2 et T lors d'expositions sur le terrain soit :

- Indicatrice de **pollution organique** (présence d'hormones dans l'eau) ;
- Potentiellement un marqueur de présence de composés interférant avec la **synthèse des hormones stéroïdiennes** (fongicides azolés par exemple).

L'utilisation de la batterie de marqueurs à différentes échelles d'organisation biologique permet une meilleure compréhension des **modalités d'apparition des effets toxiques**.

De même que lors des expositions de laboratoire, les effets observés chez *P. antipodarum* ont été différents de ceux observés chez *V. piscinalis*, notamment en ce qui concerne l'accumulation de stéroïdes exogènes. Ici encore, les raisons de cette **différence interspécifique** n'ont pas été étudiées plus en avant.

CHAPITRE 6 :

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les objectifs de notre travail étaient :

1. La mise en place des marqueurs de suivi de la reproduction à différents niveaux d'organisation biologique (individu et sub-individu) chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis;*
2. L'amélioration des connaissances sur le rôle des stéroïdes sexuels dans le contrôle de la reproduction de *P. antipodarum* et de leur utilisation comme marqueurs d'exposition ou d'effet;
3. L'utilisation des espèces de travail et des marqueurs développés pour évaluer un effet éventuel de type perturbation endocrinienne aussi bien au laboratoire que sur le terrain ;
4. L'appréciation des différences de sensibilité de *P. antipodarum* et *V. piscinalis*.

Nous avons répondu en grande partie à ces objectifs, bien que de manière inégale. Des marqueurs de suivi de la reproduction (fécondité, fertilité, histologie, marqueurs biochimiques) ont été développés, mais majoritairement sur *P. antipodarum*, et rarement sur *V. piscinalis*. En effet, nous n'avions que peu d'organismes de cette espèce. Les marqueurs (réserves énergétiques par exemple) ont donc été appliqués directement sur *V. piscinalis* lors des expérimentations, sans validation préalable. Pour les mêmes raisons, nous n'avons pas répondu de manière satisfaisante à l'évaluation des différences interspécifiques. Un travail complémentaire serait nécessaire afin de mieux appréhender cette question.

En revanche, les marqueurs ont pu être utilisés aussi bien au laboratoire que lors d'expérimentations *in situ*, et nous avons pu évaluer leur intérêt pour permettre une meilleure compréhension des modalités d'apparition des effets reprotoxiques. La majorité des résultats a été discutée dans les publications présentées. Nous proposons de discuter, dans ce chapitre, de manière globale l'ensemble des résultats et de les mettre en perspective.

Pour se faire, nous reviendrons sur la validité des marqueurs qui ont été développés dans ce travail, aussi bien du point de vue de leur pertinence pour l'évaluation d'un stress reprotoxique, que de leur facilité d'interprétation et de mesure. Nous discuterons également de l'intérêt des deux modèles biologiques utilisés au cours de la thèse, *P. antipodarum* et *V. piscinalis*. Enfin, du fait de l'utilisation de plus en plus fréquente de *P. antipodarum* dans les tests écotoxicologiques, et de la possibilité d'en faire un biotest OCDE, nous présentons un retour d'expérience sur cet organisme.

A / SIGNIFICATION ET INTERPRETATION DES MARQUEURS

Lorsque nous avons débuté ce travail, l'évaluation des effets reprotoxiques chez *V. piscinalis* et *P. antipodarum* ne se faisait qu'en comptant la descendance (masses ou jeunes pondus et embryons dans la poche embryonnaire). Or, l'observation d'un effet sur la reproduction n'est pas suffisante, à elle seule, pour conclure à une perturbation de la fonction de reproduction. Nous voulions être en mesure de comprendre si les **effets reprotoxiques** observés étaient issus d'une perturbation endocrinienne, c'est-à-dire d'une modification de la balance hormonale (ici les hormones stéroïdiennes), ou bien d'un effet toxique induisant une modification de la fécondité.

Comme les connaissances sur la régulation hormonale des gastéropodes sont limitées, les marqueurs développés, à l'exception de la mesure des stéroïdes sexuels, ne permettent pas d'objectiver une altération de la balance hormonale. Ce sont donc principalement des marqueurs de reprotoxicité, qui permettent de mieux comprendre les **modalités d'altération de la fonction de reproduction**. Ils ont pu être appliqués lors des expérimentations de terrain et en laboratoire et présentent chacun des avantages et des limites. Il convient d'évaluer leur signification, leur facilité d'interprétation et également leur mise en œuvre d'un point de vue pratique.

1. Pertinence des marqueurs dans le cadre de la perturbation endocrinienne

a. Mesures au niveau de l'individu

Les mesures au niveau de l'individu (mortalité, croissance, fécondité) sont aisées mais renseignent uniquement sur un effet au niveau d'une grande fonction, et non pas sur une perturbation de la fonction endocrinienne. Néanmoins, le point de départ de nos travaux est **l'effet biologique** avec les conséquences des polluants sur la **reproduction**.

b. Histologie

A priori, l'histopathologie n'indique pas une perturbation de la fonction endocrinienne, mais permet d'observer des lésions tissulaires parfois très utiles pour avancer des hypothèses quant aux modalités de reprotoxicité impliquées. Elle permet aussi d'identifier les tissus cibles des toxiques, que ce soit le tissu reproducteur ou non. Alors que la petite taille des organismes de travail est un désavantage pour la plupart des marqueurs, l'histopathologie

est, au contraire, un marqueur très intéressant dans ce cas, car l'organisme entier peut être traité.

Au cours de notre travail, le recours à l'analyse histologique des gonades ou d'autres tissus, a permis une meilleure interprétation des résultats. Nous avons montré que les effets du fadrozole sur la gonade de *P. antipodarum* étaient en accord avec ce qui avait été observé en terme de baisse de reproduction. Les résultats de l'immunohistochimie étaient également en accord avec les effets biologiques et la littérature (Gust *et al*., 2010c).

A contrario, lors de l'exposition terrain à des métaux lourds (Gust *et al*., 2011a), l'analyse histologique s'est avérée un marqueur précoce et sensible qui a permis de mettre en évidence une altération, certainement primitive, des structures digestives ayant entraîné au moins en partie les effets délétères sur la reproduction. L'histopathologie s'avère donc être un marqueur judicieux permettant une **localisation tissulaire** précoce des causes.

En revanche, à l'exception de l'exposition à la fluoxétine, où la quantification de l'épaisseur des gonades de *P. antipodarum* par l'analyse histologique a été réalisée (Gust *et al*., 2009), nous avons utilisé ce marqueur uniquement de manière **descriptive** et qualitative. Il serait intéressant de mettre en place des mesures quantitatives. Par exemple, il aurait peut-être été judicieux de mesurer l'épaisseur des tubules digestifs dans l'exposition *in situ* du Lot (Gust *et al*., 2011a), ou bien de quantifier de manière précise l'augmentation du nombre de cellules à calcium. Une étape ultérieure de l'utilisation de marqueurs histopathologique passera donc certainement par une meilleure **quantification** des effets (nombre et taille des oocytes par exemple) par l'utilisation de logiciels d'analyse d'image et l'observation standardisée des lames.

c. Réserves énergétiques

La mesure des réserves énergétiques peut difficilement être mise en rapport avec une perturbation de l'équilibre hormonal contrôlant la reproduction. En revanche, elle donne un **indicateur de condition** indispensable pour interpréter les variations de la reproduction et de la croissance dans des situations où l'apport alimentaire n'est pas parfaitement contrôlé (expositions *in situ*, ou avec des sédiments collectés sur le terrain).

Ainsi, les réserves énergétiques en aval de station d'épuration étaient similaires à celle de l'amont, alors que la reproduction était fortement diminuée (chapitre 5, partie C). La connaissance du statut énergétique permet d'exclure l'hypothèse de l'inanition et suggère un effet toxique du rejet. *A contrario*, une induction de reproduction associée à une augmentation du statut énergétique ne sera pas forcément due à un effet de type perturbateur endocrinien

mais plus certainement à un meilleur apport alimentaire. Certaines publications, en l'absence d'informations sur la nourriture disponible pour les organismes (Duft *et al*., 2007; Schmitt *et al*., 2010a; Schmitt *et al*., 2010b), mériteraient d'indiquer le statut énergétique des individus dont la reproduction est augmentée, avant de conclure à des inductions dues à des perturbateurs endocriniens.

d. Protéines Vn-like

Les mesures de l'induction de Vtg et Vn sont des marqueurs connus de l'exposition à des perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique (Porte *et al*., 2006; Matozzo *et al*., 2008). En conséquence, les mesures de protéine Vn-like par dosages colorimétriques apparaissaient prometteuses pour l'évaluation de la fonction de reproduction. Cependant elles ont présenté plusieurs limites. Nos deux espèces de travail sont parthénogénétiques et hermaphrodites, donc sans mâles. Or cette mesure est particulièrement pertinente chez les juvéniles ou les mâles chez qui elle signe une perturbation réelle de l'équilibre hormonal. Chez les femelles, une augmentation de protéines Vn-like est plus délicate à interpréter.

Les résultats que nous avons obtenus dans nos expérimentations (Publication n°2 et chapitre 5, section C) n'ont pas été probants. Ainsi, la diminution de reproduction induite par l'exposition en aval de station d'épuration ne coïncide pas avec une diminution des protéines Vn-like (chapitre 5, partie C). Lors d'exposition à des EDCs modèles (TBT, OP, BPA), des variations de niveau des protéines Vn-like ont été observées, mais sans effet sur la fécondité de *V. piscinalis* et *P. antipodarum*. Aucun effet sur l'histologie de la gonade de *P. antipodarum* n'avait été observé, alors que celle de *V. piscinalis* était modifiée (Gagnaire *et al*., 2009).

La mesure de protéines Vn-like permet éventuellement de mieux appréhender la phase du développement embryonnaire impactée par les polluants chez *P. antipodarum*. En effet, elle est réalisée sur des individus dont la poche embryonnaire a été vidée, donc ne présentant pas d'embryons, mais des oocytes. Lors de baisse de fécondité, ce sont les embryons qui sont comptés. Ainsi, si le nombre d'oocyte n'est pas modifié par l'exposition au polluant, alors la mesure de protéines Vn-like ne sera pas affectée non plus. La perturbation de développement aurait alors lieu lors du passage de l'oocyte à l'embryon.

Il est également possible que la mesure de protéines Vn-like soit peu sensible aux variations de la fonction de reproduction. La méthodologie de mesure, indirecte, pourrait être peu spécifique des protéines de réserves des embryons chez *P. antipodarum*. Chez certains bivalves, elle serait liée à la fonction immunitaire (Bouchard *et al*., 2009). Dans tous les cas,

le travail fourni sur ce marqueur est resté insuffisant et de nombreuses questions quant à son utilisation et son interprétation subsistent.

e. Stéroïdes sexuels

Le seul marqueur que nous ayons lié à une perturbation endocrinienne réelle (modification de l'équilibre hormonal) est la mesure des stéroïdes sexuels de type vertébrés. En effet, l'inhibition de l'activité aromatase par le fadrozole a engendré des effets simultanés sur la reproduction, l'histologie des gonades et la balance hormonale (Gust *et al*., 2010c). Cette expérimentation de laboratoire reste la seule présentée dans ce travail dans laquelle le lien entre la diminution de fécondité et une modification de la balance hormonale a été fait.

Cependant, l'interprétation de la mesure de stéroïdes diffère suivant le type d'expérimentation : en laboratoire ou *in situ*. L'interprétation est plus simple lorsque les conditions d'expérimentation sont contrôlées (laboratoire) avec des polluants modifiant la synthèse des stéroïdes (fongicides azolées par exemple). Lors d'expérimentations *in situ*, l'interprétation de leur modulation devient plus complexe du fait de nombreux facteurs confondants. Ainsi, dans le cas de l'Ardière, les effets observés étaient similaires à ceux obtenus en laboratoire avec le fadrozole (diminution de fécondité associée à une modification de la balance hormonale), et associés à la présence de fongicides azolés dans le cours d'eau. Cependant, il est difficile de conclure à un effet de ces composés, car ils n'étaient pas les seuls toxiques auxquels *P. antipodarum* était exposé (Gust *et al*., 2010b).

En revanche, la bioaccumulation observée en aval de STEP, notamment sur la Bourbre est remarquable (Gust *et al*., 2010b et chapitre 5, section C). Dans ce cadre, la mesure des stéroïdes dans les organismes modèles devient un marqueur d'exposition à des stéroïdes exogènes. Il semble peu probable que la diminution de la fécondité soit due à l'accumulation de stéroïdes exogènes. Il est vrai que l'accumulation de stéroïdes a eu lieu plus précocement que la diminution de fécondité (Chapitre 5, section C), mais le lien de cause à effet n'est pas certain. Des expérimentations ont été réalisées chez d'autres mollusques, montrant une grande capacité de bioaccumulation de la T, E2 ou œstrone exogènes, en les conjuguant, alors que la forme non conjuguée et biologiquement active restait relativement constante pour des concentrations équivalentes à celles rencontrées en aval de rejet de STEP (Gooding et LeBlanc 2001; Janer *et al*., 2005a; Labadie *et al*., 2007; Fernandes *et al*., 2010). Nous avons, malheureusement, dosé uniquement les formes totales (non conjuguée et conjuguée) de T et E2 en RIA, ce qui nous empêche de vérifier que leur forme non conjuguée n'est pas modifiée par l'exposition aux effluents de STEP. Des expérimentations au

laboratoire seraient à envisager, afin de statuer sur l'effet reprotoxique, ou non, des stéroïdes (T et œstrone principalement) présents en aval de STEP. Pour que ces expérimentations soient pertinentes au maximum, il faudrait être en mesure de différencier les formes non conjuguées et totales de stéroïdes chez *P. antipodarum*.

Cette limite dans la méthodologie de mesure nous a également contraints dans nos interprétations de laboratoire. En effet, lors de l'exposition au fadrozole, nous avons observé des modifications significatives uniquement des niveaux de T, et pas d'E2 (Gust *et al*., 2010c). Cela s'explique certainement par le fait que la T est présente majoritairement sous forme non conjuguée chez *P. antipodarum* et l'E2 sous forme conjuguée (Gust *et al*., 2010d). Ainsi, la méthode de dosage en RIA permet une bonne approximation de la T active, mais pas de l'E2 active. La fraction non conjuguée de l'E2 est tamponnée par la fraction conjuguée, ce qui limite les variations observées. D'autres auteurs, utilisant des méthodes de dosage comparables ont été confrontés à des difficultés similaires lorsqu'ils ont conclu à l'inhibition de l'aromatase par le TBT (Bettin *et al*., 1996).

La mesure des stéroïdes sexuels est donc un marqueur intéressant pour l'évaluation du stress reprotoxique chez *P. antipodarum*. Elle permet de mettre en évidence une modification de la stéroïdogenèse et donc de cibler des types de polluants au laboratoire, ou bien de suggérer leur présence sur le terrain. L'absence de mesure des formes libres de T et d'E2 en limite cependant la portée. Lors d'expositions *in situ*, elle permet de montrer la présence de stéroïdes dans le milieu et donc d'être témoin d'une contamination organique.

Pour compléter la mesure des stéroïdes, il serait intéressant de développer des marqueurs de type **neuropeptides**. Bien que nous ayons avancé les connaissances sur le contrôle endocrinien de la reproduction de *P. antipodarum*, un travail important reste à réaliser pour disposer d'outils permettant de mieux évaluer les modifications du contrôle hormonal. Des raccourcis sont fréquemment faits dans de nombreuses publications (Duft *et al*., 2003a; 2003b; Jobling *et al*., 2003; Mazurova *et al*., 2008; Schmitt *et al*., 2008; Wagner et Oehlmann 2009; Schmitt *et al*., 2010a). Lorsqu'une modification de la fécondité de *P. antipodarum* est observée suite à l'exposition à des EDCs, (potentiels ou avérés) la perturbation de son équilibre endocrinien est systématiquement suggérée, bien qu'aucun élément factuel ne soit avancé. Les auteurs s'appuient généralement sur la similitude supposée entre le système endocrinien des mollusques et des vertébrés pour extrapoler ce qui est connu chez ces derniers. Cependant, une modification de la fécondité n'est pas, à elle seule, preuve de l'action de perturbateurs endocriniens.

En conclusion, les marqueurs développés ou exploités au cours de ce travail permettent, en règle générale, une évaluation et meilleure compréhension d'un **effet reprotoxique**. Dans de rares cas (exposition au fadrozole, et probablement lors de l'exposition terrain sur l'Ardière), ils ont permis de confirmer une perturbation de la fonction endocrinienne. L'ensemble des marqueurs aide plus à la compréhension des modalités d'apparition de l'effet toxique et ont surtout montré leur intérêt lors de leur utilisation conjointe, comme dans l'exposition *in situ* à des rejets miniers (Gust *et al*., 2011a).

2. Capacité d'interprétation

Les variations, dans les mesures des marqueurs développés, dues à un stress toxique doivent pouvoir être interprétées indépendamment de celles dues à un stress non toxique. Pour cela, il faut définir la gamme de variation physiologique, ainsi que leur variabilité, qu'elle soit due à des facteurs physiologiques, ou abiotiques.

a. Définir des niveaux physiologiques

Nous avons effectué un suivi sur une année de certains marqueurs (fécondité, niveaux de stéroïdes, réserves énergétiques) sur une population naturelle (Publication n°1). Cela nous a permis de définir une **gamme de variation physiologique** de ces marqueurs dans cette population, pour une taille donnée. C'est une étape qui nous a paru très importante pour positionner nos résultats par rapport à un attendu physiologique.

Dans le cas de la mesure des stéroïdes sexuels, la connaissance des niveaux physiologiques, nous a permis de mieux apprécier la bioaccumulation au sein des organismes lors d'expositions de terrain (Gust *et al*., 2010b et chapitre 5, section C). En effet, physiologiquement, les concentrations d'E2 n'excèdent pas 2 pg par *P. antipodarum*. Lors d'exposition à des rejets de STEP, nous avons mesuré plus de 20 pg par *P. antipodarum*, ce qui est largement supérieur aux seuils physiologiques. Cela suggère fortement la bioaccumulation d'E2 ou œstrone exogènes, sous forme d'E2 conjugué. En revanche, lors de l'exposition réalisée à des rejets miniers, dans le Lot (Gust *et al*., 2011a), les valeurs maximales observées dans les sites étaient de l'ordre de 3 pg par individu, ce qui n'est pas très supérieur aux niveaux physiologiques. Or, les trois sites, où les niveaux d'E2 étaient plus élevés, étaient dans des zones anthropisées, contrairement aux deux autres sites, où les niveaux d'E2 n'étaient pas modifiés. Il semble donc que l'élévation des niveaux d'E2 chez *P. antipodarum* aient été simplement témoins d'une contamination organique du milieu. La définition d'une gamme de variation physiologique pour ce paramètre permet, enfin, de

s'affranchir, en partie, des sites témoins. Lorsque les niveaux d'E2, notamment, sont supérieurs à ceux de la gamme physiologique, cela indique une contamination potentielle des sites par une pollution organique. Ce cas a, par exemple, été rencontré lors des expositions à des rejets de STEP (Gust *et al*., 2010b et chapitre 5, section C). Les sites amonts dans les expositions *in situ* ne sont donc pas forcément des sites de « référence » (non contaminés), mais simplement des sites témoins, de référence relative, en regard de la pollution évaluée dans les sites en aval de son introduction dans le milieu.

Le niveau de fécondité observé lors du suivi annuel a, lui aussi, été très informatif. La fécondité y était, en effet, globalement plus élevée que celle observée chez nos témoins d'expérimentation (en moyenne de 14 à 28 embryons par individus, contre 10 à 25 dans nos expérimentations de laboratoire et de terrain). Les organismes sur lesquels nous avons suivi la reproduction provenaient tous, à l'exception de ceux de la publication n°9 (Gust *et al*., 2011a), de la population sur laquelle le suivi annuel a été réalisé. Dans tous les cas, ils sont nés dans cette population, ont été ramenés au laboratoire sous forme de juvéniles ou d'adultes, puis ont été utilisés dans les expérimentations après une stabulation plus ou moins longue (de quelques semaines à plus de 6 mois). Nos témoins de laboratoire avaient globalement une fécondité similaire entre les différentes expérimentations (de 10 à 20 embryons).

Il nous apparaît donc pertinent d'utiliser le niveau physiologique de fécondité dans la population d'origine comme **indicateur de bonnes conditions d'expérimentations**. Associé à la mesure de réserves énergétiques, il permet de s'assurer du bon état physiologique des organismes : des niveaux de reproduction bas en début d'expérimentation (3 embryons en moyenne par adultes) étaient, par exemple, concomitants avec des niveaux de réserves énergétiques très inférieures aux seuils physiologiques (Gust *et al*., 2011b) et proches de ceux observés lors de jeun (Chapitre 2, section B). Le niveau des réserves énergétiques a augmenté au cours de cette exposition, ainsi que la fécondité, pour atteindre des seuils acceptables en regard des normes physiologiques que nous avions observées (Gust *et al*., 2011b).

b. Expliquer la variabilité

De nombreux facteurs environnementaux ou liés aux organismes d'expérimentation peuvent être source de variabilité des marqueurs, et il nous faut donc pouvoir évaluer si les variations observées sont d'origine naturelle ou liées au stress (Jemec *et al*., 2010).

Nous n'avons pas étudié tous les facteurs confondants lors de notre travail de thèse. Suite aux premières expérimentations de terrain réalisées (Gust *et al*., 2010b), et d'après la

littérature (Lassen et Kristensen 1978), nous avons déterminé que *P. antipodarum* était relativement peu sensible aux variations de facteurs abiotiques tels que la conductivité ou le pH. En revanche, nous avons voulu déterminer quel effet la température d'exposition pouvait avoir sur certains marqueurs et sur le temps de développement embryonnaire (Publication n°2). En effet, les expérimentations, aussi de bien de laboratoire, que *in situ* se font à des températures variables (Tableau VI-2). Nous avons ainsi montré l'effet relativement limité de la température sur les marqueurs étudiés (stéroïdes, réserves énergétiques, protéines Vn-like), hormis la fécondité. En revanche, nous n'avons pas déterminé quelles étaient les conséquences de l'historique des animaux, ou bien des conditions trophiques, bien que nos résultats suggèrent que l'apport nutritionnel joue un rôle important, notamment lors des expérimentations *in situ*.

Afin de prendre en compte la variabilité qu'il peut y avoir entre les réponses des témoins des différentes expositions, certains auteurs préconisent d'exprimer les résultats en **pourcentage de la réponse des témoins** (Jemec *et al*., 2010). Cependant, cela masque également les valeurs brutes des témoins, et ne permet pas de vérifier qu'elles soient comprises dans la gamme physiologique de variation. Cela peut poser de nombreux problèmes notamment pour la fécondité de *P. antipodarum*. En effet, le nombre total d'embryons par adulte chez les témoins est très variable suivant les expérimentations (Tableau VI-2) : de 2 à 30 en laboratoire. Ainsi des inductions de reproduction significatives sont parfois signalées alors que la fécondité des témoins est très faible (Schmitt *et al*., 2010a). La fécondité des individus décrits comme étant en induction de reproduction semble alors plutôt proche des normes physiologiques, que due à un polluant.

3. Facilité de mesure

Nous avons voulu, en dernier lieu, prendre en compte des éléments techniques concernant les marqueurs utilisés dans ce travail. Tous les marqueurs présentés, ou presque, ont été mesurés aussi bien lors d'expérimentations de laboratoire, qu'*in situ*, indiquant leur adéquation avec ces types d'exposition. Seule la reproduction de *V. piscinalis* n'a pas pu être suivie lors d'expérimentations *in situ*.

Il est préférable que les marqueurs choisis soient peu onéreux et de mesure aisée. De ce point de vue là, les mesures de mortalité, de fécondité et de croissance sont très performantes, et peu coûteuses. Les dosages des réserves énergétiques grâce à l'automate

Konelab®, peuvent se faire sur un très grand nombre d'échantillons, et sont, donc, réalisables en routine. L'investissement nécessaire pour s'équiper avec un automate de dosage est non négligeable, mais le coût de fonctionnement reste modique.

En revanche, les mesures de stéroïdes sexuels et l'analyse histopathologique sont plus chronophages et coûteuses. L'équipement nécessaire est complexe, et le coût de fonctionnement assez conséquent. Pour l'histopathologie, le temps de travail nécessaire limite énormément le nombre de réplicats. Les dosages de stéroïdes en RIA ont généralement été réalisés sur une dizaine de réplicats, mais nécessitent un appareillage particulier, ainsi que la manipulation d'éléments radioactifs. Les contraintes réglementaires sont donc relativement importantes.

Ces caractéristiques (Tableau VI-1) sont à prendre en compte et à évaluer dans le cadre d'une utilisation de ces mesures à des fins autres que de recherche.

	Intérêt par rapport à un effet PE	**Variabilité**	**Facilité de mesure**
Fécondité	++	++	+++
Histologie	++	?	+/-
Stéroïdes	++	+	+
Protéines « Vn-like »	+	?	++
Réserves énergétiques	+	+	+++

Tableau VI-1 : Principales caractéristiques des marqueurs développés (- correspond à une caractéristique peu marquée, et +++ très marquée)

B / INTERET COMPARE DES MODELES BIOLOGIQUES

Deux modèles biologiques, *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis* ont été choisis pour l'évaluation des effets reprotoxiques. Outre leur différence phylogénétique (Dinapoli et Klussmann-Kolb 2010), leur habitat commun avec des stratégies reproductrices différentes, suggère une sensibilité distincte aux polluants. Nous avons, en effet, observé des résultats hétérogènes lors d'expositions conjointes, confirmant l'utilité de l'utilisation d'une batterie d'organismes pour l'évaluation des effets toxiques, et en réduire l'incertitude.

1. Sensibilité interspécifique

En règle générale, il est apparu que *P. antipodarum* était plus sensible, concernant les marqueurs mesurés, aux polluants testés que *V. piscinalis*. Les effets sur la fécondité des deux espèces ont été différents. Une induction de fécondité avec une diminution à la plus forte concentration a été observée chez *P. antipodarum*, alors que la fluoxétine n'avait pas d'effet observable sur la reproduction de *V. piscinalis* (Gust *et al*., 2009). Du fait d'une très faible survie de *V. piscinalis* lors d'expositions sur le terrain, les effets des rejets de STEP sur sa fécondité n'ont pas pu être objectivés, alors que celle de *P. antipodarum* était très fortement diminuée en aval. En revanche, aucun effet notable de l'exposition en aval comparé à l'amont n'a été noté sur les protéines Vn-like des deux espèces (chapitre 5, section C). Lors de l'exposition à la vinclozoline, une faible induction de reproduction a été observée chez *V. piscinalis*, alors que la fécondité de *P. antipodarum* était diminuée (chapitre 3, section B.2.b).

D'une manière générale, nos résultats suggèrent une **sensibilité supérieure de *P. antipodarum*** aux polluants organiques que *V. piscinalis*. Leur mode de reproduction différent semble un atout puisqu'il permet d'observer des effets contraires lors de l'utilisation d'une molécule (la vinclozoline) ayant un mode d'action supposé qui le met en exergue.

La compréhension des mécanismes de base de ces différences de sensibilité devrait permettre d'améliorer les approches qui visent à évaluer l'effet des contaminations dans les écosystèmes. Ces mécanismes peuvent se trouver à plusieurs niveaux :

1. **Entrée du contaminant dans l'organisme**.

L'exposition aux polluants est fonction de sa biodisponibilité, mais également des **modes de nutrition** des organismes. Or, les deux organismes modèles se distinguent par des modes alimentaires différents. *P. antipodarum* est un détritivore (Dorgelo et Leonards 2001),

ou un fouisseur suivant les auteurs (Michaut 1968), alors que *V. piscinalis* est un racleur (Cleland 1954), ou détritivore (Fretter et Graham 1978). De plus, leur cycle de vie diffère quelque peu, ce qui implique que leur exposition à des contaminants n'est certainement pas quantitativement et qualitativement comparable. En outre, *P. antipodarum* est ovovivipare, alors que *V. piscinalis* est ovipare. Le développement des oocytes en embryons se déroule donc à l'intérieur des femelles chez *P. antipodarum*, ce qui modifie certainement l'exposition aux polluants. La capsule dans laquelle sont les œufs chez *V. piscinalis* pourrait agir comme une barrière de protection contre les toxiques.

2. **Bioaccumulation**.

Lors de nos expérimentations, nous avons pu observer que *P. antipodarum* bioaccumulait plus facilement aussi bien les stéroïdes sexuels en aval de STEP (chapitre 5, section C) que la fluoxétine lors d'expositions de laboratoire (chapitre 4, section C). Or, *P. antipodarum* a un **contenu lipidique** supérieur à *V. piscinalis*. Le caractère lipophile des molécules étudiées explique certainement cette différence de bioaccumulation, qui elle-même joue sûrement un rôle dans la différence de sensibilité aux polluants de ces deux espèces : *P. antipodarum* serait plus sensible du fait de sa capacité de bioaccumulation des molécules lipophiles.

3. **Métabolisation et détoxification**.

Les activités de biotransformation des deux espèces sont différentes. L'activité ECOD mesurée *in vivo* semble plus importante chez *V. piscinalis* que chez *P. antipodarum* (B. Gagnaire *et al*., 2009). Une capacité de métabolisation supérieure chez *V. piscinalis* pourrait permettre une détoxification accrue des polluants et donc une sensibilité moindre, comme les résultats obtenus sur la fluoxétine et la norfluoxétine (Chapitre 4, section C) le suggèrent.

4. **Présence des cibles des contaminants**

Enfin, la différence de sensibilité interspécifique observée peut être due à l'absence de cible pour les polluants. C'est vraisemblablement ce qui explique les effets de la fluoxétine, avec la présence de récepteurs à la sérotonine (Gust *et al*., 2009). *P. antipodarum* et *V. piscinalis*, bien qu'étant des gastéropodes, n'appartiennent pas au même ordre, ce qui suggère des différences dans leur physiologie et biochimie. Ainsi, les isoformes de cholinestérase présentes chez ces espèces sont différentes (Gagnaire *et al*., 2008). Il est possible que leur éloignement phylogénétique, bien que faible, soit suffisant pour engendrer des différences fortes de sensibilité aux toxiques.

Notre travail aura montré que l'utilisation de deux espèces, pourtant proches, ne mène pas forcément à des effets similaires. Il existe de nombreuses hypothèses et pistes qui expliquent cela, et qui restent encore, en grande partie, à explorer. Toutefois, l'intérêt d'une espèce utilisée dans un biotest ne réside pas uniquement dans sa sensibilité aux toxiques, mais également dans sa facilité d'utilisation.

2. Facilité de manipulation

Les développements de biomarqueurs (stéroïdes par exemple), ont pu être réalisés uniquement sur *P. antipodarum*, car *V. piscinalis* n'était pas disponible dans l'élevage du laboratoire. De plus, cette espèce était plus difficile à maintenir dans des conditions de laboratoire. Cette observation a été en partie confirmée par le fait que le taux de mortalité de *V. piscinalis* a été, en règle générale, nettement supérieur à celui de *P. antipodarum*. En effet, chez les témoins, le taux de survie de *P. antipodarum* était toujours supérieur à 90%, alors que celui de *V. piscinalis* pouvait chuter à 70% (Gust *et al*., 2009). Dans le cas de l'expérimentation *in situ* (chapitre 5, section C), nous avons été obligés d'interrompre prématurément l'exposition de *V. piscinalis* car la mortalité devenait trop importante. Cela suggère que *V. piscinalis* est **moins robuste** aux conditions d'expositions et d'élevage que *P. antipodarum*. La nourriture (épinards) fournie n'était peut-être pas adaptée, ou bien les variations de conditions abiotiques (température, conductivité, débit…) par rapport aux conditions de laboratoire, ont éventuellement été moins bien supportées.

Néanmoins, *P. antipodarum* est une espèce invasive, certainement moins **représentative** des autres espèces de l'écosystème que *V. piscinalis*. D'autre part, il est possible que la méthodologie d'exposition (principalement en eau) ne soit pas adaptée à la biologie de *V. piscinalis*.

En conclusion, *P. antipodarum* paraît être un modèle plus adapté que *V. piscinalis* pour l'évaluation d'effets reprotoxiques. Il est plus sensible aux polluants testés en laboratoire, plus facile de manipulation et plus adapté pour les expérimentations *in situ*.

C / P. ANTIPODARUM UN MODELE ANIMAL ADAPTE POUR L'EVALUATION D'EFFETS REPROTOXIQUES ?

P. antipodarum a été proposé comme espèce de gastéropode modèle pour l'évaluation des effets reprotoxiques à **l'OCDE** (Duft *et al*., 2007; Matthiessen 2008; OECD 2010). Nos travaux ont permis de développer les outils de suivi de la reproduction disponibles chez cette espèce : seul le suivi de fécondité par comptage d'embryons était réalisé jusque là. Nous avons montré l'importance d'y associer le comptage des juvéniles nés lors des expositions en laboratoire (Publication n°2, Gust *et al*., 2009; Gust *et al*., 2010c; Gust *et al*., 2011b), afin de constater que les effets observés lors du comptage d'embryon se répercutaient sur le nombre de juvéniles nés. Nous avons également développé des outils de suivi de la reproduction au niveau sub-individu (histologie, mesure de stéroïdes et de réserves énergétiques). Alors que la majorité des travaux présentant des résultats de reprotoxicité chez cette espèce ne s'intéressent qu'aux effets sur la fécondité (Duft *et al*., 2003a; Duft *et al*., 2003b; Jobling *et al*., 2003; Oetken *et al*., 2005; Nentwig 2007; Mazurova *et al*., 2008; Schmitt *et al*., 2008; Wagner et Oehlmann 2009; Schmitt *et al*., 2010a), nous avons associé des approches permettant de mieux décrire les mécanismes de reprotoxicité impliqués (Gust *et al*., 2009; Gust *et al*., 2010b; Gust *et al*., 2010c). Nous avons également développé une méthode d'exposition *in situ* que nous avons pu transposer dans des hydrosystèmes divers (Gust *et al*., 2010b; Gust *et al*., 2011a). Cet organisme nous semble très prometteur, mais présente tout de même des limites qu'il convient de prendre en compte.

P. antipodarum est un organisme globalement **sensible** aux polluants organiques. Nos résultats suggèrent que son **système endocrinien** est pour partie comparable à celui des vertébrés, c'est-à-dire que les stéroïdes sexuels de type vertébrés jouent un rôle dans le contrôle de la reproduction (Gust *et al*., 2010c). Des études ont ainsi montré des effets similaires entre les réponses de type œstrogéniques chez des poissons et la fécondité de *P. antipodarum* exposés à l'EE2 (Jobling *et al*., 2003).

C'est un organisme dont **l'élevage** au laboratoire est aisé, avec des populations présentes en site naturel, qui permettent le réapprovisionnement des élevages. De plus, comme il est parthénogénétique, les individus sur lesquels les expérimentations sont réalisées sont des **clones**, ce qui réduit théoriquement la variabilité.

Sa **robustesse** permet une manipulation facile et une grande variété de types d'exposition : par **l'eau** ou le **sédiment**, en **laboratoire** ou **encagés** dans les rivières. La mortalité est très faible dans les deux cas. Le **coût** expérimental est réduit.

Nous avons montré que la **durée** d'expérimentation devait être adaptée à la température d'exposition, notamment lors d'expositions sur le terrain. Ainsi, celles-ci sont aisées, mais peu informatives en période hivernale lorsque la température de l'eau est inférieure à 12°C (Gust *et al*., 2011b).

Les résultats que nous avons obtenus sur *P. antipodarum* et ceux issus de la littérature laissent donc envisager une grande adaptabilité du biotest. Cependant, certains éléments restent à évaluer. *P. antipodarum* n'est pas un organisme très représentatif de son phylum, et une espèce **invasive**. Cette caractéristique doit être prise en compte lors d'expérimentations *in situ*. Peut-on se permettre d'introduire une espèce invasive dans un écosystème? La taille de la maille utilisée dans les systèmes terrain doit être suffisamment faible (300µm) pour éviter au maximum la dissémination des juvéniles, mais la perte d'un système d'exposition lors d'évènements climatiques ne peut être exclue.

Bien que les connaissances sur la biologie de cette espèce s'améliorent, elles restent limitées, ce qui engendre de nombreux facteurs de variabilité. Le **cycle reproductif** n'est pas clairement décrit, ce qui oblige à calibrer les organismes suivant leur taille. Or, la taille de départ dans les expérimentations peut être très différente suivant les études (Tableau VI-2) et le suivi annuel a montré que la fécondité en dépendait. Le **nombre d'embryons** compté dans les différentes études publiées est aussi très changeant, ce qui limite les comparaisons. En effet, que conclure d'une induction de reproduction permettant de passer de 4 à 10 embryons (Schmitt *et al*., 2010a), quand la reproduction moyenne des témoins d'autres expérimentations est supérieure à 10 embryons par animal (Tableau VI-2)? Cela indique-t-il une mauvaise capacité à les maintenir en laboratoire, une alimentation inadaptée? Le fait de travailler sur des populations différentes, bien qu'issues du même clone engendre-t-il de la variabilité? Les résultats parfois opposés qu'obtiennent différents laboratoires avec la même molécules (Nentwig 2007; Gust *et al*., 2009) peuvent-ils être justifiés ainsi? La **reproductibilité** des tests utilisant *P. antipodarum* reste donc à travailler. Il serait certainement intéressant de mettre en place des marqueurs génétiques pour caractériser les différentes **populations** sur lesquelles les laboratoires travaillent et comparer les sensibilités des souches. Un travail semble aussi nécessaire en ce qui concerne l'alimentation de *P. antipodarum* lors des expérimentation : il est possible que les faibles niveaux de fécondité observés dans certaines expérimentations en découlent.

P. antipodarum présente donc des avantages non négligeables pour l'évaluation des effets reprotoxiques, qui en font un modèle extrêmement prometteur. En revanche, de nombreuses incertitudes quant à sa biologie en limitent encore la pertinence. Un travail important reste à fournir afin de valider de manière convenable le biotest.

Conditions expérimentales						Embryons sans coquille	Embryons avec coquille	Embryons totaux	Référence
Type d'exposition		**Taille de départ des organismes**	**Origine des organismes**	**T°C**	**Nourriture**				
Laboratoire	**Sédiment**	>3.6mm	Elevage	15±1°C	Tetraphyll + Fish Tamin				(Duft *et al*., 2003a; Duft *et al*., 2003b)
			Elevage	15.6°C		3-6 (14-56j)	3-8 (14-56j)	8-14 (14-56j)	(Mazurova *et al*., 2008)
		4±0.5 mm	Elevage	16°C	Feuilles	1 (56j)			(Schmitt *et al*., 2008)
		3.8±0.5 mm	Elevage	15±1°C	Feuilles			2-5 (28-56j)	(Schmitt *et al*., 2010a)
		4.3±0.4 mm	Elevage	16°C	Tetramin	3-15 (14-56j)	5-18 (14-56j)	8-30 (14-56j)	Master C. Durand
		4.4±0.4 mm	Terrain	21°C	Tetramin	12	13	25	Thèse C. Durand
	Eau		Elevage		Laitue	1-2 (14-42j)			(Jobling *et al*., 2003)
		4.6±0.2 mm	Elevage	20°C	Laitue			7.5 (35j)	(Gerard et Poullain 2005)
		4.1±0.1 mm	Elevage	20°C	Laitue			2.5 (35j)	(Gerard et Poullain 2005)
		>3.7 mm	Elevage	16±1°C	Tetraphyl	6 (28-56j)	11 (28-56j)	17 (28-56j)	(Nentwig 2007)
		>3.7 mm	Elevage	16±1°C	Tetraphyl	7 (28j)	7 (28j)	14 (28j)	(Oetken *et al*., 2005)
			Elevage	16±1°C	Tetraphyl	4 (56j)			(Wagner et Oehlmann 2009)
		4.4±0.3 mm	Elevage	21°C	Tetramin	4 (42j)	9 (42j)	13 (42j)	(Gust *et al*., 2009)
			Elevage		Laitue			10-12 (14-42j)	(Jobling *et al*., 2003)

Conditions expérimentales					Embryons sans coquille	Embryons avec coquille	Embryons totaux	Référence
Type d'exposition	**Taille de départ des organismes**	**Origine des organismes**	**T°C**	**Nourriture**				
Terrain	3.3-4.3 mm	Elevage		Sédiment			4-10 (28j)	(Schmitt *et al*., 2010b)
	4.2±0.2 mm	Terrain		Biofilm	3-10 (7-28j)	6-10 (7-28j)	10-17 (7-28j)	(Gust *et al*., 2010b)
	4.4±0.4 mm	Terrain		Biofilm	3-9 (21-28j)	5-16 (21-28j)	9-25 (21-28j)	(Gust *et al*., 2011a)
	4.5±0.2 mm	Terrain		Biofilm + épinards	9-12 (14-42j)	4-9 (14-42j)	9-25 (14-42j)	Chapitre 5, section C

Tableau VI-2 : Nombres d'embryons par P. antipodarum décrits dans la littérature suivant le type et les conditions d'experimentations

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les perturbateurs endocriniens ont, en quelques années, envahi les écosystèmes et l'environnement immédiat de l'homme chez lequel ils sont suspectés d'entraîner des déséquilibres hormonaux à l'origine de manifestations pathologiques variées. Leur présence dans les écosystèmes aquatiques est avérée et leurs effets sur certaines espèces, aussi bien vertébrées qu'invertébrées, démontrés. Malgré des connaissances éparses sur les facteurs régissant la physiologie de la reproduction des gastéropodes, beaucoup reste à faire et notamment comprendre : (i) si le contrôle de leur reproduction est, pour partie, similaire à celui des mammifères ; (ii) si les « prosobranches », dont le phylum est très représenté dans le monde animal, peuvent être indicateurs de la pollution de leur milieu et surtout être prédictifs du risque pour l'homme.

Notre travail a permis de mettre en place des marqueurs de suivi de la reproduction chez des gastéropodes d'eau douce aussi bien au niveau individuel que sub-individuel. Par ces développements, nous avons amélioré les connaissances concernant le rôle et l'implication des stéroïdes sexuels dans le contrôle de la reproduction de *P. antipodarum*, et validé leur utilisation comme marqueur d'exposition ou d'effet. La pertinence de l'ensemble de ces indicateurs a été confrontée à des situations de terrain. En effet, nous avons développé une méthodologie d'exposition *in situ* par encagement de *P. antipodarum*, sur des sites de témoins ou pollués par des toxiques organiques ou métalliques. Très clairement, notre démarche expérimentale a permis de discriminer des sites pollués et témoins. Dans une tentative de transposer cette approche à une espèce de gastéropode représentative (*V. piscinalis*), nous avons pu comparer l'utilisation de deux espèces modèles lors d'expositions de laboratoire et de terrain et mis en évidence leur différences de sensibilité et les conséquences sur leur possible utilisation comme organisme sentinelle. Enfin, nos travaux nous ont permis de mieux apprécier la valeur de *P. antipodarum* en tant qu'espèce modèle d'évaluation des effets reprotoxiques.

Malgré ces résultats, et de l'utilisation que nous avons pu faire de ces marqueurs, leur variabilité doit être mieux évaluée : quels sont les facteurs engendrant une telle variabilité de la

fécondité chez les témoins ? Quelle est la variabilité génétique réelle des différentes souches de *P. antipodarum* utilisées dans les laboratoires, et quelles conséquences a-t-elle sur les marqueurs ? L'origine de la différence de sensibilité aux polluants de *V. piscinalis* comparé à *P. antipodarum* doit être encore précisée. Bien que les stéroïdes sexuels jouent vraisemblablement un rôle dans le contrôle de la reproduction, comment est-il médié ? Existe-t-il un récepteur aux œstrogènes fonctionnel ? Quelles sont les interactions avec les neuropeptides et comment utiliser ces derniers en tant que marqueurs de la perturbation endocrinienne ?

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abad M, Ruiz C, Martinez D, Mosquera G, Sánchez JL.** 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, Ostrea edulis, from San Cibran (Galicia, Spain). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **110**(2): 109-118.
2. **Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC.** 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry* **20**(4): 470-475.
3. **Alonso A, Camargo JA.** 2009. Long-Term Effects of Ammonia on the Behavioral Activity of the Aquatic Snail Potamopyrgus antipodarum (Hydrobiidae, Mollusca). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **56**(4): 796-802.
4. **Alonso A, Castro-Diez P.** 2008. What explains the invading success of the aquatic mud snail Potamopyrgus antipodarum (Hydrobiidae, Mollusca)? *Hydrobiologia* **614**(1): 107-116.
5. **Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ.** 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of Aoac International* **86**(2): 412-431.
6. **Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL.** 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). *Toxicological Sciences* **67**(1): 121-130.
7. **Bannister R, Beresford N, May D, Routledge EJ, Jobling S, Rand-Weaver M.** 2007. Novel estrogen receptor-related transcripts in Marisa cornuarietis; a freshwater snail with reported sensitivity to estrogenic chemicals. *Environmental Science & Technology* **41**(7): 2643-2650.
8. **Bergeron JM, Crews D, McLachlan JA.** 1994. Pcbs as Environmental Estrogens - Turtle Sex Determination as a Biomarker of Environmental Contamination. *Environmental Health Perspectives* **102**(9): 780-781.
9. **Bernard F.** 1890. Recherches sur *Valvata* (*Cincinna*) *piscinalis*. *Bulletin scientifique de la France et de la Belgique* **22**: 253-371.
10. **Berthelin C, Kellner K, Mathieu M.** 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **125**(3): 359-369.
11. **Bettin C, Oehlmann J, Stroben E.** 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgolander Meeresuntersuchungen* **50**(3): 299-317.
12. **Binder E.** 1967. La coquille embryonnaire des Valvatidae. *Archiv für Molluskenkunde* **96**: 21-24.
13. **Binsumait IA, Hadidi KA, Raghib SAA.** 2001. Stability of fluoxetine in stored plasma, aqueous, and methanolic solutions determined by HPLC with UV detection. *Pharmazie* **56**(4): 311-313.
14. **Blaber SJM.** 1970. The occurence of penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Proc malac Soc Lond* **39**: 132-233.
15. **Blaise C, Gagne F, Salazar M, Salazar S, Trottier S, Hansen PD.** 2003. Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent. *Fresenius Environmental Bulletin* **12**(8): 865-870.

16. **Borg W, Shackleton CHL, Pahuja SL, Hochberg RB.** 1995. Long-Lived Testosterone Esters in the Rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(5): 1545-1549.
17. **Bouchard B, Gagne F, Fortier M, Fournier M.** 2009. An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel Elliptio complanata. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **150**(2): 132-140.
18. **Boyd GR, Palmeri JM, Zhang SY, Grimm DA.** 2004. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Science of the Total Environment* **333**(1-3): 137-148.
19. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
20. **Breitholtz M, Ruden C, Hansson SO, Bengtsson BE.** 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **63**(2): 324-335.
21. **Brion F, Tyler CR, Palazzi X, Laillet B, Porcher JM, Garric J, Flammarion P.** 2004. Impacts of 17 beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (Danio rerio). *Aquatic Toxicology* **68**(3): 193-217.
22. **Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ.** 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(2): 464-469.
23. **Brooks BW, Foran CM, Richards SM, Weston J, Turner PK, Stanley JK, Solomon KR, Slattery M, La Point TW.** 2003a. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters* **142**(3): 169-183.
24. **Brooks BW, Turner PK, Stanley JK, Weston JJ, Glidewell EA, Foran CM, Slattery M, La Point TW, Huggett DB.** 2003b. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere* **52**(1): 135-142.
25. **Brouwer A, Reijnders PJH, Koeman JH.** 1989. Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal (Phoca vitulina). *Aquatic Toxicology* **15**(1): 99-106.
26. **Brown L.** 1980. The use of Hydrobia jenkinsi to detect intermittent toxic discharges to a river. *Water Research* **14**(8): 941-947.
27. **Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR.** 1986. The decline of the gastropod Nucella lapillus around south-west England: evidence for the effect of tributylin from antifouling paints. *Journal - Marine Biological Association* **66**(3): 611-640.
28. **Bulete A, Baudot R, Wiest L, Cren C.** accepted. Micro-QuEChERS-NanoLC-Nano-ESI-MS/MS for the detection and quantification of traces of endocrine disruptors in benthic invertebrates. .
29. **Burtis CA, Ashwood ER.** 2001. Tietz fundamentals of clinical chemistry. *5th edition ed*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
30. **Calabrese EJ, Baldwin LA.** 2002. Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**(7): 331-337.

31. **Calow P.** 1978. The evolution of life-cycles strategies in freshwater gastropods. *Malacologia* **17**(2): 351-364.
32. **Canesi L, Ciacci C, Betti M, Lorusso LC, Marchi B, Burattini S, Falcieri E, Gallo G.** 2004. Rapid effects of 17 beta-estradiol on cell signaling and function of Mytilus hemocytes. *General and Comparative Endocrinology* **136**(1): 58-71.
33. **Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE.** 1992. Evidence for Decreasing Quality of Semen During Past 50 Years. *British Medical Journal* **305**(6854): 609-613.
34. **Castro LFC, Lima D, Machado A, Melo C, Hiromori Y, Nishikawa J, Nakanishi T, Reis-Henriques MA, Santos MM.** 2007a. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod Nucella lapillus. *Aquatic Toxicology* **85**(1): 57-66.
35. **Castro LFC, Melo C, Guillot R, Mendes I, Queiros S, Lima D, Reis-Henriques MA, Santos MM.** 2007b. The estrogen receptor of the gastropod Nucella lapillus: Modulation following exposure to an estrogenic effluent? *Aquatic Toxicology* **84**: 465-468.
36. **Chen C-F, Kao C-M, Dong C-D, Chen C-W.** 2009. Butyltin contamination in sediments and seawater from Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Environ Monit Assess* **169**(1-4): 75-87.
37. **Christensen AM, Faaborg-Andersen S, Ingerslev F, Baun A.** 2007. Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**(1): 85-91.
38. **Chu S, Metcalfe CD.** 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1163**(1-2): 112-118.
39. **Clarke N, Routledge EJ, Garner A, Casey D, Benstead R, Walker D, Watermann B, Gnass K, Thomsen A, Jobling S.** 2009. Exposure to Treated Sewage Effluent Disrupts Reproduction and Development in the Seasonally Breeding Ramshorn Snail (Subclass: Pulmonata, Planorbarius corneus). *Environmental Science & Technology* **43**(6): 2092-2098.
40. **Cleland D.** 1954. A study of the habits of *Valvata* (*Cincinna*) *piscinalis* (Müller) and the structure and function of the alimentary canal and reproductive system. *Proceedings of the malacological society of London* **30**: 167-203.
41. **Colborn T, Saal FSV, Soto AM.** 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives* **101**(5): 378-384.
42. **Cooke PS, Zhao YD, Hansen LG.** 1996. Neonatal polychlorinated biphenyl treatment increases adult testis size and sperm production in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **136**(1): 112-117.
43. **Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR.** 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* **40**(4): 287-304.
44. **Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P.** 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, Unio tumidus, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**(2): 122-131.

45. **Couper JM, Leise EM.** 1996. Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc Ilyanassa obsoleta. *Biological Bulletin* **191**(2): 178-186.
46. **Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM.** 1998. Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives* **106**: 11-56.
47. **de Jong-Brink M, ter Maat A, Tensen CP.** 2001. NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution. *Peptides* **22**(3): 309-315.
48. **De Longcamp D, Lubet P, Drosdowsky M.** 1974. The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (Mytilus edulis). *General and Comparative Endocrinology* **22**(1): 116-127.
49. **Defur PL.** 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. *Ilar Journal* **45**(4): 484-493.
50. **Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M.** 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1549-1558.
51. **Devier MH, Labadie P, Togola A, Budzinski H.** 2010. Simple methodology coupling microwave-assisted extraction to SPE/GC/MS for the analysis of natural steroids in biological tissues: Application to the monitoring of endogenous steroids in marine mussels Mytilus sp. *Analytica Chimica Acta* **657**(1): 28-35.
52. **Dillon RT.** 2000. The ecology of freshwater molluscs. Cambridge: Cambridge University Press.
53. **Dinapoli A, Klussmann-Kolb A.** 2010. The long way to diversity - Phylogeny and evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics And Evolution* **55**(1): 60-76.
54. Document SANCO. 2009. European Guidance Document on Method Validation & Quality Control Procedures for Pesticides Residues Analysis in food and feed. Fed Reg SANCO/10684/2009
55. **Donohoe RM, Curtis LR.** 1996. Estrogenic activity of chlordecone, o,p'-DDT and o,p'-DDE in juvenile rainbow trout: Induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites. *Aquatic Toxicology* **36**(1-2): 31-52.
56. **Dorgelo J.** 1987. Density fluctuations in populations (1982-1986) and bioogical observations of *Potamopyrgus jenkinsi* in two trophically differing lakes. *Hydrobiological Bulletin* **21**(1): 95-110.
57. **Dorgelo J.** 1988. Groxth in a freshwater snail under laboratory conditions in relation to eutrophication. *Hydrobiologia* **157**: 125-127.
58. **Dorgelo J.** 1991. Growth, food and respiration in the prosobranch snail *Potamopyrgus jenkinsi* (E.A. Smith) (Hydrobiidae, Mollusca). *Verhandlungen der internationalen vereinigung für theoretische und angewandte limnologie* **24**: 2947-2953.
59. **Dorgelo J, Leonards PEG.** 2001. Relationship between C/N ratio of food types and growth rate in the snail Potamopyrgus jenkinsi (E. A. Smith). *Journal of the North American Benthological Society* **20**(1): 60-67.
60. **Dorgelo J, Meester H, vanVelzen C.** 1995. Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail Potamopyrgus jenkinsi (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae). *Hydrobiologia* **316**(3): 199-210.

61. **Dridi S, Romdhane MS, Elcafsi M.** 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, Crassostrea gigas in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture* **263**(1-4): 238-248.
62. **Ducrot V, Cognat C, Mons R, Mouthon J, Garric J.** 2006. Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: The gastropod Valvata piscinalis. *Chemosphere* **62**(8): 1272-1281.
63. **Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik C, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J.** 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals - an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail Potamopyrgus antipodarum. *Ecotoxicology* **16**(1): 169-182.
64. **Duft M, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J.** 2003a. Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail Potamopyrgus antipodarum in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(1): 145-152.
65. **Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J.** 2003b. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail Potamopyrgus antipodarum. *Aquatic Toxicology* **64**(4): 437-449.
66. **Dybdahl MF, Lively CM.** 1995. Diverse, Endemic and Polyphyletic Clones in Mixed Populations of a Fresh-Water Snail (Potamopyrgus-Antipodarum). *Journal of Evolutionary Biology* **8**(3): 385-398.
67. **Ellis DV, Pattisina LA.** 1990. Widespread neogastropod imposex: A biological indicator of global TBT contamination? *Marine Pollution Bulletin* **21**(5): 248-253.
68. **Escher BI, Hermens JLM.** 2002. Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science & Technology* **36**(20): 4201-4217.
69. **Facemire CF, Gross TS, Guillette LJ.** 1995. Reproductive Impairment in the Florida Panther - Nature or Nurture. *Environmental Health Perspectives* **103**: 79-86.
70. **Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M.** 2000. Multiple actions of steroid hormones - A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews* **52**(4): 513-555.
71. **Falniowski A, Economou-Amilli A, Anagnostidis K.** 1988. Valvata piscinalis O. F. Muller (Mollusca, Prosobranchia) and its epizoic diatoms from Lake Trichonis, Greece. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* **73**(3): 327-335.
72. **Féral C, Le Gall S.** 1982. Induction expérimentale par un polluant marin (le tributylétain), de l'activité neuroendocrine contrôlant la morphogénèse du pénis chez les femelles d'*Ocenebra erinacea* (Mollusque, Prosobranche gonochorique). *Comptes-rendus de l'Académie des Sciences de Paris* **295**: 627-630.
73. **Fernandes D, Navarro JC, Riva C, Bordonali S, Porte C.** 2010. Does exposure to testosterone significantly alter endogenous metabolism in the marine mussel Mytilus galloprovincialis? *Aquatic Toxicology* **100**(4): 313-320.
74. **Flaherty CM, Dodson SI.** 2005. Effects of pharmaceuticals on Daphnia survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* **61**(2): 200-207.
75. **Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ.** 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (Cyprinus carpio)

captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* **104**(10): 1096-1101.

76. **Fong PP.** 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biological Bulletin* **194**(2): 143-149.
77. **Fong PP, Deguchi R, Kyozuka K.** 1996a. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve Mactra chinensis from central Japan. *Biological Bulletin* **191**(1): 27-32.
78. **Fong PP, Deguchi R, Kyozuka K.** 1997. Characterization of serotonin receptor mediating intracellular calcium increase in meiosis-reinitiated oocytes of the bivalve Ruditapes philippinarum from central Japan. *Journal of Experimental Zoology* **279**(1): 89-101.
79. **Fong PP, Huminski PT, D'Urso LM.** 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (Sphaerium striatinum) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Journal of Experimental Zoology* **280**(3): 260-264.
80. **Fong PP, Olex AL, Farrell JE, Majchrzak RM, Muschamp JW.** 2005. Induction of preputium eversion by peptides, serotonin receptor antagonists, and selective serotonin reuptake inhibitors in Biomphalaria glabrata. *Invertebrate Biology* **124**(4): 296-302.
81. **Fong PP, Philbert CM, Roberts BJ.** 2003. Putative serotonin reuptake inhibitor-induced spawning and parturition in freshwater bivalves is inhibited by mammalian 5-HT2 receptor antagonists. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* **298A**(1): 67-72.
82. **Fong PP, Wade S, Rostafin M.** 1996b. Characterization of serotonin receptor mediating parturition in fingernail clams Sphaerium (Musculium) spp from eastern North America. *Journal of Experimental Zoology* **275**(4): 326-330.
83. **Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, Huggett DB.** 2004. Reproductive assessment of Japanese medaka (Oryzias latipes) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **46**(4): 511-517.
84. **Forbes VE, Moller V, Depledge MH.** 1995. Intrapopulation Variability in Sublethal Response to Heavy-Metal Stress in Sexual and Asexual Gastropod Populations. *Functional Ecology* **9**(3): 477-484.
85. **Frenzel P.** 1979. Untersuchungen zur Biologie und Populationdynamik von *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Prosobranchia) im Litoral des Bodensees. *Archiv für Hydrobiologia* **85**(4): 448-464.
86. **Fretter V, Graham A.** 1978. The Prosobranch molluscs of Britain and Danemark Part 3: *Neritacea*, *Viviparacea*, *Valvatavea*, terrestrial and freshwater *Littorinacea* and *Rissoacea*. *The Journal of Molluscan studies* **5**: 111-115.
87. **Fretter V, Graham A.** 1994. British Prosobranch molluscs. Their fonctional anatomy and ecology. London: Ray Society.
88. **Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA.** 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem* **18**(7): 673-674.
89. **Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Muller J, Wenzel A.** 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research* **36**(6): 1429-1438.

90. **Gagnaire B, Gagné F, André C, Blaise C, Abbaci K, Budzinski H, Dévier M-H, Garric J.** 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic Toxicology* **92**(3): 155-167.
91. **Gagnaire B, Geffard O, Noury P, Garric J.** 2009. *In vivo* indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. *Environmental Toxicology* **DOI 10.1002/tox**.
92. **Gagnaire B, Geffard O, Xuereb B, Margoum C, Garric J.** 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, Potamopyrgus antipodarum (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and Valvata piscinalis (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774). *Chemosphere* **71**(3): 553-560.
93. **Gagne F, Andre C, Blaise C.** 2005. Increased vitellogenin gene expression in the mussel Elliptio complanata exposed to estradiol-17 beta. *Fresenius Environmental Bulletin* **14**(10): 861-866.
94. **Gagne F, Blaise C, Aoyama I, Luo R, Gagnon C, Couillard Y, Campbell P, Salazar M.** 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environmental Toxicology* **17**(3): 149-159.
95. **Gagné F, Blaise C, Hellou J.** 2004. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, Elliptio complanata, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **138**(1): 33-44.
96. **Gagné F, Blaise C, Salazar M, Salazar S, Hansen PD.** 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel Elliptio complanata. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **128**(2): 213-225.
97. **Gangloff MM.** 1998. The new zealand mudsnail in western North America. *Aquatic Nuisance Species Digest* **2**(3): 25-30.
98. **Gangolli SD.** 1982. Testicular effects of phthalate esters. *Environmental Health Perspectives* **Vol. 45**: 72-84.
99. **Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard JC.** 2006. Estradiol-17[beta] and testosterone concentrations in male and female Mya arenaria (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* **145**(2): 133-139.
100. **Gerard C, Blanc A, Costil K.** 2003. Potamopyrgus antipodarum (Mollusca : Hydrobiidae) in continental aquatic gastropod communities: impact of salinity and trematode parasitism. *Hydrobiologia* **493**(1-3): 167-172.
101. **Gerard C, Dussart GBJ.** 2003. Invader and invaded - colonisation by, and of, Potamopyrgus antipodarum Gray (Mollusca, Hydrobiidae). *Slugs & Snails: Agricultural, Veterinary & Environmental Perspectives*(80): 281-286.
102. **Gerard C, Le Lannic J.** 2003. Establishment of a new host-parasite association between the introduced invasive species Potamopyrgus antipodarum (Smith) (Gastropoda) and Sanguinicola sp Plehn (Trematoda) in Europe. *Journal of Zoology* **261**: 213-216.
103. **Gerard C, Poullain V.** 2005. Variation in the response of the invasive species Potamopyrgus antipodarum (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. *Environmental Pollution* **138**(1): 28-33.

104. **Gerard C, Poullain V, Lance E, Acou A, Brient L, Carpentier A.** 2009. Influence of toxic cyanobacteria on community structure and microcystin accumulation of freshwater molluscs. *Environmental Pollution* **157**(2): 609-617.

105. **Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL.** 1991a. Tbt-Induced Imposex in the Dogwhelk, Nucella-Lapillus - Geographical Uniformity of the Response and Effects. *Marine Environmental Research* **32**(1-4): 79-87.

106. **Gibbs PE, Pascoe PL, Bryan GW.** 1991b. Tributyltin-Induced Imposex in Stenoglossan Gastropods - Pathological Effects on the Female Reproductive-System. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **100**(1-2): 231-235.

107. **Gibbs PE, Spencer BE, Pascoe PL.** 1991c. The American Oyster Drill, Urosalpinx-Cinerea (Gastropoda) - Evidence of Decline in an Imposex-Affected Population (R-Blackwater, Essex). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **71**(4): 827-838.

108. **Gledhill WE, Kaley RG, Adams WJ, Hicks O, Michael PR, Saeger VW, LeBlanc GA.** 1980. ENVIRONMENTAL SAFETY ASSESSMENT OF BUTYL BENZYL PHTHALATE. *Environmental Science and Technology* **14**(3): 301-305.

109. **Goldey ES, Kehn LS, Lau C, Rehnberg GL, Crofton KM.** 1995. Developmental Exposure to Polychlorinated-Biphenyls (Aroclor-1254) Reduces Circulating Thyroid-Hormone Concentrations and Causes Hearing Deficits in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **135**(1): 77-88.

110. **Golding LA, Timperley MH, Evans CW.** 1997. Non-lethal responses of the freshwater snail Potamopyrgus antipodarum to dissolved arsenic. *Environmental Monitoring and Assessment* **47**(3): 239-254.

111. **Gooding MP, LeBlanc GA.** 2001. Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail Ilyanassa obsoleta. *General and Comparative Endocrinology* **122**(2): 172-180.

112. **Gooding MP, LeBlanc GA.** 2004. Seasonal variation in the regulation of testosterone levels in the eastern mud snail (Ilyanassa obsoleta). *Invertebrate Biology* **123**(3): 237-243.

113. **Gooding MP, Wilson VS, Folmar LC, Marcovich DT, LeBlanc GA.** 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (Ilyanassa obsoleta). *Environmental Health Perspectives* **111**(4): 426-430.

114. **Gottfried H, Dorfman RI.** 1970. Steroids of invertebrates. V. The in vitro biosynthesis of steroids by the male-phase ovotestis of the slug (Ariolimax californicus). *General and Comparative Endocrinology* **15**(1): 120-138.

115. **Guillette LJ, Gross TS, Gross DA, Rooney AA, Percival HF.** 1995. Gonadal Steroidogenesis in-Vitro from Juvenile Alligators Obtained from Contaminated or Control Lakes. *Environmental Health Perspectives* **103**: 31-36.

116. **Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR.** 1994. Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex-Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* **102**(8): 680-688.

117. **Gust M, Buronfosse T, Geffard O, Coquery M, Mons R, Abbaci K, Giamberini L, Garric J.** 2011a. Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology* **101**: 100-108.

118. **Gust M, Buronfosse T, Geffard O, Mons R, Queau H, Mouthon J, Garric J.** 2010b. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail Potamopyrgus antipodarum (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. *Water Res* **44**(15): 4517-4528.

119. **Gust M, Buronfosse T, Giamberini L, Ramil M, Mons R, Garric J.** 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: Potamopyrgus antipodarum and Valvata piscinalis. *Environmental Pollution* **157**(2): 423-429.

120. **Gust M, Buronfosse T, Mons R, Andre C, Gagne F, Garric J.** 2011b. Is exposure temperature a confounding factor for assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*? *Aquatic Toxicology* **101**(2): 396-404.

121. **Gust M, Garric J, Giamberini L, Mons R, Abbaci K, Garnier F, Buronfosse T.** 2010c. Sensitivity of gastropod Potamopyrgus antipodarum to a specific aromatase inhibitor. *Chemosphere* **79**(1): 47-53.

122. **Gust M, Vulliet E, Giroud B, Garnier F, Couturier S, Garric J, Buronfosse T.** 2010d. Development, validation and comparison of LC-MS/MS and RIA methods for quantification of vertebrates-like sex-steroids in prosobranch molluscs. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**(19): 1487-1492.

123. **Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall M, Sumpter JP, Taylor T, Zaman N.** 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(3): 534-542.

124. **Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge EJ, Rycroft R, Sumpter JP, Tylor T.** 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(11): 1993-2002.

125. **Harrison PTC, Holmes P, Humfrey CDN.** 1997. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Science of the Total Environment* **205**(2-3): 97-106.

126. **Haynes A, Taylor BJR.** 1984. Food finding and food preference in *Potamopyrgus jenkinsi* (E. A. Smith) (Gastropoda: Prosobranchia). *Archiv für Hydrobiologia* **100**(4): 479-491.

127. **Haynes A, Taylor BJR, Varley ME.** 1985. The influence of the mobility of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith, E. A.) (Prosobranchia: Hydrobiidae) on its spread. *Archiv für Hydrobiologia* **103**(4): 497-508.

128. **Heard WH.** 1963. Reproductive feature of Valvata. *Nautilus* **77**(2): 64-68.

129. **Henry TB, Kwon JW, Armbrust KL, Black MC.** 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in Ceriodaphnia dubia. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(9): 2229-2233.

130. **Heywood J, Edwards RW.** 1962. Some aspects of the ecology of *Potamopyrgus jenkensi* Smith. *Journal of Animal Ecology* **31**: 239-250.

131. **Hiemke C, Hartter S.** 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **85**(1): 11-28.

132. **Hines GA, Bryon PJ, Wasson KM, McClintock JB, Watts SA.** 1996. Sex steroid metabolism in the antartic pteropod *Clione antartica* (Mollusca: Gasteropoda). *Invertebrate Biology* **115**(2): 113-119.

133. **Hines GA, Watts SA, Sower SA, Walker CW.** 1990. Sex steroid extraction from echinoderm tissues. *Journal of Liquid Chromatography* **13**(12): 2489-2498.

134. **Hirai S, Kishimoto T, Kadam AL, Kanatani H, Koide SS.** 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *Journal of Experimental Zoology* **245**(3): 318-321.

135. **Hochberg RB.** 1998. Biological esterification of steroids. *Endocrine Reviews* **19**(3): 331-348.

136. **Howell WM, Black DA, Bortone SA.** 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia* **4**: 676-681.

137. **Hylleberg H, Siegismund HR.** 1987. Niche overlap in mud snails (Hydrobiidae): freezing tolerance. *Marine Biology* **94**: 403-407.

138. **Ingersol CG, Hutchinson T, Crane M, Dodson S, DeWitt T, Gies A, Huet M, Mc Kenney CL, Oberdorster E, Pascoe P, Versteeg DJ, Warwick O.** 1999. Laboratory toxicity tests foe evaluating potential effects of endocrine-disrupting compounds. In: Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment, (al. DFe, ed). Pensacola, The Netherlands:SETAC editions, 107-198.

139. **Jacobsen R, Forbes VE.** 1997. Clonal variation in life-history traits and feeding rates in the gastropod, Potamopyrgus antipodarum: Performance across a salinity gradient. *Functional Ecology* **11**(2): 260-267.

140. **James MO.** 1987. Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environmental Health Perspectives* **71**: 97-108.

141. **Janer G, Bachmann J, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Porte C.** 2006a. The effect of organotin compounds on gender specific androstenedione metabolism in the freshwater ramshorn snail Marisa cornuarietis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **99**(2-3): 147-156.

142. **Janer G, Lavado R, Thibaut W, Porte C.** 2005a. Effects of 17 beta-estradiol exposure in the mussel Mytilus galloprovincialis: A possible regulating role for steroid acyltransferases. *Aquatic Toxicology* **75**(1): 32-42.

143. **Janer G, LeBlanc GA, Porte C.** 2005b. Androgen metabolism in invertebrates and its modulation by xenoandrogens - A comparative study. In: Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology, Vol. 1040, 354-356.

144. **Janer G, LeBlanc GA, Porte C.** 2005c. A comparative study on androgen metabolism in three invertebrate species. *General and Comparative Endocrinology* **143**(3): 211-221.

145. **Janer G, Lyssimachou A, Beachman J, Oehlmann J, Schutle-Oehlmann U, Porte C.** 2006b. Sexual dimorphism in esterified steroid levels in Marisa cornuarietis: The effect of xenoandrogenic compounds. *Marine Environmental Research* **62**: S226-S226.

146. **Janer G, Mesia-Vela S, Porte C, Kauffman FC.** 2004. Esterification of vertebrate-type steroids in the Eastern oyster (Crassostrea virginica). *Steroids* **69**(2): 129-136.

147. **Janer G, Porte C.** 2007. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* **16**(1): 145-160.

148. **Janer G, Sternberg RM, LeBlanc GA, Porte C.** 2005d. Testosterone conjugating activities in invertebrates: are they targets for endocrine disruptors? *Aquatic Toxicology* **71**(3): 273-282.

149. **Jemec A, Drobne D, Tisler T, Sepcic K.** 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research* **17**(3): 571-581.

150. **Jensen A, Forbes VE.** 2001. Interclonal variation in the acute and delayed toxicity of cadmium to the European prosobranch gastropod Potamopyrgus antipodarum (Gray). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**(2): 230-235.

151. **Jensen A, Forbes VE, Parker ED.** 2001. Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod Potamopyrgus antipodarum: Linking toxicant effects on individuals to the population level. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(11): 2503-2513.

152. **Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR.** 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* **65**(2): 205-220.

153. **Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP.** 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* **32**(17): 2498-2506.

154. **Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP.** 1995. A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic. *Environmental Health Perspectives* **103**(6): 582-587.

155. **Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP.** 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(2): 194-202.

156. **Jobling S, Sumpter JP.** 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* **27**(3-4): 361-372.

157. **Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, Wilson CJ, Bestari KT, Solomon KR.** 2005. Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **42**(3): 313-323.

158. **Jokela J, Lively CM, Dybdahl MF, Fox JA.** 1997. Evidence for a cost of sex in the freshwater snail Potamopyrgus antipodarum. *Ecology* **78**(2): 452-460.

159. **Joose J.** 1984. Recent progress in endocrinology of Molluscs. In: Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones, (Hoffmann J, Porchet M, eds). Berlin:Springer-Verlag, 19-35.

160. **Joose J.** 1988. The hormones of Molluscs. In: Endocrinology of Selected Invertebrate Types:Alan R. Liss, Inc., 89-140.

161. **Kajiwara M, Kuraku S, Kurokawa T, Kato K, Toda S, Hirose H, Takahashi S, Shibata Y, Iguchi T, Matsumoto T, Miyata T, Miura T, Takahashi Y.** 2006. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, Thais clavigera. *General and Comparative Endocrinology* **148**(3): 315-326.

162. **Kashian DR, Dodson SI.** 2004. Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in Daphnia magna. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(5): 1282-1288.

163. **Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, FennerCrisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA.** 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* **104**: 715-740.

164. **Keay J, Bridgham JT, Thornton JW.** 2006. The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: Evolutionary and functional implications. *Endocrinology* **147**(8): 3861-3869.

165. **Kelce WR, Monosson E, Gamcsik MP, Laws SC, Gray LE.** 1994. Environmental Hormone Disruptors - Evidence That Vinclozolin Developmental Toxicity Is Mediated by Antiandrogenic Metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* **126**(2): 276-285.

166. **Kerans BL, Dybdahl ME, Gangloff MM, Jannot JE.** 2005. Potamopyrgus antipodarum: distribution, density, and effects on native macroinvertebrate assemblages in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Journal of the North American Benthological Society* **24**(1): 123-138.

167. **Ketata I, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A.** 2007a. Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam Ruditapes decussatus: A one year study in the gulf of Gabes area. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **147**(2): 424-431.

168. **Ketata I, Smaoui-Damak W, Guermazi F, Rebai T, Hamza-Chaffai A.** 2007b. In situ endocrine disrupting effects of cadmium on the reproduction of Ruditapes decussatus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **146**(3): 415-430.

169. **Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW.** 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(21): 8897-8901.

170. **Klobucar GIV, Pavlica M, Erben R, Papes DE.** 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel Dreissena polymorpha haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology* **64**(1): 15-23.

171. **Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT.** 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol* **36**(6): 1202-1211.

172. **Krusch B, Schoenmakers HJN, Voogt PA, Nolte A.** 1979. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of Helix pomatia L. (Gastropoda) - An in vitro study. *Comp Biochem Physiol* **64 B**: 101-104.

173. **Kulkarni GK, Fingerman M.** 1992. Effects of 5-Hydroxytryptamine Agonists on Ovarian Development in the Fiddler-Crab, Uca-Pugilator. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **101**(2): 419-423.

174. **Kulkarni GK, Nagabhushanam R, Amaldoss G, Jaiswal RG, Fingerman M.** 1992. *In vivo* Stimulation of Ovarian Development in the Red Swamp Crayfish, *Procambarus-Clarkii* (Girard), by 5-Hydroxytryptamine. *Invertebrate Reproduction & Development* **21**(3): 231-240.

175. **Kwon JW, Armbrust KL.** 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(10): 2561-2568.

176. **Labadie P, Peck M, Minier C, Hill EM.** 2007. Identification of the steroid fatty acid ester conjugates formed in vivo in Mytilus edulis as a result of exposure to estrogens. *Steroids* **72**(1): 41-49.

177. **LaFont R.** 2000. The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology* **9**(1-2): 41-57.

178. **Lafont R, Mathieu M.** 2007. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* **16**(1): 109-130.

179. **Lagadic L, Coutellec MA, Caquet T.** 2007. Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. *Ecotoxicology* **16**(1): 45-59.

180. **Lajeunesse A, Gagnon C, Sauve S.** 2008. Determination of basic antidepressants and their n-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**(14): 5325-5333.

181. **Lam MW, Young CJ, Mabury SA.** 2005. Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. *Environmental Science & Technology* **39**(2): 513-522.

182. **Lance E, Brient L, Carpentier A, Acou A, Marion L, Bormans M, Gerard C.** 2010a. Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta. *Science of the Total Environment* **408**(17): 3560-3568.

183. **Lance E, Bugajny E, Bormans M, Gerard C.** 2008. Consumption of toxic cyanobacteria by Potamopyrgus antipodarum (Gastropoda, Prosobranchia) and consequences on life traits and microcystin accumulation. *Harmful Algae* **7**(4): 464-472.

184. **Lance E, Josso C, Dietrich D, Ernst B, Paty C, Senger F, Bormans M, Gerard C.** 2010b. Histopathology and microcystin distribution in Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacterial or dissolved microcystin-LR exposure. *Aquatic Toxicology* **98**(3): 211-220.

185. **Larson JM, Karasov WH, Sileo L, Stromborg KL, Hanbidge BA, Giesy JP, Jones PD, Tillitt DE, Verbrugge DA.** 1996. Reproductive success, developmental anomalies, and environmental contaminants in double-crested cormorants (Phalacrocorax auritus). *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(4): 553-559.

186. **Lassen HH.** 1979. Reproductive effort in Danish Mudsnails (Hydrobiidae). *Oecologia* **40**: 365-369.

187. **Lassen HH, Kristensen JH.** 1978. Tolerance to abiotic factors in mudsnails (*Hydrobiidae*). *Natura jutlandica* **20**: 243-250.

188. **Le Curieux-Belfond O, Moslemi S, Mathieu M, Seralini GE.** 2001. Androgen metabolism in oyster Crassostrea gigas: evidence for 17 beta-HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **78**(4): 359-366.

189. **Le Guellec D, Thiard MC, Remy-Martin JP, Deray A, Gomot L, Adessi GL.** 1987. In vitro metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in Helix aspersa. *General and Comparative Endocrinology* **66**(3): 425-433.

190. **LeBlanc GA, Campbell PM, den Besten P, Brown RP, Chang ES, Coats JR, deFur PL, Dhadialla T, Edwards J, Riddiford LM, Simpson MG, Snell TW, Thorndyke M, Matsumura F.** 1999. The endocrinology of invertebrates. In: Endocrine disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment, (deFur PLea, ed). Pensacola, The Netherlands:SETAC Presse.

191. **Legrand MF, Costentin E, Bruchet A.** 1991. Occurrence of 38 Pesticides in Various French Surface and Ground Waters. *Environmental Technology* **12**(11): 985-996.

192. **Lehoux JG, Williams EE.** 1971. Metabolism of progesterone by gonadal tissue of *Littorina littorea* (L.) (Prosobranchia, Gasteropoda). *Journal of Endocrinolgy* **51**: 411-412.

193. **Levri EP, Lively CM.** 1996. The effects of size, reproductive condition, and parasitism on foraging behaviour in a freshwater snail, Potamopyrgus antipodarum. *Animal Behaviour* **51**: 891-901.

194. **Li MH, Hansen LG.** 1996. Enzyme induction and acute endocrine effects in prepubertal female rats receiving environmental PCB/PCDF/PCDD mixtures. *Environmental Health Perspectives* **104**(7): 712-722.

195. **Li Q, Osada M, Suzuki T, Mori K.** 1998. Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 beta on vitellogenesis in the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Invertebrate Reproduction & Development* **33**(1): 87-93.

196. **Li Y, Qin JG, Li XX, Benkendorff K.** 2009. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, Crassostrea gigas, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture* **286**(1-2): 64-71.

197. **Lodge DM, Kelly P.** 1985. Habitat disturbance and the stability of freshwater gastropod populations. *Oecologia* **68**(1): 111-117.

198. **Lumbye J, Lumbye LE.** 1965. The Oxygen Consumption of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith). *Hydrobiologia* **25**(3-4): 489-500.

199. **Lupo Di Prisco C, Dessi' Fulgheri F.** 1975. Alternative pathways of steroid biosynthesis in gonads and hepatopancreas of Aplysia depilans. *Comparative Biochemistry and Physiology* **50**(1 B): 191-195.

200. **Lyssimachou A, Bachmann J, Porte C.** 2008. Short-term exposure to the organotin compound triphenyltin modulates esterified steroid levels in females of Marisa cornuarietis. *Aquatic Toxicology* **89**(2): 129-135.

201. **Maclatchy DL, Vanderkraak GJ.** 1995. The Phytoestrogen Beta-Sitosterol Alters the Reproductive Endocrine Status of Goldfish. *Toxicology and Applied Pharmacology* **134**(2): 305-312.

202. **Makela S, Davis VL, Tally WC, Korkman J, Salo L, Vihko R, Santti R, Korach KS.** 1994. Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast-Cancer Cells. *Environmental Health Perspectives* **102**(6-7): 572-578.

203. **Makynen EA, Kahl MD, Jensen KM, Tietge JE, Wells KL, Van der Kraak G, Ankley GT.** 2000. Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (Pimephales promelas). *Aquatic Toxicology* **48**(4): 461-475.

204. **Mandrioli R, Forti GC, Raggi MA.** 2006. Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: The role of cytochrome P450. *Current Drug Metabolism* **7**(2): 127-133.

205. **Markaverich BM, Webb B, Densmore CL, Gregory RR.** 1995. Effects of Coumestrol on Estrogen-Receptor Function and Uterine Growth in Ovariectomized Rats. *Environmental Health Perspectives* **103**(6): 574-581.

206. **Matozzo V, Gagne F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C.** 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International* **34**(4): 531-545.

207. **Matozzo V, Marin MG.** 2008. Can 17-[beta] estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam Tapes philippinarum? *Environmental Toxicology and Pharmacology* **26**(1): 38-44.

208. **Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Akiyama I, Hirose H, Takahashi Y.** 2007. Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *General and Comparative Endocrinology* **151**(2): 195-201.

209. **Matsumoto T, Nakamura AM, Mori K, Kayano T.** 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Zoological Science* **20**(1): 37-42.

210. **Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K.** 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **118**(4): 811-817.

211. **Matthiessen P.** 2008. An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. *Integrated Environmental Assessment and Management* **4**(3): ISSN 1551-3777(print)|1551-3793(electronic).

212. **Matthiessen P, Gibbs PE.** 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(1): 37-43.

213. **Matthiessen P, Reynoldson T, Billinghurst Z, Brassard DW, Cameron P, Chandler GT, Davies IM, Horiguchi T, Mount DR, Oehlmann J, Pottinger TG, Sibley PK, Thompson HM, Vethaak AD.** 1999. Field assessment for endocrine disruption in invertebrates. In: Endocrine disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment, (Fur PLd, ed). Pensacola, The Netherlands:SETAC Presse, 199-270.

214. **Matthiessen P, Waldock R, Thain JE, Waite ME, Scropehowe S.** 1995. Changes in Periwinkle (Littorina-Littorea) Populations Following the Ban on Tbt-Based Antifoulings on Small Boats in the United-Kingdom. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **30**(2): 180-194.

215. **Mazurova E, Hilscherova K, Jalova V, Kohler HR, Triebskorn R, Giesy JP, Blaha L.** 2008. Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail Potamopyrgus antipodarum in vivo and in the cell bioassays in vitro. *Aquat Toxicol* **89**(3): 172-179.

216. **McFarland VA, Clarke JU.** 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: Considerations for a congener-specific analysis. *Environmental Health Perspectives* **81**: 225-239.

217. **Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang LH, Laviano A, Rossi-Fanelli F.** 2000. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* **16**(10): 843-857.

218. **Metcalfe CD, Chu SG, Judt C, Li HX, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM.** 2010. Antidepressants and Their Metabolites in Municipal Wastewater, and Downstream Exposure in an Urban Watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**(1): 79-89.

219. **Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R.** 2003a. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(12): 2872-2880.

220. **Metcalfe CD, Miao XS, Koenig BG, Struger J.** 2003b. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**(12): 2881-2889.

221. **Michaut P.** 1968. Données biologiques sur un Gastéropode Prosobranche récemment introduit en Côte-d'Or, *Potamopyrgus jenkinsi*. *Hydrobiologia* **32**: 513-527.

222. **Michel P, Averty B.** 1999. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update. *Marine Pollution Bulletin* **38**(4): 268-275.

223. **Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG, Needham LL.** 1996. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* **348**(9024): 409-409.

224. **Moller V, Forbes VE, Depledge MH.** 1994. Influence of Acclimation and Exposure Temperature on the Acute Toxicity of Cadmium to the Fresh-Water Snail Potamopyrgus-Antipodarum (Hydrobiidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**(9): 1519-1524.

225. **Moller V, Forbes VE, Depledge MH.** 1996. Population responses to acute and chronic cadmium exposure in sexual and asexual estuarine gastropods. *Ecotoxicology* **5**(5): 313-326.

226. **Monosson E, Fleming WJ, Sullivan CV.** 1994. Effects of the Planar Pcb 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (Tcb) on Ovarian Development, Plasma-Levels of Sex Steroid-Hormones and Vitellogenin, and Progeny Survival in the White Perch (Morone-Americana). *Aquatic Toxicology* **29**(1-2): 1-19.

227. **Mora MA.** 1997. Transboundary pollution: Persistent organochlorine pesticides in migrant birds of the southwestern United States and Mexico. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(1): 3-11.

228. **Morcillo Y, Albalat A, Porte C.** 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution: Bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(6): 1203-1208.

229. **Morcillo Y, Porte C.** 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquatic Toxicology* **38**(1-3): 35-46.

230. **Morcillo Y, Porte C.** 1999. Evidence of endocrine disruption in the imposer-affected gastropod Bolinus brandaris. *Environmental Research* **81**(4): 349-354.

231. **Morcillo Y, Ronis MJJ, Porte C.** 1998a. Effects of tributyltin on the Phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam Ruditapes decussata. *Aquatic Toxicology* **42**(1): 1-13.

232. **Morcillo Y, Ronis MJJ, Sole M, Porte C.** 1998b. Effects of tributyltin on the cytochrome P450 monooxygenase system and sex steroid metabolism in the clam Ruditapes decussata. *Marine Environmental Research* **46**(1-5): 583-586.

233. **Mori K.** 1969. Effect of steroid on Oyster-IV. Acceleration of sexual maturation in female *Crassostrea gigas* by Estradiol-17beta. *Journal of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **35**(11): 1077-1079.

234. **Mori K, Muramatsu T, Nakamura Y.** 1969. Effect of steroid on Oyster-III. Sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas* by Estradiol-17beta. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **35**(11): 1072-1076.

235. **Mori K, Muramatsu T, Nakamura Y.** 1972a. Effect of steroid on Oyster-V. Acceleration of glycogenolysis in female *Crassostrea gigas* by Estradiol-17beta injection under natural conditions. *Journal of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **38**(10): 1185-1189.

236. **Mori K, Muramatsu T, nakamura Y.** 1972b. Effect of steroid on Oyster-VI. Indoor experiment on the acceleration of glycogenolysis in female *Crassostrea gigas* by Estradiol-17beta. *Journal of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **38**(10): 1191-1196.

237. **Morley NJ.** 2008. The role of the invasive snail Potamopyrgus antipodarum in the transmission of trematode parasites in Europe and its implications for ecotoxicological studies. *Aquatic Sciences* **70**(2): 107-114.

238. **Mossner R, Lesch KP.** 1998. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behavior and Immunity* **12**(4): 249-271.

239. **Mouneyrac C, Linot S, Amiard JC, Amiard-Triquet C, Métais I, Durou C, Minier C, Pellerin J.** 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve Scrobicularia plana from three sites differing by their level of contamination. *General and Comparative Endocrinology* **157**(2): 133-141.

240. **Mouthon J.** 1982. Les mollusques dulçaquicoles: Données biologiques et écologiques; Clés de détermination des principaux genres de Bivalves et de gastéropodes de France. *Conseil Supérieur de la Pêche ed*.

241. **Mouthon J.** 2001a. Life cycle and population dynamics of the Asian clam Corbicula fluminea (Bivalvia : Corbiculidae) in the Rhone River at Creys-Malville (France). *Archiv Fur Hydrobiologie* **151**: 571-589.

242. **Mouthon J.** 2001b. Mollusques dulcicoles et pollutions biodégradables des cours d'eau: échelle de sensibilité des espèces, genres et familles. *Ingénieries* **26**: 3-15.

243. **Muschamp JW, Fong PP.** 2001. Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail Biomphalaria glabrata: Reduction of egg laying and induction of penile erection. *Journal of Experimental Zoology* **289**(3): 202-207.

244. **Nagler JJ, Ruby SM, Idler DR, So YP.** 1987. Serum Phosphoprotein Phosphorus and Calcium Levels as Reproductive Indicators of Vitellogenin in Highly Vitellogenic Mature Female and Estradiol-Injected Immature Rainbow-Trout (Salmo-Gairdneri). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **65**(10): 2421-2425.

245. **Najle R, Elissondo M, Gentile S, Gentile M, Vacarezza G, Solana H.** 2000. Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to cadmium. *Science of the Total Environment* **247**(2-3): 263-268.

246. **Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N.** 2008a. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (Oryzias latipes): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* **70**: 865-873.

247. **Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N.** 2008b. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (Oryzias latipes): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* **70**(5): 865-873.

248. **Nalecz-Jawecki G.** 2007. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. *Chemosphere* **70**(1): 29-35.

249. **Nassel DR.** 1996. Peptidergic neurohormonal control systems in invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology* **6**(6): 842-850.

250. **Neiman M, Jokela J, Lively CM.** 2005. Variation in asexual lineage age in Potamopyrgus antipodarum, a New Zealand snail. *Evolution* **59**(9): 1945-1952.

251. **Nentwig G.** 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**(2): 163-170.

252. **Nichols KM, Miles-Richardson SR, Snyder EM, Giesy JP.** 1999. Effects of exposure to municipal wastewater in situ on the reproductive physiology of the fathead minnow (Pimephales promelas). *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(9): 2001-2012.

253. **Nishikawa J, Mamiya S, Kanayama T, Nishikawa T, Shiraishi F, Horiguchi T.** 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6271-6276.

254. **Oberdorster E.** 2001. Peptide hormones versus steroid hormones: Case studies from snail and turtle populations. In: Environmental Hormones: the Scientific Basis of Endocrine Disruption, Vol. 948, 75-79.

255. **Oberdorster E, McClellan-Green P.** 2000. The neuropeptide APGWamide induces imposer in the mud snail, Ilyanassa obsoleta. *Peptides* **21**(9): 1323-1330.

256. **Oberdorster E, McClellan-Green P.** 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, Ilyanassa obsoleta: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Marine Environmental Research* **54**(3-5): 715-718.

257. **Oberdorster E, Rittschof D, McClellan-Green P.** 1998. Testosterone metabolism in imposex and normal Ilyanassa obsoleta: Comparison of field and TBTA Cl-induced imposex. *Marine Pollution Bulletin* **36**(2): 144-151.

258. **Oberdorster E, Romano J, McClellan-Green P.** 2005. The neuropeptide APGWamide as a penis morphogenic factor (PMF) in gastropod mollusks. *Integrative and Comparative Biology* **45**(1): 28-32.

259. **OECD.** 1997. Detailed Review Paper (DRP) on appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals. (Series on Testing and Assessment). Paris:Organization for Economic Cooperation and Development.

260. **OECD.** 2010. Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. (OECD Series on Testing and Assessment No 121). Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.

261. **Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U.** 2007. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology* **16**(1): 29-43.

262. **Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U.** 2003. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12): 2207-2218.

263. **Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Oetken M, Bachmann J, Lutz I, Kloas W, Ternes TA.** 2006. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gasteropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives* **114**(Suppl. 1): 127-133.

264. **Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B.** 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* **9**(6): 383-397.

265. **Oehlmann J, Stroben E, SchulteOehlmann U, Bauer B, Fioroni P, Markert B.** 1996. Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **354**(5-6): 540-545.

266. **Oetken M, Bachmann J, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J.** 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. In: International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 236, Vol. 236, 1-44.

267. **Oetken M, Nentwig G, Loffler D, Ternes T, Oehlmann J.** 2005. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **49**(3): 353-361.

268. **Ojea J, Pazos AJ, Martinez D, Novoa S, Sanchez JL, Abad M.** 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of Ruditapes decussatus in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture* **238**(1-4): 451-468.

269. **Oplinger RW, Wagner EJ.** 2009. Toxicity of Common Aquaculture Disinfectants to New Zealand Mud Snails and Mud Snail Toxicants to Rainbow Trout Eggs. *North American Journal of Aquaculture* **71**(3): 229-237.

270. **Osada M, Harata M, Kishida M, Kijima A.** 2004a. Molecular cloning and expression analysis of vitellogenin in scallop, Patinopecten yessoensis (Bivalvia, Mollusca). *Molecular Reproduction and Development* **67**(3): 273-281.

271. **Osada M, Takamura T, Sato H, Mori K.** 2003. Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, Patinopecten yessoensis: Control by estradiol-17 beta and the central nervous system. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* **299A**(2): 172-179.

272. **Osada M, Tawarayama H, Mori K.** 2004b. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, Patinopecten yessoensis: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **139**(1): 123-128.

273. **Oughton J.** 1938. *Valvata piscinalis* (Müller) in the great lakes. *Nautilus* **52**(2): 60-62.

274. **Paterson G, Metcalfe CD.** 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (Oryzias latipes). *Chemosphere* **74**(1): 125-130.

275. **Pazos AJ, Sánchez JL, Román G, Luz Pérez-Parallé M, Abad M.** 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of Pecten maximus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **134**(2): 367-380.

276. **Pedersen S, Selck H, Salvito D, Forbes V.** 2009. Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in Potamopyrgus antipodarum. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**(4): 1190-1199.

277. **Pery ARR, Gust M, Vollat B, Mons R, Ramil M, Fink G, Ternes T, Garric J.** 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* **73**(3): 300-304.

278. **Ponder WF.** 1988. *Potamopyrgus antipodarum* - A Molluscan Colonuser of Europe and Australia. *Journal of Molluscan Studies* **54**: 271-285.

279. **Ponder WF, Lindberg DR.** 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: Analysis using morphological characters. *Zoological Journal Of The Linnean Society* **119**(2): 83-265.

280. **Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, Canesi L.** 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **143**(3): 303-315.

281. **Puinean AM, Labadie P, Hill EM, Osada M, Kishida M, Nakao R, Novillo A, Callard IP, Rotchell JM.** 2006. Laboratory exposure to 17[beta]-estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate Mytilus edulis. *Aquatic Toxicology* **79**(4): 376-383.

282. **Quinn B, Gagné F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C.** 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (Dreissena polymorpha). *Aquatic Toxicology* **66**(3): 279-292.

283. **Quinn B, Gagne F, Weber JP, Blaise C.** 2005. Ecotoxicological effects of a semi-submerged municipal dump (Castle harbour, Bermuda) on the Calico scallop Argopecten gibbus. *Marine Pollution Bulletin* **51**(5-7): 534-544.

284. **Quinn JM, Steele GL, Hickey CW, Vickers ML.** 1994. Upper Thermal Tolerances of 12 New-Zealand Stream Invertebrate Species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **28**(4): 391-397.

285. **Ram JL, Crawford GW, Walker JU, Mojares JJ, Patel N, Fong PP, Kyozuka K.** 1993. Spawning in the Zebra Mussel (Dreissena-Polymorpha) - Activation by Internal or External Application of Serotonin. *Journal of Experimental Zoology* **265**(5): 587-598.

286. **Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, Wathen JB, Snyder BD, Pitt JL, Perez-Hurtado P, Dobbins LL, Brooks BW, Chambliss CK.** 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2587-2597.

287. **Rank J, Lehtonen KK, Strand J, Laursen M.** 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (Mytilus edulis) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology* **84**(1): 50-61.

288. **Readman JW, Albanis TA, Barcelo D, Galassi S, Tronczynski J, Gabrielides GP.** 1997. Fungicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin* **34**(4): 259-263.

289. **Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Machella N, Bocchetti R, Benedetti M, Piva F.** 2006. Use of the land snail Helix aspersa as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. *Environmental Health Perspectives* **114**(1): 63-69.

290. **Reishenriques MA, Coimbra J.** 1990. Variations in the Levels of Progesterone in Mytilus-Edulis During the Annual Reproductive-Cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **95**(3): 343-348.

291. **Rittschof D, McClellan-Green P.** 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine Pollution Bulletin* **50**(4): 369-373.

292. **Rittschof D, Sawardecker P, Petry C.** 2002. Chemical mediation of egg capsule deposition by mud snails. *Journal of Chemical Ecology* **28**(11): 2257-2269.

293. **Robson GC.** 1926. Parthenogenesis in the Mollusc *Paludestrina jenkinsi* - Part I. *Journal of Experimental Biology* **1**: 65-78.

294. **Roepke TA, Snyder MJ, Cherr GN.** 2005. Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology* **71**(2): 155-173.

295. **Ronis MJJ, Mason AZ.** 1996. The metabolism of testosterone by the periwinkle (Littorina littorea) in vitro and in vivo: Effects of tributyl tin. *Marine Environmental Research* **42**(1-4): 161-166.

296. **Rotchell JM, Ostrander GK.** 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* **6**(5): 453-495.

297. **Roth G.** 1987. Zur Verbreitung und Biologie von *Potamopyrgus jenkinsi* (E. A. Smith, 1889) i Rhein-Einzugsgebiet (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Archiv für Hydrobiologia* **1**: 49-68.

298. **Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP.** 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1559-1565.

299. **Routledge EJ, Sumpter JP.** 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(3): 241-248.

300. **Russel-Hunter W.** 1961. Life cycles of four freshwater snails in limited populations in Loch Lomond with discussion of intraspecific variation. *Proceedings of the zoological society of London* **137**: 135-170.

301. **Sanchez-Arguello P, Fernandez C, Tarazona JV.** 2009. Assessing the effects of fluoxetine on Physa acuta (Gastropoda, Pulmonata) and Chironomus riparius (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. *Science of the Total Environment* **407**(6): 1937-1946.

302. **Sanderson JT.** 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences* **94**(1): 3-21.

303. **Sandor T, Mehdi AE.** 1979. Steroids and Evolution. In: Hormones and Evolution, (J.E.W. B, ed). New York:Academic Press, 1-72.

304. **Santos MM, Castro LFC, Vieira MN, Micael J, Morabito R, Massanisso P, Reis-Henriques MA.** 2005. New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk Nucella lapillus. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **141**(1): 101-109.

305. **Santos MM, Vieira N, Santos AM.** 2000. Imposex in the dogwhelk Nucella lapillus (L.) along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin* **40**(7): 643-646.

306. **Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerman M.** 1993. In-Vivo Evaluation of 5-Hydroxytryptamine Stimulation of the Testes in the Fiddler-Crab, Uca-Pugilator - a Presumed Action on the Neuroendocrine

System. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **106**(2): 321-325.

307. **Schmitt C, Balaam J, Leonards P, Brix R, Streck G, Tuikka A, Bervoets L, Brack W, van Hattum B, Meire P, de Deckere E.** 2010a. Characterizing field sediments from three European river basins with special emphasis on endocrine effects - A recommendation for Potamopyrgus antipodarum as test organism. *Chemosphere* **80**(1): 13-19.
308. **Schmitt C, Oetken M, Dittberner O, Wagner M, Oehlmann J.** 2008. Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates Potamopyrgus antipodarum and Lumbriculus variegatus. *Environmental Pollution* **152**(2): 322-329.
309. **Schmitt C, Vogt C, Van Ballaer B, Brix R, Suetens A, Schmitt-Jansen M, de Deckere E.** 2010b. *In situ* experiments with *Potamopyrgus antipodarum* - A novel tool for real life exposure assessment in freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **In press**.
310. **Schreiber ESG, Glaister A, Quinn GP, Lake PS.** 1998. Life history and population dynamics of the exotic snail Potamopyrgus antipodarum (Prosobranchia : Hydrobiidae) in Lake Purrumbete, Victoria, Australia. *Marine and Freshwater Research* **49**(1): 73-78.
311. **Schulte-Oehlmann U, Bettin C, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E.** 1995. Marisa Cornuarietis (Gastropoda, Prosobranchia) - a Potential Tbt Bioindicator for Fresh-Water Environments. *Ecotoxicology* **4**(6): 372-384.
312. **Serafinski W, Strzelec M, Czekaj D.** 1993 -1994. Changes in the freshwater snail fauna in an over-industrialized aera in Poland. *Walkerana* **7**(17-18).
313. **Serdar S, Lok A.** 2009. Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet shell clam Tapes decussatus, Linnaeus 1758 in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. *Aquaculture* **293**(1-2): 81-88.
314. **Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP.** 1995. Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental Health Perspectives* **103**(12): 1136-1143.
315. **Sheldon LS, Hites RA.** 1978. Organic compounds in the Delaware River. *Environmental Science and Technology* **12**(10): 1188-1194.
316. **Siah A, Pellerin J, Benosman A, Gagne JP, Amiard JC.** 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam Mya arenaria. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* **132**(2): 499-511.
317. **Smit AB, Van Kesteren RE, Li KW, Van Minnen J, Spijker S, Van Heerikhuizen H, Geraerts WPM.** 1998. Towards understanding the role of insulin in the brain: Lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Progress in Neurobiology* **54**(1): 35-54.
318. **Smith BS.** 1971. Sexuality in the american mud snail, *Nassarius obsoletus* say. *Proc malac Soc Lond* **39**: 377-378.
319. **Smith EM, Chu SG, Paterson G, Metcalfe CD, Wilson JY.** 2010. Cross-species comparison of fluoxetine metabolism with fish liver microsomes. *Chemosphere* **79**(1): 26-32.

320. **Sole M, Morcillo Y, Porte C.** 2000. Stress-protein response in tributyltin-exposed clams. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **64**(6): 852-858.

321. **Sonnenschein C, Soto AM.** 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **65**(1-6): 143-150.

322. **Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C.** 1991. Para-Nonyl-Phenol - an Estrogenic Xenobiotic Released from Modified Polystyrene. *Environmental Health Perspectives* **92**: 167-173.

323. **Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO.** 1995. The E-Screen Assay as a Tool to Identify Estrogens - an Update on Estrogenic Environmental-Pollutants. *Environmental Health Perspectives* **103**: 113-122.

324. **Sperry TS, Thomas P.** 1999. Identification of two nuclear androgen receptors in kelp bass (Paralabrax clathratus) and their binding affinities for xenobiotics: Comparison with Atlantic croaker (Micropogonias undulatus) androgen receptors. *Biology of Reproduction* **61**(4): 1152-1161.

325. **Spooner N, Gibbs PE, Bryan GW, Goad LJ.** 1991. The Effect of Tributyltin Upon Steroid Titers in the Female Dogwhelk, Nucella-Lapillus, and the Development of Imposex. *Marine Environmental Research* **32**(1-4): 37-49.

326. **Stadler T, Frye M, Neiman M, Lively CM.** 2005. Mitochondrial haplotypes and the New Zealand origin of clonal European Potamopyrgus, an invasive aquatic snail. *Molecular Ecology* **14**(8): 2465-2473.

327. **Stange D, Horres R, Oehlmann J.** 2009. The gene expression of the Potamopyrgus antipodarum estrogen receptor under estrogenic exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **154**(1): S34-S34.

328. **Stanton MG.** 1968. Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry* **22**(1): 27-34.

329. **Stefano GB, Cadet P, Mantione K, Cho JJ, Jones D, Zhu W.** 2003. Estrogen signaling at the cell surface coupled to nitric oxide release in Mytilus edulis nervous system. *Endocrinology* **144**(4): 1234-1240.

330. **Sternberg RM, Gooding MP, Hotchkiss AK, LeBlanc GA.** 2010. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* **19**(1): 4-23.

331. **Sternberg RM, Hotchkiss AK, LeBlanc GA.** 2008a. The contribution of steroidal androgens and estrogens to reproductive maturation of the eastern mud snail Ilyanassa obsoleta. *General and Comparative Endocrinology* **156**(1): 15-26.

332. **Sternberg RM, Hotchkiss AK, Leblanc GA.** 2008b. Synchronized expression of retinoid X receptor mRNA with reproductive tract recrudescence in an imposex-susceptible mollusc. *Environmental Science & Technology* **42**: 1345-1351.

333. **Straw J, Rittschof D.** 2004. Responses of mud snails from low and high imposex sites to sex pheromones. *Marine Pollution Bulletin* **48**(11-12): 1048-1054.

334. **Strong EE, Gargominy O, Ponder WF, Bouchet P.** 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* **595**: 149-166.

335. **Strott CA.** 1996. Steroid sulfotransferases. *Endocrine reviews* **17**(6): 670-697.

336. **Sumpter JP, Jobling S.** 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives* **103**: 173-178.

337. **Swan SH, Elkin EP, Fenster L.** 2000. The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental Health Perspectives* **108**(10): 961-966.

338. **Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, Wang C, Brazil C, Overstreet JW.** 2003. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environmental Health Perspectives* **111**(12): 1478-1484.

339. **Takahashi S, Mukai H, Tanabe S, Sakayama K, Miyazaki T, Masuno H.** 1999. Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environmental Pollution* **106**(2): 213-218.

340. **Takayanagi H, Takeda N.** 1985. Hormonal control of gamatogenesis in the terrestrial snai, *Euhadra peliomphala*. *Development Growth and Differenciation* **27**(6): 689-700.

341. **Takeda N.** 1979. Induction of egg-laying by steroids hormones in slugs. *Comparative Biochemistry and Physiology* **62**(A): 273-278.

342. **Takeda N.** 1983. Endocrine regulation of reproduction in the snail *Euhadra peliomphala*.

343. **Tas S, Lauwerys R, Lison D.** 1996. Occupational hazards for the male reproductive system. *Critical Reviews in Toxicology* **26**(3): 261-307.

344. **Ternes TA.** 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* **32**(11): 3245-3260.

345. **Thornton JW, Need E, Crews D.** 2003. Resurrecting the ancestral steroid receptor: Ancient origin of estrogen signaling. *Science* **301**(5640): 1714-1717.

346. **Tillitt DE, Kubiak TJ, Ankley GT, Giesy JP.** 1993. Dioxin-Like Toxic Potency in Forsters Tern Eggs from Green Bay, Lake-Michigan, North-America. *Chemosphere* **26**(11): 2079-2084.

347. **Tillmann M, Schulte-Oehlmann U, Duft M, Markert B, Oehlmann J.** 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* **10**(6): 373-388.

348. **Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP.** 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* **28**(4): 319-361.

349. **Uhler GC, Huminski PT, Les FT, Fong PP.** 2000. Cilia-driven rotational behavior in gastropod (Physa elliptica) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Journal of Experimental Zoology* **286**(4): 414-421.

350. **van den Berg MS, Coops H, Noordhuis R, van Schie J, Simons J.** 1997. Macroinvertebrate communities in relation to submerged vegetation in two *Chara*-dominated lakes. *Hydrobiologia* **342-343**: 143-150.

351. **Varaksina GS, Varaksin AA.** 1988. Localization of 17-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Gonads of the Common Mussels Patinopecten-Yessoensis Jay and Crenomytilus-Grayanus Dunker. *Arkhiv Anatomii Gistologii i Embriologii* **95**(11): 79-82.

352. **Varaksina GS, Varaksin AA.** 1991. Effect of estradiol, progesterone and testosterone on oogenesis of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Biologiya Morya-Marine Biology* **3**: 61-38.

353. **Varaksina GS, Varaksin AA, Maslennikova LA.** 1992. Role of Sex Steroid-Hormones in Spermatogenesis of the Scallop Mizuhopecten-Yessoensis. *Biologiya Morya-Marine Biology*(1-2): 77-83.

354. **Wagner M, Oehlmann J.** 2009. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environmental Science and Pollution Research* **16**(3): 278-286.

355. **Wallace C.** 1992. Parthenogenesis, Sex and Chromosomes in Potamopyrgus. *Journal of Molluscan Studies* **58**: 93-107.

356. **Wang C, Croll RP.** 2004. Effects of sex steroids on gonadal development and gender determination in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* **238**(1-4): 483-498.

357. **Wang CD, Croll RP.** 2003. Effects of sex steroids on in vitro gamete release in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Invertebrate Reproduction & Development* **44**(2-3): 89-100.

358. **Wang CD, Croll RP.** 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Aquaculture* **256**(1-4): 423-432.

359. **Watton AJ, Hawkes HA.** 1984. The acute toxicity of ammonia and copper to the gastropod *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith). *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological* **36**(1): 17-29.

360. **Watton AJ, Hawkes HA.** 1984. Studies on the effects of sewage effluent on gastropod populations in experimental streams. *Water Research* **18**(10): 1235-1247.

361. **Wester PW, van der Ven LTM, Vethaak AD, Grinwis GCM, Vos JG.** 2002. Aquatic toxicology:: opportunities for enhancement through histopathology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**(3-4): 289-295.

362. **Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR, Hornsby PP, Herbst AL.** 1995. Fertility in Men Exposed Prenatally to Diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine* **332**(21): 1411-1416.

363. **Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE.** 1997. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives* **105**(1): 102-107.

364. **Winterbourn M.** 1970. The New Zealand species of *Potamopyrgus* (Gasteropoda: Hydrobiidae). *Malacologia* **10**(2): 283-321.

365. **Wong CI, Kelce WR, Sar M, Wilson EM.** 1995. Androgen Receptor Antagonist Versus Agonist Activities of the Fungicide Vinclozolin Relative to Hydroxyflutamide. *Journal of Biological Chemistry* **270**(34): 19998-20003.

366. **Wu TH, Rainwater TR, Platt SG, McMurry ST, Anderson TA.** 2000. Organochlorine contaminants in Morelet's crocodile (Crocodylus moreletii) eggs from Belize. *Chemosphere* **40**(6): 671-678.

367. **Young MR.** 1975. The life cycle of six species of freshwater invertebrate molluscs in the Worcester-Birmingham canal. *Proceedings of the malacological society of London* **41**: 533-548.

368. **Zanette J, Goldstone JV, Bainy ACD, Stegeman JJ.** 2010. Identification of CYP genes in Mytilus (mussel) and Crassostrea (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. *Marine Environmental Research* **69**(Supplement 1): S1-S3.

369. **Zaranko DT, Farara DG, Thompson FG.** 1997. Another exotic mollusc in the Laurentian Great Lakes: The New Zealand native Potamopyrgus antipodarum (Gray 1843) (Gastropoda, Hydrobiidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**(4): 809-814.

370. **Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP.** 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology* **78**: S109-S116.

ANNEXES

Supplementary data de la Publication 4

Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor

M. Gust[a,b,*], J. Garric[a], L. Giamberini[d], R. Mons[a], K. Abbaci[a], F. Garnier[c], T. Buronfosse[c]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[b] AgroPariTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris, France.

[c] Université de Lyon. Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France.

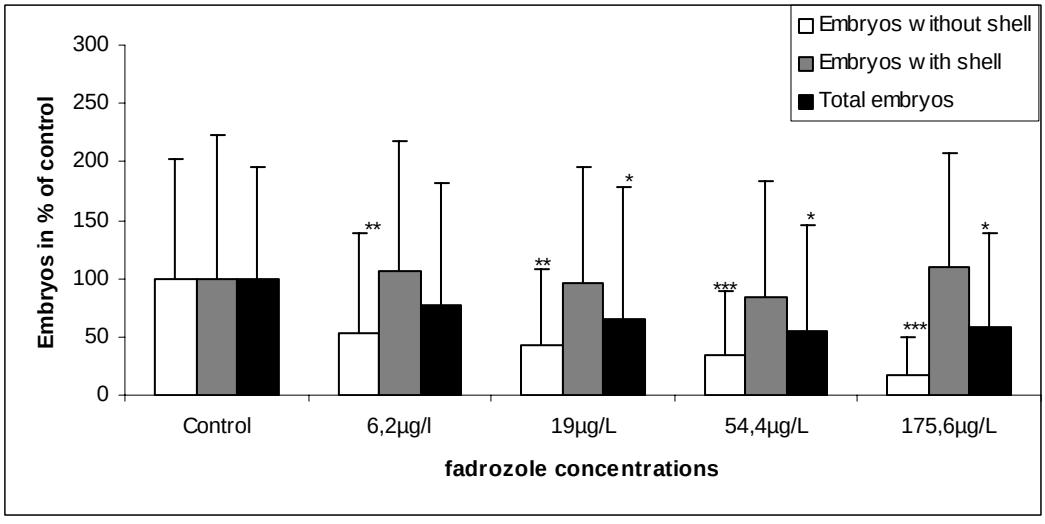
[d] Laboratoire des interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, campus Bridoux 57000 Metz, France.

* Corresponding author

Summary :

Figure S1: : Reproductive effects of fadrozole on *P. antipodarum* (mean value and standard deviation) as a function of fadrozole measured concentrations on day 28 of the first experiment.* indicates a significant difference from the control (* if $P<0.05$, ** if $P<0.01$ and *** if $P<0.001$, Mann-Withney U-tests or Dunnett-t test).

Figure S1



Supplementary data de la Publication 7

Supplementary information for Oakes et al. (IEAM 2009-076)

Description of the algae growth inhibition test (OECD 201) and the *Daphnia* reproduction test (OECD 211) used to investigate the toxicity of fluoxetine to aquatic organisms.

Material and Methods:

OECD Test No. 201: Algae, Growth Inhibition Test

The algal growth inhibition test was conducted according to OECD Guideline 201 at the German Federal Environment Agency (UBA). The objective of the study was to determine the toxic effects of fluoxetine on the growth of planktonic fresh water algae. For testing the inhibition of algal growth, exponentially growing algal cells were cultivated over several generations and exposed over a period of 72 hours to determine algal growth. This was accomplished by extinction measurements at a wave length of 578 nm and a light path of 1 cm. To establish the algal cell number from the measured extinction, a calibration curve reflecting the experimentally derived correlation between extinction and algal cell number was used.

The following parameters were recorded during the test:

- The algal cell number after a period of 0, 24, 48 and 72 h, determined via the measured extinction;
- The extinction of the blank sample series;
- The physical parameters like pH value, light intensity and temperature.

The planktonic freshwater alga *Desmodesmus subspicatus*, (Chodat, stock 86.81) was used as test organism.

In accordance with OECD Guideline 201, the toxicity study on the unicellular green alga *Desmodesmus subspicatus* was valid and the algal stock used in this study was suitable because:

- The growth rate in the control solution reached a value of 1.32 d^{-1} within 72 h and
- The coefficient of variation of the daily growth rates in the control solution ranged during the test (days 0-1, 1-2, and 2-3) from 10 to 13 % thus not exceeding the limit value of 35 % and
- The coefficient of variation of the growth rates in the replicates of the control solution during the entire test was 0.85 and therefore not exceeding the limit value of 7 %.

The temperature and pH values required by OECD Guideline 201 were met during the test. The study was performed in compliance with the principles of "Good Laboratory Practice".

OECD Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test

The *Daphnia* reproduction test was conducted according to OECD 211 at the German Federal Environment Agency (UBA). The study was based on exposing the test organism *Daphnia magna* to the test solutions and observing how many juveniles were produced by adult organisms. The primary objective was to assess the effect of fluoxetine on the reproductive output of *D. magna* over an exposure time of 21 days. At the start of the test, the animals were less than 24 hours old and were exposed to the test chemical in a range of concentrations. The reproductive output of the organisms exposed to the test substance is compared to the output of the controls.

The following parameters were recorded during the test:

- The number of juveniles produced by surviving test organisms until the end of the test;
- The mortality of the parent animals during the exposure period;
- The physical parameters like pH value, temperature and oxygen content.

The water flea *Daphnia magna* STRAUS (clone "Klon 5") was used as test organism.

In accordance to OECD Guideline 211, the toxicity study on the reproduction of *Daphnia magna* was valid because the following performance criteria were met in the controls:

- There was no mortality of the parent animals in the controls therefore not exceeding the limit value of 20%;
- The mean number of live offspring produced by surviving parent animals (able to swim) at the end of test period was 83.2 thus exceeding the limit of 60.

The study was performed in compliance with the principles of "Good Laboratory Practice".

Statistical analyses

The PC program UBA ToxTool, version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Germany) was used for statistical analyses of both tests.

The determination of the concentration-response function and the calculation of the EC_X values after 72 h in the algae growth inhibition test were performed with Probit analysis using linear maximum likelihood regression. The coefficient of determination (r^2) was 0.92 (biomass) and hence gives an adequate proportion of variance explained by the concentration-response curve. Cochran's test was chosen for variance homogeneity testing. To determine threshold concentrations (No Observed Effect Concentration, NOEC, and Lowest Observed Effect Concentration, LOEC), a one-sided Welch-*t* test with Bonferroni adjustment for non-homogeneous variances was applied. The significance level for all tests was set at $p < 0.05$

Analytical measurements

Solid phase extraction

Analytical measurements were conducted at the German Federal Institute for Hydrology (BfG). For solid phase extraction (SPE) of water samples, 100 mL of water was spiked with 100 ng fluoxetine-d_5 as a surrogate standard. Oasis HLB (500 mg, 6 mL) SPE cartridges from Waters (Milford/MA, USA) were conditioned with 15 mL methanol followed by 15 mL HPLC-water. The water samples were passed through the pre-conditioned SPE cartridges at a flow rate of approximately 10 mL min^{-1}. Subsequently, the solid-phase material was dried completely with a commercially available drying device (Grenzahl- Wyhlen, Germany) by a continuous nitrogen stream for 1 h. The dried SPE cartridges were wrapped in aluminum foil and stored at 4°C up to 4 weeks until further analysis.

HPLC-MS/MS

The HPLC system consisted of a G1313A autosampler, a G1311A quatenary HPLC pump, a G1379A degasser (all Agilent, Waldbronn, Germany) a CTO-10A column oven and SCL-10A system controller (all Shimadzu, Duisburg, Germany). The detection was performed on an API 4000 mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Parameters such as declustering potential (DP), collision energy (CP) and cell exit potential (CXP) were optimised in the auto-tuning program of the *Analyst* 1.4.2 software. For all compounds two Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions were monitored for identification and quantification of the analytes. Table 1 gives an overview of MS parameters and limits of quantification (LOQ) for the analytes.

Table 1: MS specific parameters of all analytes including limit of quantification (LOQ) and internal standard used for the quantification (IS)

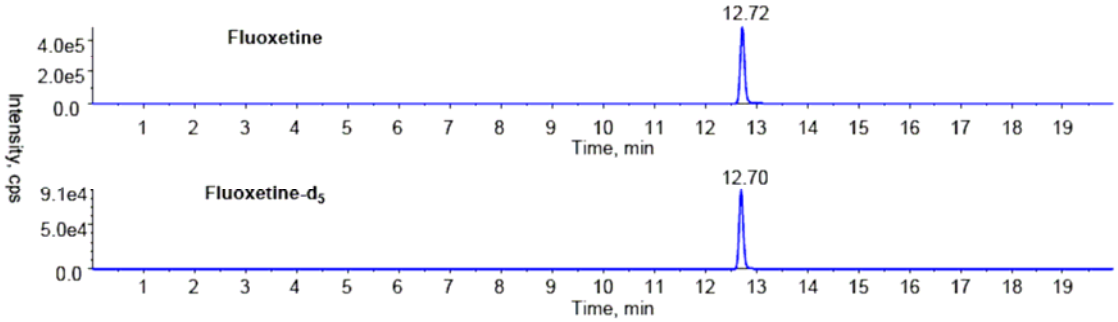
	RT [sec]	precursor ion [amu]	product ion [amu]	dwell time [msec]	collision energy [eV]	declustering potential [V]	LOQ [ng/mL]
Fluoxetine	12,73	310	44	120	30	45	1
		310	148	120	14	44	
Fluoxetine - d5	12,70	315	44	120	30	46	
		315	153	120	13	43	

Fluoxetine was eluted from the SPE cartridge by using four times 2 mL methanol/MTBE (95/5, *v/v*). The extracts were evaporated to dryness by a gentle nitrogen stream and reconstituted in 1 mL acetonitrile.

Fluoxetine was separated using a Luna C18(2) column (2 mm i.d., length 150 mm, particle size 3 µm) and a SecurityGuard (Phenomenex, Torrance, CA, USA) at 25 ± 1 °C. The flow rate was 0.2 mL/min. The HPLC gradient was established by mixing two mobile phases: phase A: 10 mM ammonia acetate solution and phase B: pure acetonitrile. Chromatographic separation was achieved with the following gradient: 0-1 min: 5% B; 1 min to 8 min: 5% to 100% B; 8-14 min: 100% B; 14 min to 15 min: 100% to 5% B; 15-20 min: 5% B. Ten µL of each sample were injected.

The ionization was performed in Heated Nebulizer (APCI) positive mode. Operational parameters of the API 4000 for were: collision gas (CAD), medium; nebuliser current (NC) 5 µA; curtain gas (CUR), 15 psi; ion source gas 1 (GS1) 60 psi; source temperature (TEM), 300°C; entrance potential (EP), 10V, collision cell exit potential (CXP) 10 V.

Figure 1: Chromatograms and retention times of fluoxetine and the fluoxetine-d_5 standard (100 ng mL^{-1}).



Results

Analytical measurements:

The following concentrations were detected via the analytical measurements performed during the OECD 201 and OECD 211.

Table 2. Mean measured concentrations within the OECD 201.

Fluoxetine (µg L^{-1})	
$C_{i\ nominal}$	$C_{i\ mean\ measured}$
50	45.1
25	21.1
16	13.9
12	10.4
8	6.7
4	2.7
2	1
1	0.6
0	0

With C_i as concentration in sample i

Table 3. Mean measured concentrations within the OECD 211.

Fluoxetine (µg L^{-1})	
$C_{i\ nominal}$	$C_{i\ mean\ measured}$
1280	1198
640	602
320	294
160	135
80	60
40	27
20	12
10	6
0	0

With C_i as concentration in sample i

Because mean measured concentrations were below 80% in some samples of both tests the mean measured concentration was used for the effect analysis according to the guidelines.

Results OECD 201

The most relevant endpoint detected within the algal growth inhibition test was the biomass integral of *D. subspicatus*. Biomass integral was calculated based on algal cell numbers as

recommended in OECD 201 (2001). Presented fluoxetine concentrations are given as mean measured concentrations. The results of the statistical analysis for calculating the threshold concentration (NOEC) for the biomass integral at 72 h with the algal species *D. subspicatus* are shown in Table 2.

Table 4: Statistical characteristics of the biomass integral obtained from the algal growth inhibition test after 72 h exposure.

Fluoxetine [µg L^{-1}]	**Mean**	**Min**	**Max**	**n**	**s**	**95%l**	**95%u**
Control	82.788	80.965	86.935	6	2.2562	80.414	85.163
0.6	80.025	79.650	80.395	3	0.3725	79.062	80.988
1.0	74.573	74.110	74.855	3	0.4044	73.528	75.619
2.7	26.017	24.650	27.400	3	1.3751	22.461	29.572
6.7	5.433	5.000	5.800	3	0.4041	4.388	6.478
10.4	5.283	4.800	5.700	3	0.4537	4.110	6.456
13.9	3.917	3.600	4.300	3	0.3547	2.999	4.834
21.1	2.383	2.150	2.500	3	0.2021	1.861	2.906
45.1	2.300	1.500	2.800	3	0.7000	0.490	4.110

With mean: arithmetic mean; Min: minimum value. Max: maximum value; n: sample size; s: standard deviation; 95%l, 95%u: lower and upper 95%-confidence limits, respectively.

The determination of the concentration-response function and the calculation of the EC_X values after 72 h in the algae growth inhibition test with *D subspicatus* showed the following results (Figure 2).

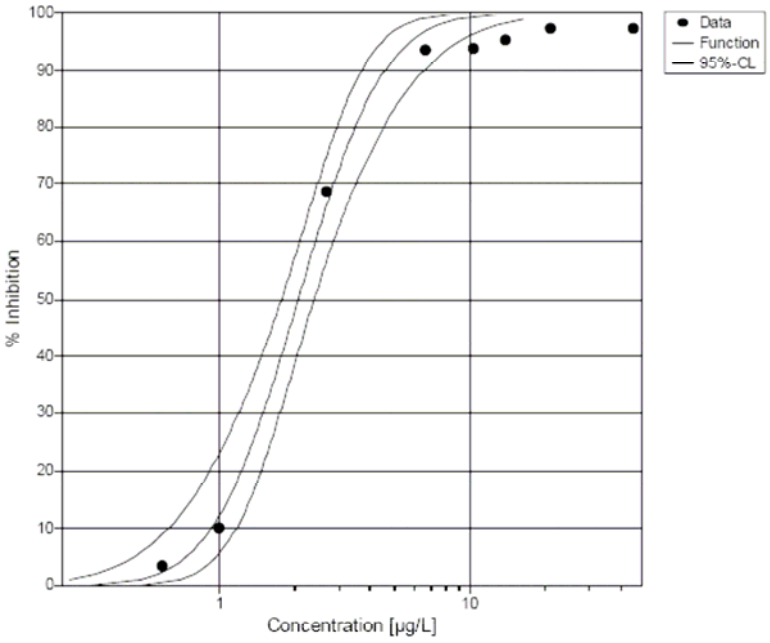


Fig 2: Concentration-effect curve showing the influence of fluoxetine on the biomass integral of *D. subspicatus* as observed after 72 h.

The median effect concentration (EC50) was calculated to be 2.1 (1.8-2.4) µg L^{-1} with lower and upper 95% confidence limits given in parentheses.

The **L**owest **O**bserved **E**ffect **C**oncentration (LOEC) was ≤ 0.6 µg L^{-1} and the **N**o **O**bserved **E**ffect **C**oncentration (NOEC) was <0.6 µg L^{-1} and thus below the lowest tested concentration of 0.6 µg L^{-1} (which showed significant effects).

Results OECD 211

The results of the statistical analysis for calculating the threshold concentration (NOEC) for the mean cumulative offspring per survivor (relevant as ecological endpoint for population) at day 21 with the crustacean species *D. magna* are shown in Table 4. Presented fluoxetine concentrations are given as mean measured concentrations.

Table 5: Statistical characteristics of mean cumulative offspring per survivor at day 21 obtained from the daphnia reproduction test.

Fluoxetine [µg L^{-1}]	Mean	Min	Max	n	s	95%l	95%u
Control	83.200 -	66.000	107.000	10	13.3233	73.661	92.739
6.0	83.333 -	75.000	93.000	9	6.4031	78.407	88.260
12.0	78.778 -	70.000	89.000	9	6.8333	73.520	84.036
27.0	76.222 -	61.000	91.000	9	8.8144	69.440	83.004
60.0	87.100 -	60.000	138.000	10	22.9320	70.682	103.518
135.0	38.000 +	8.000	62.000	8	18.4158	22.584	53.416
294.0	0.833 +	0.000	5.000	6	2.0412	-1.315	2.982
1198.0	nd	nd	nd	0	nd		

With mean: arithmetic mean ; Min: minimum value. Max: maximum value; n: sample size (number of surviving parent animals); s: standard deviation; 95%l. 95%u: lower. upper 95%-confidence limits nd = not determined. +: Significant difference to control (one-sided Welch t-test with Bonferroni correction, $p < 0.05$).

The LOEC and the NOEC derived in the *Daphnia magna* reproduction test were 135 µg L^{-1} and 60 µg L^{-1}, respectively.

References:

OECD. Organisation for Economic Co-Operation and Development. 2001. Guideline for the testing of chemicals No. 201. Freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test. Paris, France: OECD.

OECD. Organisation for Economic Co-Operation and Development. 2006. Guideline for the testing of chemicals No. 201. Freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test. Paris, France: OECD.

OECD. Organisation for Economic Co-Operation and Development. 1998. Guideline for the testing of chemicals No. 211. *Daphnia magna* reproduction test. Paris, France: OECD.

Supplementary data de la Publication 9

In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail _Potamopyrgus antipodarum_ (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges

Marion Gust[a,b], Thierry Buronfosse[c], Olivier Geffard[a], Raphael Mons[a], Herve Queau[a], Jacques Mouthon[d], Jeanne Garric[a*]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[b] AgroPariTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris

[c] Université de Lyon. Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France.

[d] Cemagref, UR MALY, DYNAM, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France**.**

*Corresponding author

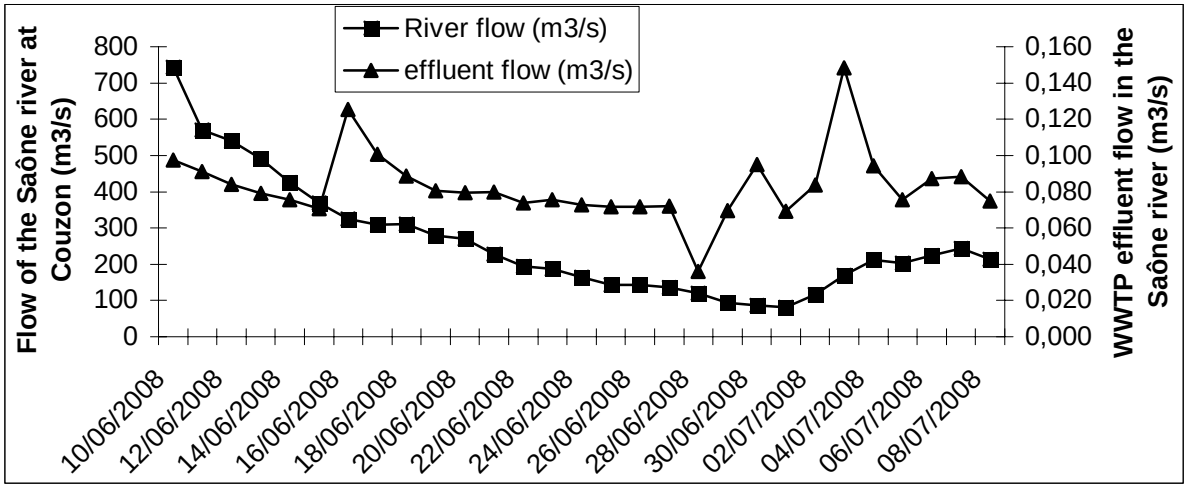
Summary:

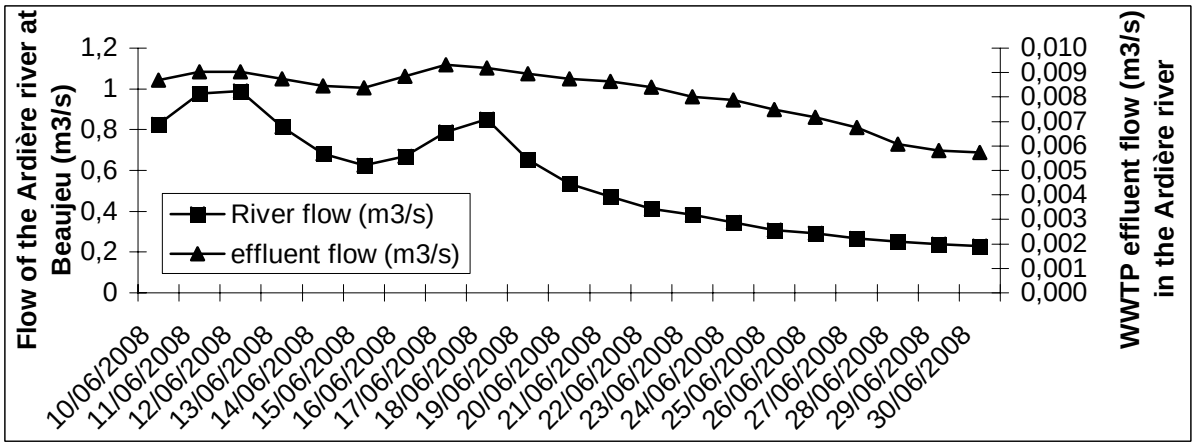
Figure S1: River and effluent flows during the exposure.

Table S1: Rivers and WWTP main characteristics.

Table S2: Temperature and conductivity characteristics of the exposure sites during the exposure

Figure S1: River and effluent flows during the exposure. A. Saone river and Fontaine WWTP. B. Ardiere river and Beaujeu WWTP. C. Bourbre river and Bourgoin-Jailleu WWTP





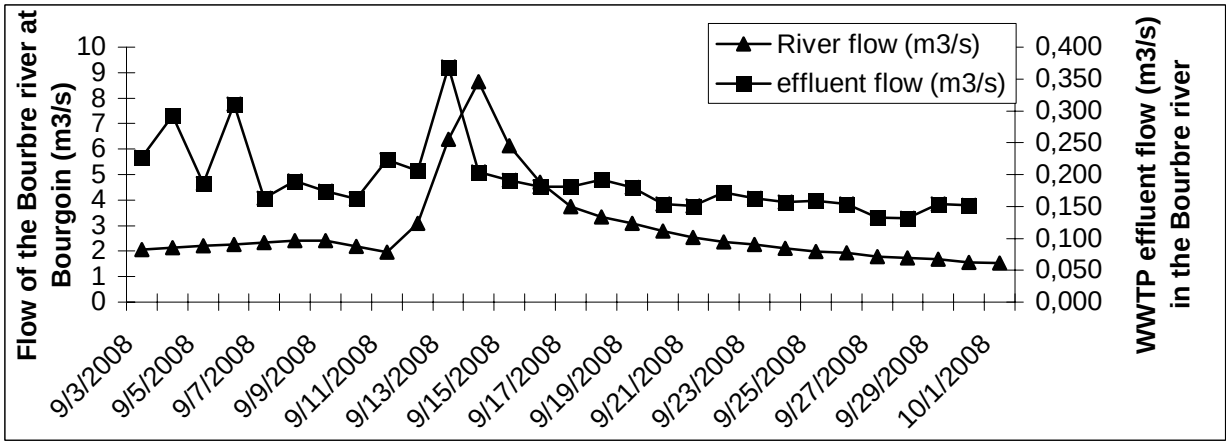


Table S1: Rivers and WWTP main characteristics.

	Mean measured river flow during the exposition (m3/s)	**Watershed km²**	**Equivalent inhabitant of the WWTP**	**Type of treatment[a]**	**Outgoing suspended matter (kg/j)[1]**	**Outgoing oxidizable matter (kg/j)[1]**	**Outgoing total phosphorus (kg/j)[1]**	**Outgoing reduced nitrogen (kg/j)[1]**	**Outgoing metals (kg/j)[1]**	**Mean measured effluent flow during the exposition (m3/s))**	**Mean measured relative amount of effluent in the Rivers**
Saone river	232[b]	30 000	30 000	Biological	189.7	278	7.8	165	0	0.083 (0.019)[c]	0.04 (0.02)
Ardiere river	0.553[d]	220	7 900	Biological, nitrification, denitrification	4	6.4	1.5	1.61	0	0.008 (0.001)[e]	1.7 (0.6)
Bourbre river	2.873[2]	750	78 000	Biological	343	473.8	9	186.9	0	0.190 (0.054)[f]	7.5 (2.8)

[a] Data in 2007 from Rhône Corse Mediterranean Water agency (http://sierm.eaurmc.fr/rejets-collectivites/)

[b] Compagnie Nationale du Rhône

[c] C. Billat, Grand Lyon

[d] Banque Hydro (http://www.hydro.eaufrance.fr/)

[e] PY Bigot, Lyonnaise des Eaux

[f] S. Faure, Lyonnaise des Eaux

Table S2: Temperature and conductivity characteristics of the exposure sites during the exposure. Nb days: number of days.

		Mean temperature (°C)	T. max (°C)	T. min (°C)	Nb days <14°C	Nb days 14-18°C	Nb days 18-22°C	Nb days >22°C	Mean Conductivity (µS/cm)	Difference of conductivity upstream and downstream
Ardière	**Upstream**	15.5	20.5	10.5	5	14	1		113 (5)	24 (3)
	Downstream	15.9	20.9	11.1					137 (16)	
A / Saône	**Upstream**	21.1	26.0	18.0			14	15	481 (14)	3(3)
	Downstream	21.1	27.4	17.7					484 (15)	
Bourbre	**Upstream 1**	14.5	18.6	12.2	12	15			546 (30)	228 (59)
	Upstream 2	14.2	18.4	10.7	14	13				
	Downstream 1	15.3	18.7	12.8	1	26			773 (72)	126 (56)
	B / Downstream 2	15.1	18.6	12.6	5	22			671 (74)	

Supplementary data de la Publication 10

§Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)

M. Gust[a,b,] , T. Buronfosse[c], O. Geffard[a], M. Coquery[d], R. Mons[a], K. Abbaci[a], L. Giamberini[e], J. Garric[a*]

[a] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[b] AgroPariTech ENGREF, 19 avenue du Maine, F 75732 Paris, France.

[c] Université de Lyon. Laboratoire d'endocrinologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, avenue Bourgelat 69280 Marcy l'Etoile, France.

[d] Cemagref, UR MALY, Laboratoire d'analyses physico-chimiques des milieux aquatiques, 3b quai Chauveau 69009 Lyon, France.

[e] Laboratoire des interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146, campus Bridoux 57000 Metz, France.

Summary:

Figure S1: River flows during the exposure.

Figure S2: Temperature at the exposure sites.

Table S1: Conductivity and pH at the exposure sites.

Figure S1: River flows during the exposure.

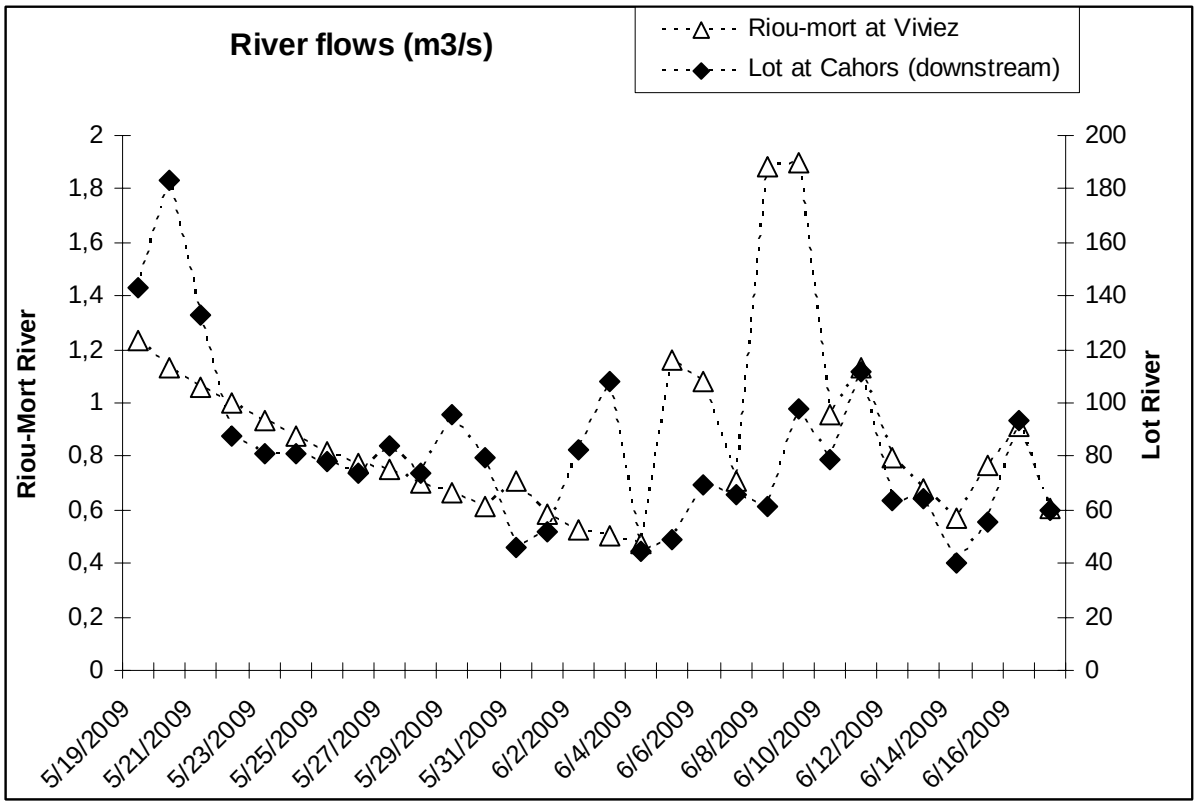


Figure S2: Temperature at the exposure sites.

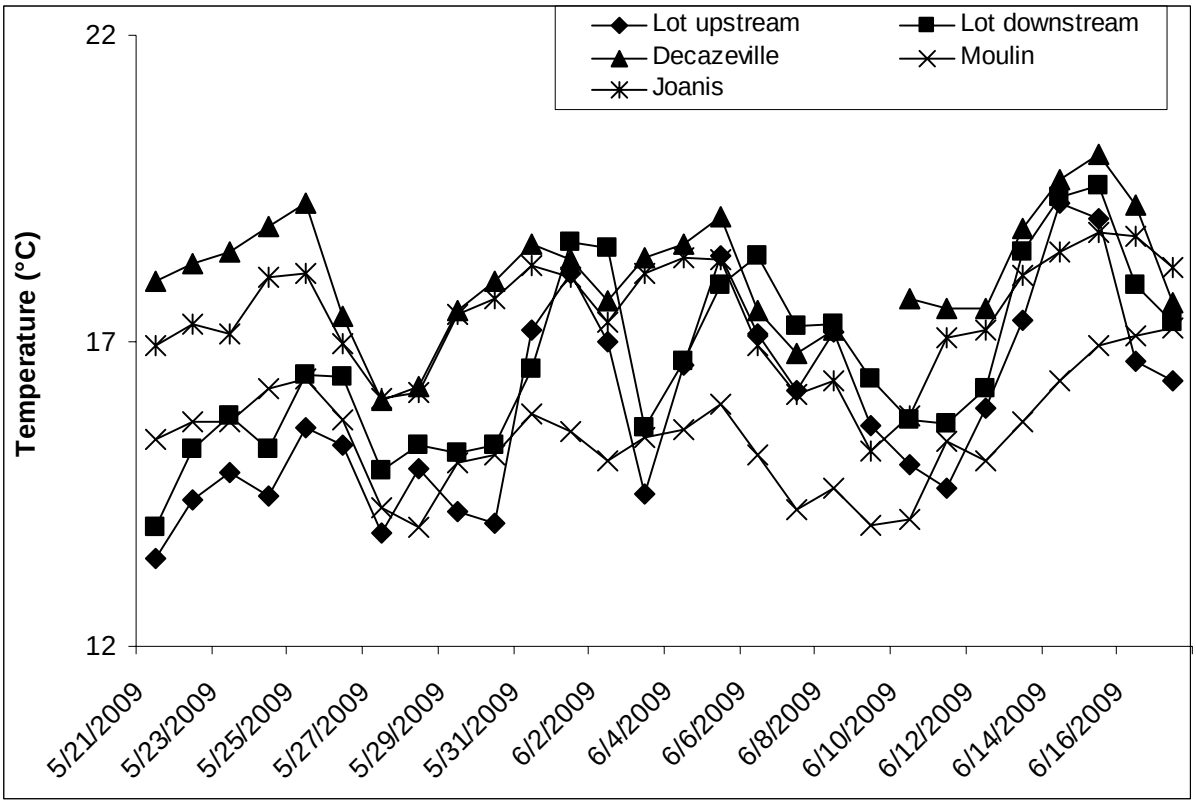


Table S1: Conductivity and pH at the exposure sites.

	Lot upstream		**Lot downstream**		**Decazeville**		**Moulin**		**Joanis**	
	Conductivity	pH	Conductivity	pH	Conductivity	pH	Conductivity	pH	Conductivity	pH
5/ 19/2009	114	8	168	8	1565	8.2	221	8	993	8.2
5/26/2009	145	8.1	199	8.1	799	8.2	208	8.2	925	8.2
6/2/20 09	128	8.2	250	8.2	740	8.2	212	8.2	1387	8
6/9/2009	140	7.8	210	8	1395	8.4	144	8.4	918	8.2

Résumé :

L'effet des perturbateurs endocriniens sur les écosystèmes aquatiques est un sujet d'intérêt majeur en écotoxicologie, mais reste mal évalué sur les invertébrés et notamment les mollusques gastéropodes. Pourtant, ces derniers sont sensibles aux perturbateurs endocriniens, mais les mécanismes rentrant en jeu sont méconnus, du fait du faible niveau de connaissance de leur système endocrinien. Deux espèces d'étude ont été choisies, pour leur grande similitude de traits de vie, mais avec un mode de reproduction différent. Dans ce travail, nous avons développé des outils à différents niveaux d'organisation biologique afin de mieux appréhender les modalités de l'action reprotoxique des polluants. Les différents marqueurs (suivi de reproduction, histopathologie, réserves énergétiques, stéroïdes sexuels, protéines vitelline-like) ont été développés ou adaptés chez nos espèces. Leur variabilité naturelle ou due à des facteurs autres que des polluants (température d'exposition) a été évaluée en partie. Un développement particulier a été réalisé pour les stéroïdes sexuels de type vertébrés, afin de mieux comprendre leur implication dans le contrôle de la reproduction de *P. antipodarum*, et leur possible utilisation en tant que marqueurs de la perturbation endocrinienne. Ces marqueurs ont ensuite été appliqués au laboratoire et sur le terrain. Une méthodologie d'exposition *in situ* a été développée et des expositions à des pollutions diverses (rejet de stations d'épurations, contamination multi-métallique) ont été réalisées pour mieux caractériser la pertinence respective des marqueurs utilisés. Nous avons comparé la sensibilité interspécifique des deux espèces de travail, et tirons quelques recommandation sur l'utilisation de *P. antipodarum* comme modèle OCDE pour l'évaluation des effets reprotoxiques.

Mots-clefs : expositions *in situ*, histologie, niveaux physiologiques, perturbateur endocrinien, *Potamopyrgus antipodarum*, reproduction, statut énergétique, stéroïdes sexuels, *Valvata piscinalis*

Abstract :

A major issue in ecotoxicology is the effect of endocrine disrupting compounds on aquatic ecosystems. However, this issue is not well assessed on invertebrates and particularly gastropods molluscs. They are sensitive to endocrine disrupters although the mechanisms are unknown, due to the lack of knowledge about their endocrine system. Two model species were used, because of similar life history, but different mode of reproduction. We developed tools at different levels of biological organization, in order to better understand the mechanisms of apparition of reproductive disorder. Markers (reproduction, histology, energy status, sex steroids, Vn-like proteins) were developed or adapted in our species. Their natural variability or due to factors other than pollutants (exposure temperature) were assessed. A particular focus was performed on vertebrate-like sex steroids, to better understand their possible role in reproduction control of *P. antipodarum*, and their usefulness as markers of endocrine disruption. These markers were used in laboratory and field exposures. An *in situ* exposure methodology was developed, and exposures to various pollution types (waste water treatment plant effluent, metals) were performed to asses the relevance of the used markers. The interspecific sensitivity of *V. piscinalis* and *P. antipodarum* was compared and recommendations concerning the use of *P. antipodarum* as OECD biotest were made.

Key words: endocrine disruptive compound, energy status, histology, *in situ* exposures, physiological levels, *Potamopyrgus antipodarum*, reproduction, sex steroids, *Valvata piscinalis*