MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DE L'HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

le 18 février 2014

Par

Marion GUST

QUEL INTERET DES GASTEROPODES EN ECOTOXICOLOGIE D'EAU DOUCE ?

Jury composé de :

Rapporteurs :	Jérôme CACHOT	Professeur, Université de Bordeaux
	Catherine MOUNEYRAC	Professeur, Université Catholique de l'Ouest
	Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMAIN	Directrice scientifique, IFREMER
	Alexandre PERY	Chercheur, INERIS
Examinateurs :	Cécile CREN-OLIVE	Chargée de Recherche, CNRS
	Laure GIAMBERINI	Professeur, Université de Lorraine
	Jérôme GUITTON	Professeur, Université de Lyon

En 2005, j'ai contacté Jeanne Garric pour réaliser une Formation Complémentaire Par la Recherche dans son laboratoire. J'étais vétérinaire, devenue IGREF (Ingénieur du Génie Rural des Eaux et des Forêts, devenu Ponts, Eaux et Forêts IPEF depuis), et je souhaitais obtenir un premier poste dans un laboratoire afin de réaliser une thèse (une « vraie », pas ma thèse d'exercice vétérinaire…). Mon objectif était double : obtenir un diplôme reconnu à l'international pour potentiellement travailler à l'étranger, et être spécialiste dans un domaine. L'écotoxicologie m'attirait car cette discipline « inter-disciplinaire » alliait mes compétences de vétérinaire et l'ingénierie environnementale.

Jeanne m'a accueillie et m'a proposé de travailler sur les gastéropodes, modèles qui avaient été récemment introduits au laboratoire. Des mollusques, je ne me souvenais que des sujets de colle en prépa « La moule, un animal fixé ». Le chemin allait être long… A l'époque, le laboratoire était impliqué dans le programme européen ERAPHARM sur l'évaluation du risque environnemental de certains médicaments. Médicaments, vétérinaire, ça me parlait !

Me voilà engagée sur la voie du Master, de la thèse, du Post-doc canadien et maintenant de l'HdR. Après quelques années passées à travailler avec mes escargots, je commence à les connaitre, à les aimer et surtout à cerner leurs limites. Aujourd'hui sur le départ du laboratoire pour aller occuper un poste au ministère de l'écologie à la direction de la recherche en environnement-santé, voici le moment des bilans. Je présente ici ce que je retire de ces années de travail. La demande de Jeanne lorsque je lui ai annoncé mon départ a été « Alors les gastéropodes j'en fais quoi ? ». Je ne peux pas répondre à la question pour quelqu'un d'autre, mais voilà ce que j'en ressors.

REMERCIEMENTS

Benoit, je te dédicace le manuscrit….

Je tiens à remercier (de façon fort originale…) toutes les personnes qui m'ont accompagnées pendant toutes ces années pour réaliser les travaux présentés ici. Merci à Jeanne Garric, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et m'avoir donné la possibilité, notamment de partir une année à Environnement Canada. Merci à François Gagné, de m'avoir reçue dans son laboratoire et pour son amitié et son soutien. Merci à l'équipe technique qui m'a beaucoup aidée : Raph, Alex, Chantale, Marlène, Patrice, Renaud, Khédidja… Merci à tous ceux que j'ai co-encadrés, pour leur bonne humeur et leur volonté : Vivien, Marie, Juliette, Malorie, Amandine, Laurent, Alex, Paul…

Une énorme pensée à mon ancienne voisine de bureau et à son trotteur adoré… Et à tous ceux de l'équipe jaune !!!

Enfin, un grand merci à mes deux monstres, pour me suivre (ils n'ont pas vraiment le choix), et me donner tant de bonheur et de recul.

TABLE DES MATIERES

Introduction **1**

Résumé des travaux **5**

A / Contexte *6*

B / Rappel des travaux de thèse *6*

C / Perturbation de la reproduction par les polluants *8*

D / Effets immunotoxiques *10*

E / Projet scientifique à court terme ..... ***Erreur ! Signet non défini.***

Les Gastéropodes et l'évaluation de l'effet des contaminants **15**

A / De l'effet sur la reproduction à la compréhension de cet effet… ***Erreur ! Signet non défini.***

1. Démarche intégrée 16
   a. Principe 16
   b. Application pratique 19
2. Développement de nouveaux marqueurs de reprotoxicité 21
   a. Voies de signalisation des estrogènes 21
   b. Marqueurs histopathologiques 22
3. Utilisation des marqueurs pour la compréhension des effets 23
   a. Mélange de PE au laboratoire 23
   b. Sur le terrain 29
   c. Conclusions sur l'application de la démarche intégrée au laboratoire et sur le terrain 39
4. Intérêt des gastéropodes pour l'évaluation des effets reprotoxiques 41
   a. Fenêtre d'exposition critique et effets persistants 41
   b. Effets sur les générations suivantes 42
   c. Sensibilité interspécifique 43
   d. Conclusion sur la compréhension des effets reprotoxiques 44

B / Immunotoxicité et polluants *48*

1. Contexte 48
2. Système de défense des mollusques 48
a. Système de réponse au stress 49
b. Système immunitaire 49
3. Marqueurs développés 50
a. Cytométrie de flux 52
b. Immuno-toxicogénomique 53
4. Intérêt de l'étude de la réponse immunitaire 55
a. Corrélation des réponses fonctionnelles et génomiques 55
b. Effluent urbain et réponse immunitaire 56
c. Réponse immunitaire et médicaments 59
5. Conclusions et perspectives 64
a. Caractérisation de la réponse immune chez Lymnaea stagnalis .... **Erreur ! Signet non défini.**
b. Sensibilité toxicologique et lien avec les réponses individuelles... **Erreur ! Signet non défini.**
c. Validité des marqueurs en situations multistress ..... **Erreur ! Signet non défini.**
C / Reproduction et immunité ? 65
D / Conclusion sur l'utilisation des gastéropodes pour la compréhension des mécanismes 65

Les Gastéropodes sont-ils de bons outils d'évaluation de la qualité des Ecosystèmes aquatiques d'eau douce ? 68
A / Evaluation de l'exposition : bioaccumulation 70
1. Au laboratoire 70
a. Fluoxétine 70
b. BPA 73
c. Mélanges de BPA, tOP et tNP 77
d. Comparaison avec d'autres espèces 78
2. En conditions réelles : expositions *in situ* 80
a. Contamination métallique 80
b. Contamination organique 83
3. Conclusion sur les gastéropodes et la bioaccumulation 90
B / Evaluation des effets : sensibilité 93

1. Evaluation des effets en situation contrôlée : au laboratoire 93
a. Reprotoxicité 94
b. Immunotoxicité 101
c. Variation de sensibilité interspécifique 101
2. Sur le terrain 105
a. Bourbre 105
b. Decazeville 105
c. Sipibel 105
d. Méthodologie d'encagement 106
3. Facteurs confondants 107
a. Température 107
b. Variabilité naturelle 110
c. Solvants 113
C / Conclusion 116

Les Gastéropodes : organismes modeles pour l'OCDE ? 120
A / Gastéropodes et exposition 121
1. Durée et période d'exposition 121
2. Voies d'exposition 122
a. Eau 122
b. Sédiment 123
c. Alimentation 123
3. Schéma expérimental 124
B / Choix des espèces modèles 125
1. Elevage 125
2. Facilité d'expérimentation 125
3. Endocrinologie 126
C / Conclusions 126
Conclusion générale 130
Références 136
ANNEXES 152

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de la démarche intégrée pour l'évaluation des effets reprotoxiques 18
Figure 2: Approche expérimentale pour la compréhension globale des effets 20
Figure 3: Schéma des voies de signalisation théoriques des estrogènes, d'après Publi 1 22
Figure 4: Effets des mélanges de PE sur la reproduction des gastéropodes. A. Nombre d'embryons par *P. antipodarum* adulte. B. Nombre cumulé de juvénile par *P. antipodarum* adulte. C. Nombre cumulé de juvéniles par *P. antipodarum* exposés en tant que juvénile au mélange de PE. D. Nombre cumulé d'œufs par *V. piscinalis* (moyennes et écart-type, a<b<c indique une différence significative, $P<0.05$). E. Effets du mélange de PE sur l'expression de mRNA de gènes (moyennes et écart-type). Issu de Gust et al., soumis 24
Figure 5: Observation histologiques de la gonade de *V. piscinalis*. A à C Gonades de témoins (eau et solvant), en grossissement croissant (A<C) montrant les structures mâles et femelles. D et E: gastéropodes exposés au mélange 4 après 7 jours. F et G: gastéropodes exposés au mélange 3 après 14 jours. H et I : gastéropodes exposés au mélange 4 après 14 jours. Ac: acini, , GE: épithélium germinal, NC: cellules nourricières, OoI: oocyte primaire, OOII: oocyte secondaire, Oo: oocyte mature, SD: spermiducte, Sg: spermatogonie, Spz: spermatozoïde. Issu de Publi 3 26
Figure 6: Carte d'exposition aux rejets urbain et hospitalier (Sipibel) 30
Figure 7: Nombre d'embryons par *P. antipodarum* sur les sites de Sipibel (moyenne et écart-type), d'après Publi 18 30
Figure 8: Modification des voies de signalisation des œstrogènes en aval immédiat à Sipibel 31
Figure 9: Modification des voies de signalisation des œstrogènes en aval éloigné à Sipibel . 33
Figure 10: Localisation des sites d'exposition sur la Bourbre: contamination industrielle et urbaine. Issu de Publi 1 34
Figure 11: Effets de l'exposition sur la Bourbre sur *P. antipodarum* (moyenne et écart-type). A : Nombre d'embryons par adultes par sites ; B : niveaux d'E2 (pg) par individus, par sites et par échéance ; C : Effets de l'exposition *in situ* sur l'expression de mRNA de gènes (1x correspondant au Bion) . Issu de Publi 1 35

Figure 12: Localisation des sites d'exposition à Decazeville: contamination minière. Issu de Publi 11 37
Figure 13: Lésions histologiques de la glande digestive sur le Lot, exposition au Cd et Zn. BC : cellule basophile, CC : cellule à calcium, DC : cellule digestive, DG : glande digestive, Ov : ovocytes, Tub : tubule digestif. Adapté de Publi 11. 38
Figure 14: Schéma explicatif des effets observés en cas de contamination métallique 39
Figure 15: représentation schématique des marqueurs disponibles en immunotoxicité chez la limnée. En vert les marqueurs en cytométrie de flux, en orange ceux en RT-qPCR. AIF-1: allograft inflammatory factor, CA: catalase, GSR : gluthathion reductase, MDM: molluscan defensive molecule, NO : oxyde nitrique, NOS : nitric oxide synthase, PAMP : pathogen associate molecular pattern, PRR : pathogen recognition receptor, SeGPX: Gluthathion peroxidise selenium-dépendante, SOD; superoxide dismutase, TLR4: toll-like receptor 4 52
Figure 16: Exemples de marqueurs en cytométrie de flux. A: ROS, B: thiols (avec le témoin négatif en noir), C: phagocytose (M1: immunocapacité, M2: immunocompétence)..... 53
Figure 17: Analyse canonique entre les marqueurs génomique d'immunotoxicité regroupés par fonction et les marqueurs de réponse immunitaire fonctionnels. Issu de Publi 6 56
Figure 18: Effets de l'effluent de Montréal sur la réponse immunitaire de la limnée. A:production de ROS, B : niveaux de thiols intracelllulaires, C : immunocapacité (phagocytose d'une bille ou plus), D : immunocompétence (phagocytose de deux billes ou plus), E : expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (1x correspondant à l'amont). Adapté de Publi 6 58
Figure 19: Analyse canonique montrant les corrélations entre l'expression de gènes regroupés par fonctions prédictives, et la croissance de limnée exposées à un effluent urbain. Les lignes en gras indiquent des corrélations significatives ($p<0.01$). 59
Figure 20: Effets de mélanges de médicamments sur la réponse immunitaire de la limnée. A : densité cellualire ; B : niveaux de thiols intracelllulaires, C : production de ROS, D : immunocapacité (phagocytose d'une bille ou plus) et immunocompétence (phagocytose de deux billes ou plus), E et F : expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (1x correspondant à l'amont). Adapté de Publi 7 61
Figure 21: Analyse en arbre décisionnel des réponses immunes de la limnée. Les réponses fonctionnelles et génomiques ont été analysées. L'arbre décisionnel (A), montre la discrimination des classes thérapeutiques par la réponse immunitaire, et les biomarqueurs les plus importants (>75% d'importance) sont montrés dans le (B). Hem#: hemocyte count, P1: immunocapacity, P2: immunoefficiency, SH: thiol levels. Issu de Publi 7 62

Figure 22: Analyse discriminante des réponses immunes. Issu de Publi 8 63
Figure 24: Bioaccumulation (concentration finale retranchée de la concentration initiale) de métaux au laboratoire chez trois invertébrés aquatiques: *C. riparius*, *G. fossarum* et *P. antipodarum*. Arsenic (A), Chrome (B), Cadmium (C), Cuivre (D), Cobalt (E), Plomb (F), Nickel (G), Zinc (H). 80
Figure 25: Bioaccumulation (concentration finale retranchée de la concentration initiale) de métaux *in situ* chez trois invertébrés aquatiques: C. riparius, G. fossarum et P. antipodarum. Arsenic (A), Chrome (B), Cadmium (C), Cuivre (D), Cobalt (E), Plomb (F), Nickel (G), et Zinc (H) 89
Figure 26: Effets de la fluoxétine sur la reproduction des gastéropodes. A: nombre cumulé de juvéniles (*P. antipodarum*) et d'oeufs (*V. piscinalis*). B, nombre d'embryons par *P. antipodarum* (moyenne et écart-types). Adapté de Publi 16 100
Figure 27: Stades du développement embryonnaire de la limnée à 16°C. Issu de Publi 21 . 104
Figure 28: Diversité du biofilm sur les sites de Sipibel suivant les saisons. Les sites en amont de la STEP apparaissent en vert ou bleu et les sites en aval en rouge. 106
Figure 29: Effet de la température d'exposition (16, 20 et 24°C) sur la physiologie de *L. stagnalis*. A : Croissance après éclosion ; B : Nombre d'œufs par adultes ; C : Phagocytose (M1: immunocompétence et M2: immunocapacité) à différentes températures d'exposistion. Adapté de Publi 21 109
Figure 30: Niveaux de variation physiologiques (moyenne et écart-type) de différents marqueurs dans une population naturelle de *P. antipodarum*. A : stéroides, B : triglycérides, C : cholestérol, D : protéines. Issu de Publi 9 111
Figure 31: Effets des solvants sur différents traits de vie et marqueurs chez *P. antipodarum* (moyenne et écart-types, *** indique une différence significative par rapport au témoin $p<0.05$). A : nombre d'embryons dans la poche embryonnaire, B : nombre cumulé de juvéniles, C : niveaux d'E2, D et E : expression de gènes. Issu de Publi 5 115

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Avantages et inconvénients des gastéropodes d'eau douce pour l'évaluation des effets reprotoxiques 45

Tableau 2: Utilisation des différents gastéropodes d'eau douce pour la compréhension des mécanismes des toxiques 67

Tableau 3: Bioaccumulation et métabolisation de la fluoxétine chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis*. Issu de Publi 4 71

Tableau 4: Bioaccumulation et métabolisation de la fluoxétine chez les organismes aquatiques. BCF: bioconcentration factor. Issu de Publi 4 72

Tableau 5 :Paramètres toxico-cinétiques et BCF du BPA chez *V. piscinalis* et *P. antipodarum*. Issu de Publi 3 76

Tableau 6: Concentrations de BPA, tOP et tNP (µg/L) dans l'eau lors de l'exposition aux mélanges. Concentrations d'E2, T, BPA, tOP et tNP dans les organismes (ng/g) lors de l'exposition. Les éléments en gras signalent une différence significative par rapport au témoin. Issu de Publi 3 76

Tableau 7: Concentration en Cd et Zn sur les sites et dans les organismes, et marqueurs associés chez *P. antipodarum* ($a<b<c<d$, $P<0.0005$). Issu Publi 11 82

Tableau 8: Contamination chimique des 4 sites d'exposition (moyenne et écart-type, * indique la présence du composé dans tous les prélèvements). Issu de Publi 1 84

Tableau 9: Contamination chimique des organismes exposés sur les 4 sites d'exposition (moyenne et écart-type, * indique une différence significative avec l'amont). Issu de Publi 1 87

Tableau 10 : Contamination chimique des organismes exposés sur les 3 sites d'exposition (moyenne et écart-type, * indique une différence significative avec l'amont). Issu de Publi 18 91

Tableau 11: Utilisation de *P. antipodarum* en écotoxicologie 95

Tableau 12: Fécondité chez les témoins *P. antipodarum* suivant les conditions expérimentales (température, taille, nourriture, origine, alimentation). Issu de Publi 9 112

Tableau 13: Résumé des avantages et inconvénients des Gastéropodes comme modèles en écotoxicologie d'eau douce 127

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH: Adrenocorticotrophic hormone
AIF-1: allograft inflammatory factor
AK: anticancéreux
BCF: Faction de bioconcentration
BPA: Bisphenol A
CAT: catalase
Cd: Cadmium
COUP-TF: Chicken Ovalbumin Uptream Promoter Transcription Factor
COX: Cyclooxygénase
CRH: Corticotropine Releasing Hormone
E2: 17β-estradiol
E75: Ecdysone-induced protein
EDC: Endocrine Disruptive Compound
ER-like: Estrogen Receptor like
GSH : Gluthathion
GSR : gluthathion reductase
HHCB :1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[γ]-2-benzopyrane
HSP70: Heat Shock Protein
IFN : Interféron
LC : Chromatographie liquide
LPS : lipopolysaccharide
MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase
MDM: molluscan defensive molecule
MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
NO : oxyde nitrique
NOS : Nitric Oxide Synthetase
NP: Nonylphenol
tNP: tert-Nonylphenol
OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Economique
OP: Octylphenol
tOP: tert-Octylphenol
PAMP : pathogen associate molecular pattern
PE: Perturbateur Endocrinien
PHB: Prohibitin 2
PRR: Pathogen Recognition receptor
QuEChERS: Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
ROS : Reactive Oxygen Species
RT-qPCR: Rétrotranscription et Polymerase Chain Reaction quantitative
SCA: Service Central d'Analyse
SeGPX: Gluthathion peroxidise selenium-dépendante
SOD; superoxide dismutase
STEP: Station d'épuration
STN: Striatin
T: Testosterone
TBT: Tribultyletain
TLR4: toll-like receptor 4
VTG-like: Vitellogenin-like
Zn: Zinc

INTRODUCTION

De manière très résumée, l'intérêt pour les Gastéropodes Prosobranches en écotoxicologie est né du « cas d'école » du tributylétain (TBT). C'est 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 and Gibbs, 1998). Les organoétains étaient et sont utilisés notamment comme biocides à large spectre pour les revêtements antisalissures (Michel and Averty, 1999). L'existence de femelles présentant des caractères mâles chez les gastéropodes constitue un fait décrit depuis les années 1970 (Blaber, 1970; Smith, 1971). Ces phénomènes d'imposex correspondent à un syndrome de superposition d'organes génitaux de type mâles, comme le pénis chez des gastéropodes femelles (Smith, 1971).

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 sont également retrouvées au sein des organismes touchés, et ont été mis en relation avec la longueur du pénis des femelles touchées. Les effets sont suffisamment marqués pour provoquer un déclin de la population, non pas dû à une augmentation de mortalité, mais à une diminution de succès reproductif. Il semble que ce phénomène soit irréversible (Bryan et al., 1986) ; de plus, les concentrations induisant l'imposex dans cette espèce sont très basses, de l'ordre du ng/l (Gibbs et al., 1991).

Plus de 150 espèces de Mollusques ont été touchées par l'imposex dans le monde (Matthiessen et al., 1999). Le plus souvent, ce sont des populations côtières (Oehlmann et al., 1996).

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 et 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.

A l'exception de ce cas fort documenté, il n'y avait pas énormément d'études sur les gastéropodes prosobranches en écotoxicologie aquatique, lorsque j'ai débuté en 2006. L'équipe allemande du Prof. Jörg Oehlmann avait publié sur leur sensibilité forte aux perturbateurs endocriniens tels que le Bisphenol A (BPA), les alkylphénols, le TBT … (Duft et al., 2003a; Duft et al., 2003b; Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003; Oehlmann et al., 2000; Schulte-Oehlmann et al., 1995; Schulte-Oehlmann et al., 2000; Tillmann et al., 2001). Des mécanismes d'action portant sur le contrôle de la reproduction par des stéroïdes sexuels de type vertébrés étaient supposés, bien que cela soit controversé. Un autre organisme modèle très utilisé était la limnée (*Lymnaea stagnalis*) pour l'évaluation des effets de type PE (Lagadic et al., 2007). L'INRA de Rennes travaillait sur ce modèle depuis de nombreuses années déjà. Par ailleurs, les gastéropodes avaient été récemment introduits au Cemagref (devenu IRSTEA) au cours de la thèse de V. Ducrot (*Valvata piscinalis* et *Potamopyrgus antipodarum*). Aucun marqueur n'était alors disponible sur ces modèles du laboratoire d'écotoxicologie.

Un de mes objectifs de thèse fut de développer des marqueurs de reprotoxicité, voire de perturbation endocrinienne, et de les appliquer au laboratoire et sur le terrain. Les travaux engagés les trois premières années ont été poursuivis par la suite, afin d'approfondir l'évaluation de l'exposition en collaboration avec les chimistes du CNRS, notamment lors des encagements sur le terrain. De nouveaux marqueurs, moléculaires, ont aussi été appliqués pour améliorer la compréhension des effets, aussi bien en conditions contrôlées au laboratoire, que sur le terrain.

Les expositions *in situ* ont soulevé de nombreuses questions notamment concernant leurs conséquences sur l'état de santé des organismes. Ainsi, les causes de perturbations des traits de vie mesurés peuvent être multiples, et les réponses de ces traits relativement tardives par rapport au syndrome de stress qui s'installe chez l'organisme en réponse à la perturbation. Une perturbation du système immunitaire sera souvent antérieure à des effets sur la reproduction, et à l'origine, au moins en partie, de ceux-ci. L'hypothèse était donc que des marqueurs basés sur l'immunocompétence pourraient être des alertes précoces d'un effet potentiel sur la capacité reproductive. De nombreux toxiques ayant des effets sur la réponse immunitaire, ces marqueurs pourraient également être spécifiques. Une activité a donc débuté sur l'utilisation de la réponse immunitaire chez les gastéropodes en écotoxicologie.

Au cours de ces années, j'ai donc utilisé les gastéropodes lors d'expositions au laboratoire et sur le terrain. Je me suis intéressée aux modes d'action des polluants (principalement des perturbateurs endocriniens et des médicaments) et des rejets urbains, en me focalisant sur deux grandes fonctions : la reproduction et la réponse immunitaire. En parallèle, j'ai mené des travaux pour mieux comprendre les différences interspécifiques, car les différents modèles utilisés présentaient des sensibilités très diverses. Cela a ensuite découlé sur les questions concernant l'exposition et la métabolisation des polluants.

Dans ce manuscrit, je me suis donc prêtée à l'exercice de l'évaluation de l'intérêt des gastéropodes d'eau douce comme (i) outils de compréhension des mécanismes d'action d'une part et comme (ii) outils d'évaluation de la qualité des écosystèmes (évaluation de l'exposition et sensibilité) d'autre part. Je me suis basée principalement sur mes travaux, que j'ai résumés dans une première partie. Une synthèse générale a ensuite été réalisée concernant (iii) l'utilisation des gastéropodes comme biotests OCDE.

Au cours de ces dernières années, j'ai travaillé sur trois espèces de gastéropodes. *P. antipodarum* qui est une espèce prosobranche parthénogénétique ovovivipare et invasive. Cette espèce est celle sur laquelle les approches mécanistiques en termes de compréhension des effets reprotoxiques ont été les plus abouties. C'est sur cette espèce également que les approches terrain ont été le plus développées. *V. piscinalis* est également un prosobranche, mais hermaphrodite simultané et ovipare. Il a principalement été utilisé en laboratoire. Enfin, *L. stagnalis* est pulmoné, également hermaphrodite ovipare, introduit plus récemment dans le cadre de mes travaux sur l'étude de la réponse immunitaire.
Je présente en première partie un résumé condensé de mes travaux. Cette partie a pour objectif d'aider la compréhension du manuscrit par la suite, lors de la synthèse que je fais sur l'utilisation des gastéropodes en écotoxicologie aquatique d'eau douce.

Resume des travaux

A / CONTEXTE

Mes travaux se sont inscrits dans la problématique de l'évaluation des effets des polluants aquatiques sur les espèces non-cibles. Les mollusques, et notamment les bivalves et les gastéropodes, sont des modèles pertinents pour l'étude des mécanismes et des effets des polluants au niveau de la reproduction :

- Approches possibles depuis le niveau moléculaire, jusqu'au niveau de la fitness des organismes et de la dynamique des populations.
- Caractéristiques biologiques (possible implication des stéroïdes de type sexuels dans le contrôle de la reproduction, types de reproductions et de pontes variés…)
- Réponse connue à certains polluants d'origine humaine (TBT, BPA…) en faveur de leur utilisation en tant que modèle en écotoxicologie.

Cependant, au contraire du milieu marin, les gastéropodes d'eau douce ont été assez peu utilisés comme modèles pour l'évaluation des pollutions de l'eau. Peu de connaissances sont disponibles sur leur physiologie et leur réponse au stress chimique.

Les travaux auxquels le texte se réfère sont cités en note de bas de page. Les noms en italiques correspondent à ceux des étudiants pour lesquels j'ai participé à l'encadrement.

B / RAPPEL DES TRAVAUX DE THESE

L'effet des perturbateurs endocriniens (PE) sur les écosystèmes aquatiques est un sujet d'intérêt majeur en écotoxicologie, mais reste mal évalué sur les invertébrés et notamment les mollusques gastéropodes. Ces derniers sont sensibles aux PE, mais les mécanismes mis en jeu sont méconnus, du fait du faible niveau de connaissance de leur système endocrinien.

Deux espèces de gastéropodes prosobranches ont été choisies : *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis*. Ces espèces présentent une grande similitude de traits de vie (habitats similaires : aval des cours d'eau lents, prosobranches…), mais avec des modes de reproduction différents (respectivement parthénognénétique et hermaphrodite).

Lors du travail de thèse, nous avons développé des outils à différents niveaux d'organisation biologique afin de mieux appréhender les modalités de l'action reprotoxique des polluants. Différents marqueurs (suivi de reproduction, histopathologie, réserves énergétiques, stéroïdes sexuels, protéines vitelline-like) ont été développés ou adaptés chez nos espèces. Leur

variabilité, naturelle[1]a été évaluée, ainsi que celle induite par les facteurs abiotiques telle que la température d'exposition[2],.

Du fait des nombreuses controverses existantes sur le sujet, une attention particulière a été portée sur les stéroïdes sexuels de type vertébrés. L'objectif était de mieux comprendre leur implication dans le contrôle de la reproduction de *P. antipodarum*, et de rendre compte de leur possible utilisation en tant que marqueurs de la perturbation endocrinienne. Une méthode de dosage en radioimmunoassay a été développée et validée en collaboration avec l'Ecole Vétérinaire de Lyon et le Service Central d'Analyse (SCA) du CNRS[3] , et ces marqueurs ont ensuite été validés au laboratoire[4].

Ces marqueurs ont ensuite été appliqués à la fois dans des expositions de laboratoire et de terrain. Par exemple, nous avons évalué l'effet de médicaments impliqués dans des processus physiologiques clefs, comme la recapture de sérotonine avec la fluoxétine[5, 6, 7], ou la synthèse et l'action des stéroïdes sexuels avec le fadrozole (inhibiteur de l'aromatase)[4]. De plus, afin d'augmenter le réalisme environnemental des biotests utilisés, une méthodologie d'exposition *in situ* a été développée sur *P. antipodarum*[8]. 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[8, 9].

---

[1] Gust M., Mouthon J., Quéau H., Buronfosse T., Garric J. Natural variability and interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroids levels and energetic status in a natural population of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *General and Comparative Endocrinology*. **2011**. 172, 243-250

[2] Gust M., Buronfosse T., André C., Mons R., Gagné F., Garric J. Is exposure temperature a confounding factor for the assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)? *Aquatic Toxicology*. **2011**. 101, 396-404

[3] Gust M., Vuillet E., Garnier F., Giroud S., Couturier S., Garric J., Buronfosse T. 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*. **2010**. 878, 1487-1492.

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

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

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

[7] 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. 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*. **2010**. 6, 524-539.

[8] Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Quéau H., Mouthon J., Garric J. *In situ* biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray): example of WWTP effluent discharges. *Water Research*. **2010**. 44, 4517-4528.

[9] Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Coquery M., Mons R., Abbaci K., Giamberini L., Garric J. Comprehensive effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the physiology of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*. **2011**. 101, 100-108

Sur le plan méthodologique, ces travaux ont montré l'intérêt de travailler avec une espèce présentant les deux sexes pour mettre en évidence des perturbations sur les capacités reproductrices mâle et femelle, mais également les limites pratiques liées à la petite taille (<5mm) des organismes pour le développement de marqueurs.

C / PERTURBATION DE LA REPRODUCTION PAR LES POLLUANTS

Les travaux engagés sur la reprotoxicité ont ouvert énormément de questions (mécanismes d'action à l'origine des effets, toxicité des mélanges, effets long terme…), que nous avons approfondies plus en avant, avec pour objectif d'augmenter le réalisme environnemental de nos études.

En effet, les PE se présentent sous forme de mélange dans les écosystèmes, et les individus sont exposés tout au long de leur cycle de vie. Ces composés, agissant sur le contrôle hormonal de la reproduction, il est fort probable qu'il existe des fenêtres d'exposition critique. Une exposition, même à de très faibles doses lors de ces périodes, pourrait provoquer des effets persistants, même après la fin de l'exposition.

Pour répondre à ces questions (effet mélanges, fenêtre d'exposition critique, effets persistants), nous avons travaillé sur des mélanges de PE modèles (bisphenol A, nonyphenol et octylphenol), présents dans l'environnement, et dont les effets sur la reproduction sont avérés chez les mollusques. Ces expositions ont mis en évidence des effets reprotoxiques à différents niveaux (moléculaire, biochimique, tissulaire, individuel) sur les deux espèces modèles, et à des concentrations environnementales. De plus, l'exposition d'individus lors de leur maturation sexuelle a montré l'existence de fenêtre d'exposition critique. Des effets persistants sont ainsi observés chez des adultes, exposés uniquement lors de leur maturation sexuelle, mais non exposés à l'âge adulte. Il semblerait également que les effets soient encore observables sur la génération suivante[10].

Par ailleurs, ces expositions se font à l'aide de solvants pour permettre la solubilisation des molécules. Plusieurs études montrent des effets de ces mêmes solvants aussi bien sur les biomarqueurs que sur les traits de vie chez les espèces non-cibles. Nous avons mis en

[10] Gust M., *Berlioz-Barbier A.*, *Dupre M.*, *Lecomte V.*, Buronfosse T., Tair-Abbaci K., Garric J., Cren-Olivé C.Endocrine-disruptive compounds mixture bioaccumulate and have persistent reprotoxic effects in freshwater gastropods snails at environmentally relevant concentrations. soumis *Environmental Science and technology*.

évidence que des organismes exposés au DMSO seul bioaccumulaient de grandes quantités d'alkylphénols. *P. antipodarum* étant proposé comme organisme modèle à l'OCDE, nous avons voulu évaluer quelles étaient les conséquences de l'utilisation de solvants sur les marqueurs suivis. Des concentrations de solvants inférieures à celles recommandées par l'OCDE (2µL/L) ont des conséquences aussi bien sur la croissance, le développement embryonnaire que sur des marqueurs liés aux stéroïdes sexuels (biochimiques et moléculaires). Il faut donc en limiter autant que possible les usages[11].

Nous avons également approfondi les approches d'encagement de gastéropodes sur le terrain. Dans un premier temps, nous avons comparé la sensibilité des deux espèces modèles (*P. antipodarum* et *V. piscinalis*) lors de ce type d'exposition. Il en est ressorti que *P. antipodarum* était l'espèce la plus adaptée. Nous avons, par ailleurs, cherché à comprendre les mécanismes impliqués dans la modulation de la reproduction en suivant l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'œstradiol au niveau cellulaire. Cela permet en effet d'identifier si la modulation de l'action se fait par des voies de signalisation génomiques ou non génomiques. Ces marqueurs permettent une meilleure compréhension des effets reprotoxiques dans des situations diverses[12].

En collaboration avec les chimistes du CNRS (C. Cren-Olivé, A. Berlioz-Barbier), les méthodes de mesures des polluants dans les organismes ont été miniaturisées (QuEChERS et nanoLC-MS/MS). Cela a permis de mesurer l'accumulation et la métabolisation de fluoxétine dans les organismes et de mettre en perspective les différences de sensibilité observées en laboratoire cez les deux modèles gastéropodes[13].
La méthode a ensuite été généralisée à une trentaine d'autres polluants organiques (dosage sur 30mg de poids frais de gastéropodes). Cette avancée méthodologique a permis une approche simultanée de compréhension des effets et de l'exposition à des polluants en laboratoire[10] et sur le terrain[12]. Les implications, notamment en terme de marqueurs d'expositions et de transfert dans la chaîne alimentaire seront à évaluer plus en avant. Ces liens exposition-effets

[11] *Lecomte V.*, Noury P., Tutundjian R., Buronfosse T., Garric J., Gust M. Organic solvents impair life-traits and biomarkers in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) at concentrations below OECD recommendations. *Aquatic Toxicology*. **2013**. 140-141, 196-203

[12] Gust M., Gagné F., *Berlioz-Barbier A.*, Besse JP., Buronfosse T., Tournier M., Garric J., Cren-Olivé C. Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as field biomonitoring tool of water column contamination: exposure assessment and reprotoxic effects. Submitted *Water Research*.

[13] Gust M., Cren–Olive C., Bulete A., Buronfosse T., Garric J. Fluoxetine accumulation and metabolization as exposure biomarker to better understand biological effects in aquatic gastropods. *Xenobiotics*. **2013**. 3, s1, 8-10

sont d'autant plus intéressants dans des situations d'exposition *in situ*, pour lesquelles nous avons notamment montré une accumulation d'oxazépam au delà des doses thérapeutiques humaines[12]. Cette démarche a encore été approfondie en essayant de mettre en relation les effets sur les biofilms (bioaccumulation de polluants et effets biologiques) et sur les organismes qui s'en nourrissent. Les premiers résultats sont très encourageants et ouvrent la porte des problématiques de transfert trophique des médicaments[14].

Enfin, grâce à un laboratoire de terrain, nous avons également approfondi la méthodologie d'exposition *in situ* de *P. antipodarum*. Des expositions simultanées *in situ* et *ex situ* ont été réalisées à plusieurs saisons différentes dans les deux conditions. Cette étude a permis d'améliorer les techniques d'exposition en laboratoire, et de mettre en évidence les différences de réponses biologiques (effets et accumulation de polluants)[15,16].

D / EFFETS IMMUNOTOXIQUES

Comme déjà évoqué dans l'introduction, les expositions *in situ* perturbent l'état de santé des organismes, et ces perturbations interfèrent certainement avec la reproduction. J'ai donc développé une thématique d'immunotoxicologie. Des marqueurs basés sur l'immunocompétence pourraient être des alertes précoces d'un effet potentiel sur la capacité reproductive. Il est de plus avéré que de nombreux toxiques ont des effets sur la réponse immunitaire. En revanche, relativement peu d'études se sont intéressées à l'utilisation de la réponse immunitaire comme marqueur de contamination du milieu, alors que les hémocytes de mollusques sont continuellement exposés à l'environnement externe (système circulatoire ouvert). A ce jour, la majorité des études chez les mollusques a été faite sur des espèces commerciales marines. Dans ce cadre, il a été décidé de monter une collaboration avec une équipe reconnue pour ses travaux dans le domaine à Environnement Canada, Montréal (F. Gagné) et à l'INRS-IAF, Laval (M. Fournier), pour une mission d'une année. Peu d'études avaient été menées sur les gastéropodes, hormis *Lymnaea stagnalis*, pour l'évaluation des effets des pesticides. *L. stagnalis* est un gastéropode d'eau douce, couramment utilisée en écotoxicologie. Cette espèce a été proposée à l'OCDE comme biotest standardisé pour l'évaluation des polluants, tout comme *P. antipodarum*. C'est un organisme sensible à de

[14] Gust M., *Berlioz-Barbier A.*, Cren-Olivé C., Labanowski J., Garric J., Bouchez A. *In situ* reprotoxic effects of urban and hospital effluent on the mudsnail *P. antipodarum*: role of biofilm and water column. In prep.

[15] *Fabure J.*, Ferrari B., Geffard O., Garric J., Gust M. Comprehension of reprotoxic effects of urban effluent in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray): toxicant bioaccumulation, ex situ and in situ exposures and seasonal variations. In prep.

[16] Gust M., *Fabure J.*, François A., Garric J. Usefulness of reprotoxic effects in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) for field point source pollution assessment. In prep.

nombreuses molécules, facile d'utilisation, et permettant à la fois la mesure d'effets au niveau de l'individu (notamment reproduction), mais également au niveau sub-individuel. La limnée se prête aisément à la collecte d'hémolymphe de manière non invasive à plusieurs reprises au cours de l'expérimentation. A partir des hémocytes ainsi collectés, de nombreuses mesures sont alors possibles (potentiellement sur le même individu) : analyses en cytométrie de flux (cytotoxicité, immunotoxicité), de génotoxicité (dommage primaire à l'ADN), d'expression de gènes sur les hémocytes (gènes du stress oxydant, de reconnaissance non spécifique, cytokines…) et transcriptomique.

L'objectif de la mission à Environnement Canada était la mise en place d'outils de cytométrie de flux et génomiques en lien avec la réponse immunitaire chez la limnée. Des méthodes en cytométrie de flux (comptage, viabilité, ROS, thiols, phagocytose) ont été miniaturisées, afin d'être capable de faire un ensemble de mesures relatives à la réponse immunitaire sur le même individu. En parallèle, des mesures en RT-qPCR ont été mises en place pour l'expression de gènes en relation avec la réponse immunitaire et du stress oxydant. Ces outils ont ensuite été confrontés à un effluent urbain lors d'expositions courtes[17] et à des mélanges de médicaments *in vitro*[18] ou *in vivo*[19]. Les résultats obtenus sont très encourageants, et laissent entrevoir une utilisation pertinente des marqueurs immunotoxiques pour l'évaluation des effets des polluants.

Ces premières expositions, bien que préliminaires, ont confirmé la sensibilité et la précocité de la réponse immunitaire comme marqueur d'exposition à des toxiques. Il semble que certains marqueurs et leur association soient aussi spécifiques de types de polluants. Suite à cette mission, il est clair que ces approches d'immunotoxicologie sont intéressantes pour une meilleure compréhension des effets, notamment sur le terrain. En parallèle à la poursuite des thématiques en reprotoxicité, nous avons donc développé de nombreux projets pour poursuivre dans cette voie de caractérisation des effets sur la reproduction.

De retour en France, j'ai utilisé un laboratoire de terrain pour réaliser une étude comparable à ce qui avait été fait à Montréal pour caractériser les effets immuno-génomiques d'un effluent

[17] Gust M., Fortier M., Fournier M., Garric J., Gagné F. Immunotoxicity of municipal effluent to *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*. **2013**. 126, 393-403

[18] Gust M., *Gélinas M.*, Fortier M., Fournier M., Gagné F. *In vitro* immunotoxicity of selected antibiotics on freshwater mussel. *Environmental Pollution*. **2012**. 169, 50-58

[19] Gust M., Fortier M., Fournier M., Garric J., Gagné F. Short-term immunotoxicity of pharmaceuticals to *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*. **2013**. 445-446, 210-218

urbain. Elle a notamment permis de confirmer les effets immuno-génomiques lors d'exposition plus longues[20].

Le développement de la thématique d'immuno-toxicité permet d'approfondir l'étude des effets des médicaments. Au sein des substances médicamenteuses, les anticancéreux (AK) sont notamment suspects d'un réel danger pour les organismes des milieux, du fait de leur mécanismes d'actions spécifiques (cytotoxiques, mutagènes et reprotoxiques). De plus, ce sont des molécules dites émergentes, détectées dans l'environnement mais encore peu étudiées. Leur mode d'action laisse supposer des effets marqués tant au niveau cellulaire (génotoxicité, cytotoxicité), qu'au niveau de nombreux processus physiologiques impliquant une multiplication cellulaire ou un contrôle endocrinien de type stéroïdes sexuels (reproduction). La combinaison des marqueurs développés est donc particulièrement pertinente pour ce type de molécules. Un projet a été débuté dans ce cadre, avec l'introduction de tests directement sur les œufs des limnées, afin de miniaturiser encore les biotests et faire des screenings. Nous avons donc décrit précisément les phases de développement embryonnaire à différentes températures, et montré que des températures physiologiques n'avaient pas de conséquences notables sur la réponse immunitaire[21].

[20] *Fabure J.*, Gagné F., *Hubert-Louis A.*, Gust M., Immuno-genotoxic effects of wastewater effluent in *Lymnaea stagnalis*. Submitted *Chemosphere*

[21] Sapin A., *Faburé J.*, *Boisseaux* P., Chapin *M.*, Gust M., Effect of global warming on embryonic development, growth, reproduction and immune function of *Lymnaea stagnalis.* In prep.

LES GASTEROPODES ET L'EVALUATION DE L'EFFET DES CONTAMINANTS

Afin de permettre une identification fiable des risques engendrés par les polluants aquatiques, la connaissance des effets à différents niveaux d'organisation biologique est nécessaire (Ingersol et al., 1999; Jemec et al., 2010). Ainsi, l'évaluation de risque des polluants est intimement liée à la compréhension des effets. Au cours de ces dernières années, j'ai étudié deux grandes fonctions biologiques chez les gastéropodes : la reproduction et l'immunité.

A / DE L'OBSERVATION DE L'ALTERATION DES TRAITS DE VIE A LA COMPREHENSION DES MECANISMES

Au cours de la thèse, j'ai développé une batterie de marqueurs afin de mieux comprendre les modalités d'apparition des effets reprotoxiques. Les travaux de thèse ont été approfondis par la suite, ce qui est présenté ici.

1. Démarche intégrée

a. Principe

Je vais focaliser mon propos sur ce qui a été développé chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis*. Ce sont les espèces de travail du laboratoire d'IRSTEA de Lyon pour l'évaluation des effets reprotoxiques. J'ai ainsi réalisé une représentation schématique des relations des différents marqueurs entre eux qui souligne l'aspect intégré de la démarche (Figure 1).

Les marqueurs suivis au niveau de l'individu sont les traits de vie, comme la reproduction, mais également la survie et la croissance. Ils sont l'expression de ce qui se passe au sein même de l'individu. Au niveau tissulaire, l'histopathologie des gonades (pour la reproduction), mais également d'autres tissus, tels que le tissu digestif, sont étudiées afin de mettre en évidence des altérations de grandes fonctions physiologiques. Des marqueurs biochimiques sont également mesurés, tels que les réserves énergétiques (protéines, triglycérides, cholestérol et glycogène), qui sont indirectement liées à la reproduction, ainsi que les niveaux de protéines Vn-like, protéines des œufs. Enfin, des marqueurs directement en lien avec le contrôle de la reproduction par des stéroïdes sexuels de type vertébrés sont suivis : les niveaux de stéroïdes (niveau cellulaire) et les voies de signalisation des œstrogènes (niveau moléculaire). L'objectif est de pouvoir comprendre les effets sur la reproduction (augmentation ou réduction), ou l'absence d'effets.

Par ailleurs, d'autres personnes du laboratoire ont travaillé sur les modèles d'études et on développé des marqueurs, tels que la mesure d'activités cholinestérase (Gagnaire et al., 2008), ou de métabolisation (Gagnaire et al., 2009b). Cependant ils n'ont jamais été appliqués, à ma connaissance, lors d'expérimentations autres que celles de validation de sensibilité des marqueurs. Je n'y reviendrai donc pas.

L'intérêt de la démarche présentée ici repose sur (i) la concomitance de la mesure de l'exposition (par mesure de la concentration de polluants dans les organismes) et des effets ; (ii) l'association des différents marqueurs et leur mise en relation avec les effets reprotoxiques pour la compréhension des mécanismes mis en jeu. Cette démarche intégrative et globale n'est que rarement proposée, et son analyse (intérêts et limites) fait l'objet de cette partie.

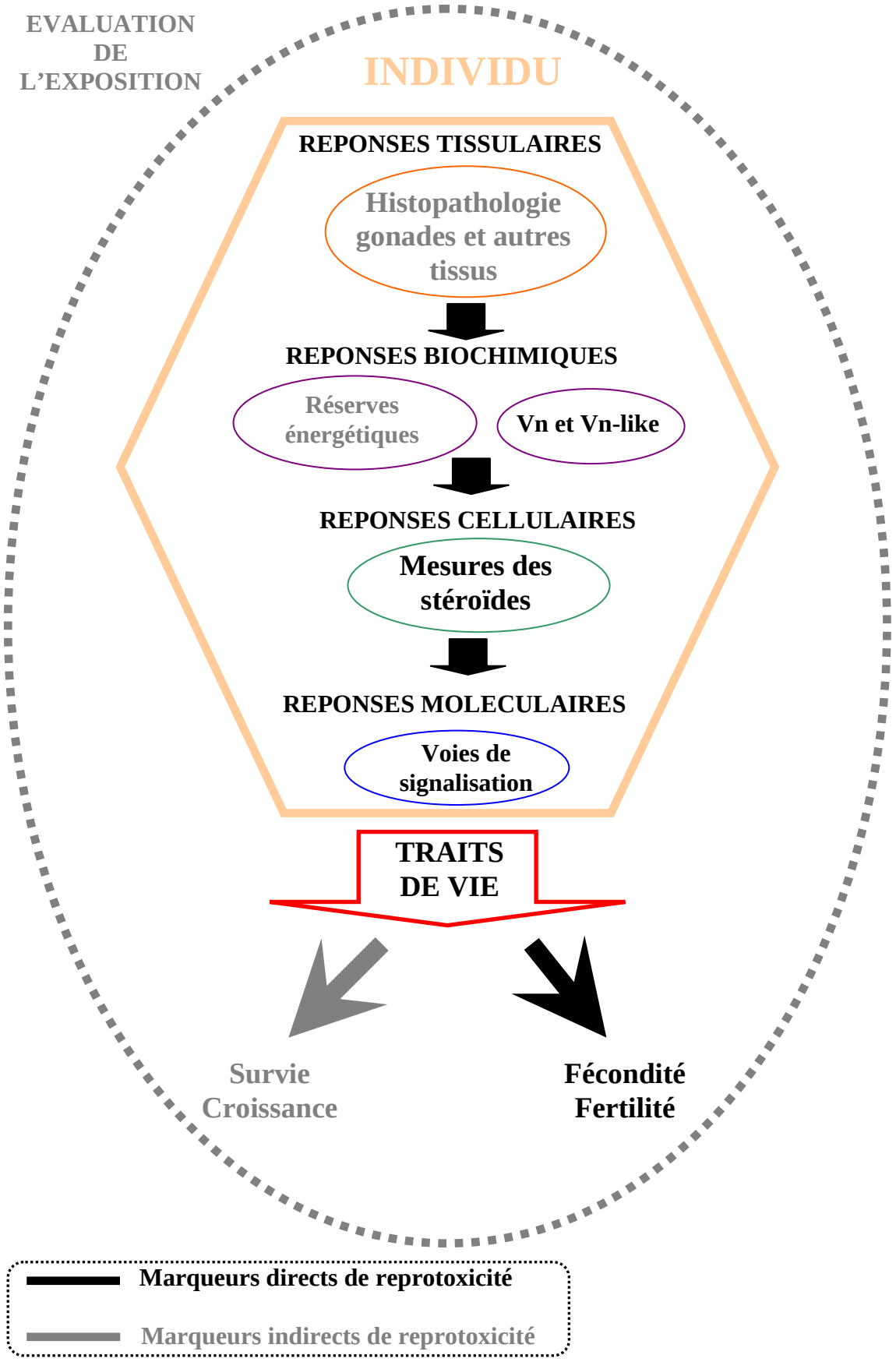


Figure 1: Représentation schématique de la démarche intégrée pour l'évaluation des effets reprotoxiques

b. Application pratique

D'un point de vue schématique, la démarche appliquée se résume de la manière suivante (Figure 2). En règle générale, ce sont des adultes qui sont exposés pour assurer un suivi de la reproduction et caractériser le danger engendré par les polluants. En revanche, l'existence de fenêtres critiques d'expositions doit être évaluée, notamment pour des molécules type PE. Ces périodes d'exposition peuvent engendrer une plus grande sensibilité, des effets persistants, et potentiellement sur les générations suivantes (Brion et al., 2004). Elles sont cruciales pour l'évaluation de risque. Les stades de vie exposés (embryons, juvéniles, adultes) ont une importance majeure.

L'estimation de l'exposition par la mesure des polluants directement dans les organismes, permet une évaluation du risque associé aux toxiques. De potentiels transferts trophiques des polluants sont ainsi mis en évidence, aussi bien lors d'expositions de laboratoire que de terrain.

Enfin, les effets sur la reproduction sont mesurés, ainsi que les différents marqueurs en lien avec celle-ci, pour mieux les comprendre. Si possible, un lien est fait entre les effets et l'exposition.

Cette démarche a été appliquée, toute ou partie, au laboratoire (Publi 3), mais également sur le terrain (Publis 1, 18, 19).

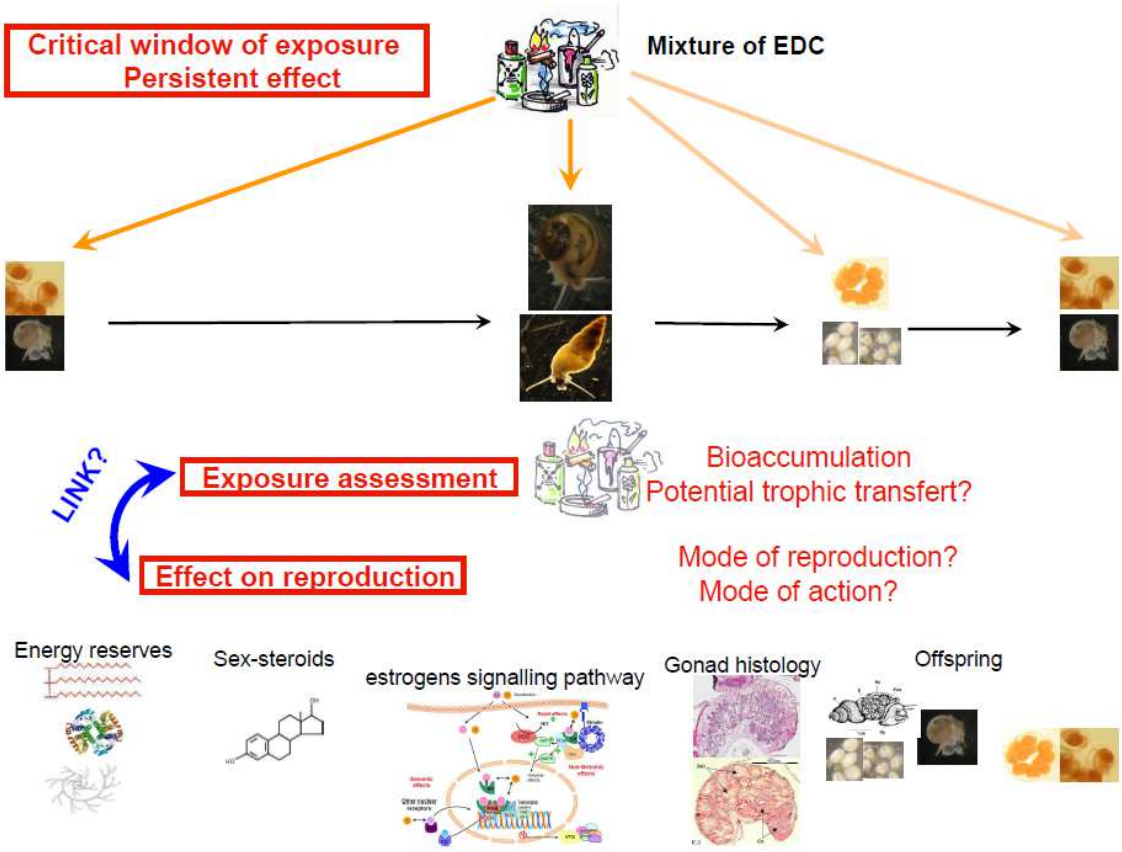


Figure 2: Approche expérimentale pour la compréhension globale des effets. Adapté de conférence 4

Par ailleurs, de nombreuses autres études que celles auxquelles j'ai participé, ont été réalisées, notamment sur *P. antipodarum* et principalement sur des polluants organiques reprotoxiques (Duft et al., 2003a; Duft et al., 2003b; Gagnaire et al., 2009a; Gerard et al., 2009; Jobling et al., 2003; Kaiser et al., 2012; Mazurova et al., 2008; Nentwig, 2007; Oetken et al., 2005; Pang et al., 2013; Pedersen et al., 2009; Sieratowicz et al., 2011; Stalter et al., 2010; Stalter et al., 2011; Wagner and Oehlmann, 2009).

Je vais présenter principalement celles auxquelles j'ai participé et pour lesquelles la démarche intégrée présentée ici a été appliquée. Il faut tout de même noter, qu'étant donné la petit taille de cet organisme (5mm lorsqu'il est adulte…), très peu d'équipes ont développé des biomarqueurs (OECD, 2010).

2. Développement de nouveaux marqueurs de reprotoxicité

a. Voies de signalisation des estrogènes

L'avancée majeure par rapport aux travaux de thèse s'est faite sur les marqueurs moléculaires (Figure 3). Je me suis basée sur l'approche transcriptomique développée par une autre équipe (Prof J. Oehlmann, Francfort, Allemagne). Celle-ci a permis la mesure de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation des œstrogènes (Stange and Oehlmann, 2012; Stange et al., 2012). Leurs travaux se sont limités au développement méthodologique. Au cours du stage de Master de A. Hubert-Louis, nous avons validé l'utilisation des séquences disponibles chez *P. antipodarum*. Par la suite, des mesures d'expression de gènes ont été réalisées sur les échantillons d'expositions en laboratoire (Publis 3 et 5) et sur le terrain (Publis 1 et 19).

D'un point de vue fonctionnel, j'ai cherché à montrer les relations des différentes protéines codées par les gènes dont l'expression est mesurée (Figure 3), afin d'arriver à un schéma explicatif clair, basé sur les connaissances bibliographiques disponibles.

Les œstrogènes-like (E2-like) peuvent activer un récepreur aux œstrogènes-like (ER-like), qui a été identifié chez *P. antipodarum* et dont l'expression est modulée par des PE supposés (Stange et al., 2012). Les effets des E2-like sont médiés, chez les mollusques, par des voies de signalisation génomiques et non génomiques (Janer and Porte, 2007). Ces voies de signalisation sont très conservées.

Les effets génomiques impliquent un ER-like nucléaire, constitutivement actif chez les mollusques (Keay et al., 2006), qui induit la transcription de gènes cibles. Le gène codant pour la vitellogénine-like (vtg-like) en est potentiellement un, bien que cela soit controversé (Matozzo et al., 2008). La prohibitin-2 (PHB) est un co-régulateur de l'E2, qui inhibe les effets génomiques des E2-like directement via l'ER-like (Mishra et al., 2006).

Les effets non génomiques sont médiés par un ER-like cytosolique ou membranaire (Canesi et al., 2004a; Canesi et al., 2004b). La striatin (STN) est une protéine échaffaudage, qui permet l'assemblage d'un complexe de signalisation membranaire impliquant une protéine Gαi. Ce complexe est nécessaire pour une activation rapide et non génomique d'une nitric oxyde synthase (NOS) par l'ER-like via les voies de signalisations phosphatidyl inositol 3-OH-kinase/tyrosine kinase (PI3K/AKT) et mitogen-activated proetin kinase (MAPK) (Qing et al., 2004). La libération d'oxide nitrique (NO) induit des effets cellulaires rapides (apoptose,

multiplication cellulaire…), alors que les cascades de phosphorylation pourraient engendrer des effets rapides directement ou via des transcriptions secondaires de gènes.

D'autres récepteurs nucléaires ont aussi été isolés, et pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la reproduction comme le Chicken Ovalbumin Uptream Promoter Transcription Factor (COUP-TF), qui est un récepteur orphelin, se liant à des éléments de réponse de récepteurs nucléaires variés, dont celui de l'ER (Tsai and Tsai, 1997). L'Ecdysone-induced protein (E75) est également un récepteur nucléaire, dont le ligand est l'ecdysone (hormone de mue des insectes), et qui a été identifié chez les mollusques, bien que sa fonction soit inconnue (Laguerre and Veenstra, 2010).

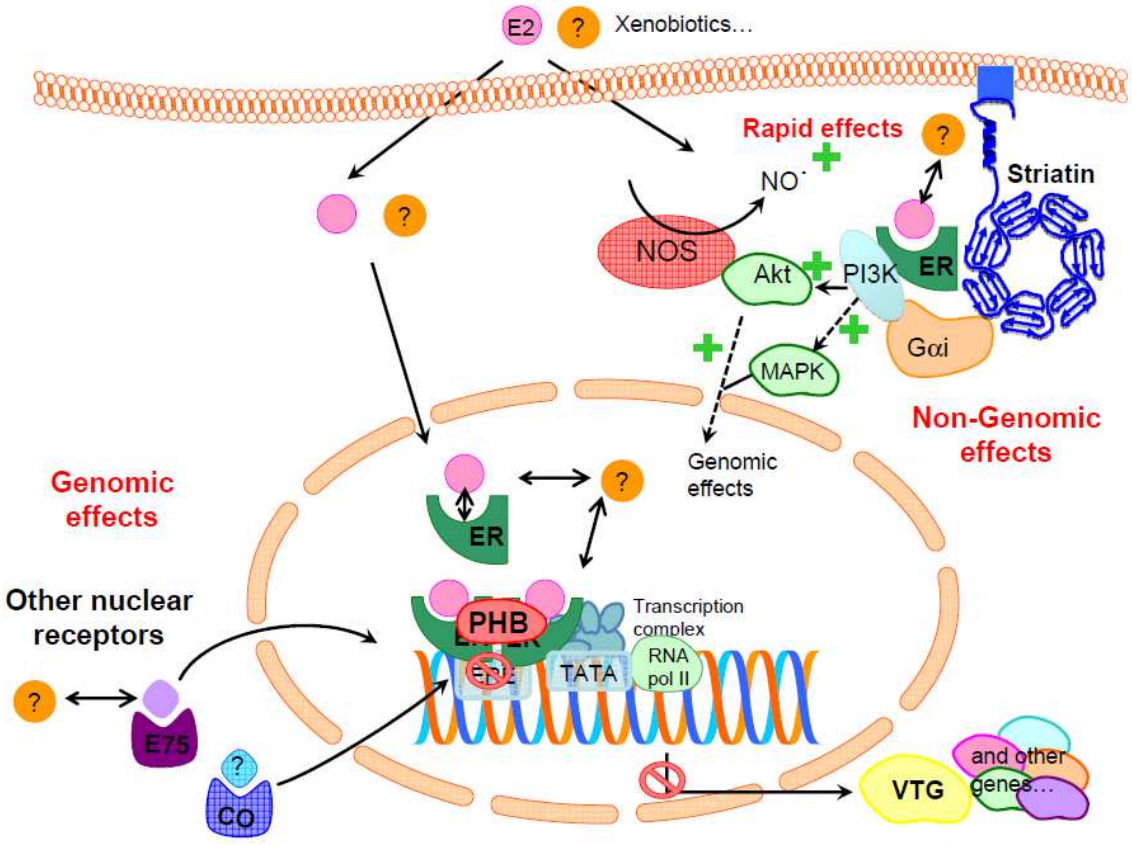


Figure 3: Schéma des voies de signalisation théoriques des estrogènes, d'après Publi 1

b. Marqueurs histopathologiques

Par rapport aux travaux de thèse, un gros investissement a été fourni par le laboratoire sur les marqueurs histologiques (Tair-Abbaci and Garric, 2010), et la compréhension du cycle « normal » de la gonade des gastéropodes utilisés par la structure. Ce travail a ensuite permis une meilleure utilisation de ce marqueur, notamment lors des expérimentations de laboratoire (Publi 3).

3. Utilisation des marqueurs pour la compréhension des effets

a. Mélange de PE au laboratoire

Au laboratoire, l'étude qui représente le mieux la démarche intégrée est celle réalisée avec un mélange de PE (BPA, OP et NP) sur *P. antipodarum* et *V. piscinalis* lors des Masters de V. Lecomte et M. Dupré et la thèse d'A. Berlioz-Barbier pour la chimie analytique (Publi 3). Les concentrations utilisées sont très basses et correspondent à une gamme environnementale réaliste (pour les eaux de surface). Les gastéropodes ont été exposés à 4 mélanges de concentrations croissantes, de BPA, tOP et tNP (mélange 1 : 0,2µg/L BPA, 0.1µg/L tOP, 0.5µg/L tNP jusque mélange 4 : 5,4µg/L BPA, 2,7µg/LtOP et 13,5µg/L tNP).

Chez l'espèce parthénogénique (*P. antipodarum*) :

- la reproduction est induite chez les adultes (Figure 4 A et B),
- sans effet observé sur les réserves énergétiques
- ou l'histologie des gonades,
- avec une diminution de l'E2,
- et une modification des voies de signalisation des œstrogènes (répression des voies génomiques par de faibles concentrations et induction des voies non génomiques par de fortes concentrations, induction du gène codant pour la VTG et de l'E75, Figure 4 E).

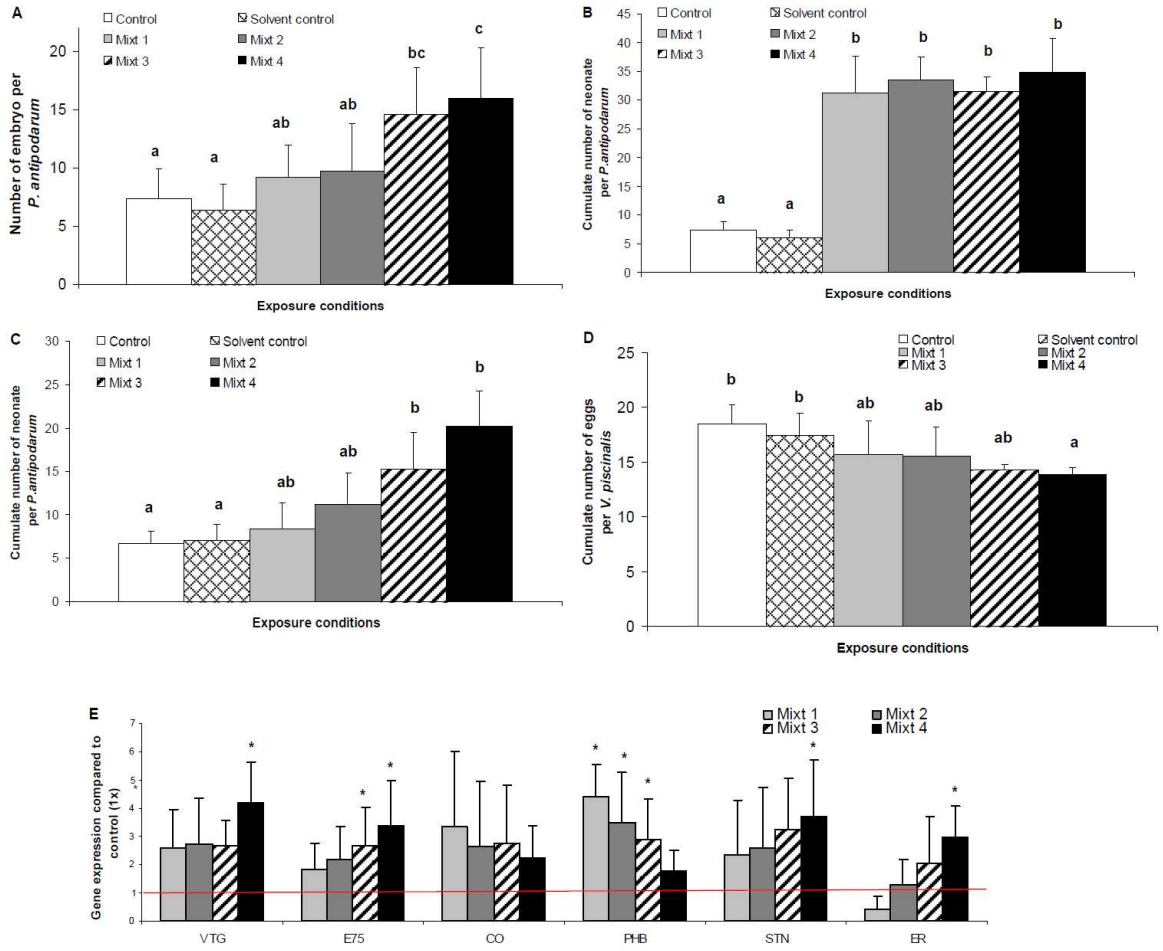


Figure 4: Effets des mélanges de PE sur la reproduction des gastéropodes. A. Nombre d'embryons par *P. antipodarum* adulte. B. Nombre cumulé de juvénile par *P. antipodarum* adulte. C. Nombre cumulé de juvéniles par *P. antipodarum* exposés en tant que juvénile au mélange de PE. D. Nombre cumulé d'œufs par *V. piscinalis* (moyennes et écart-type, a<b<c indique une différence significative, *P*<0.05). E. Effets du mélange de PE sur l'expression de mRNA de gènes (moyennes et écart-type). Issu de Publi 3

Chez l'espèce hermaphrodite (*V. piscinalis*) :

- la reproduction est réduite chez les adultes,
- les gonades altérées (la partie mâle aux faibles concentrations, puis la partie femelle également aux plus fortes concentrations),
- et comme chez *P. antipodarum*, les réserves énergétiques non modifiées,
- et l'E2 diminué.

Concernant l'altération tissulaire des gonades chez *V. piscinalis*, la structure des gonades des témoins (eau et solvant) est non altérée (Figure 5A-C), avec des cellules mâles et femelles à différents stades de différenciation. Les altérations surviennent sur les gonades mâles et femelles de manière temporelle et dose-dépendante. Après seulement 7 jours d'exposition, la

partie mâle de la gonade des individus exposés à la plus forte concentration de mélange est altérée (Figure 5D et E). Une désorganisation globale du tissu mâle est présente, avec des dégénérations des spermiductes, une hyperplasie des spermatogonies, due à une possible atrésie. Après 14 jours d'exposition, les gonades des individus exposés à la concentration la plus faible de mélange sont aussi altérées, avec une perte de différenciation des cellules mâles, peu de spermatogonies, et une perte de la structure lobulaire typique (Figure 5F et G). A la fin de l'exposition, la structure femelle est également altérée chez les individus exposés à ces deux concentrations (Figure 5H et I) : diminution du nombre d'oocytes, avec une différenciation cellulaire toujours présente et des oocytes matures atrétiques. La différenciation des cellules mâles est très peu présente, avec des tissus nécrotiques.

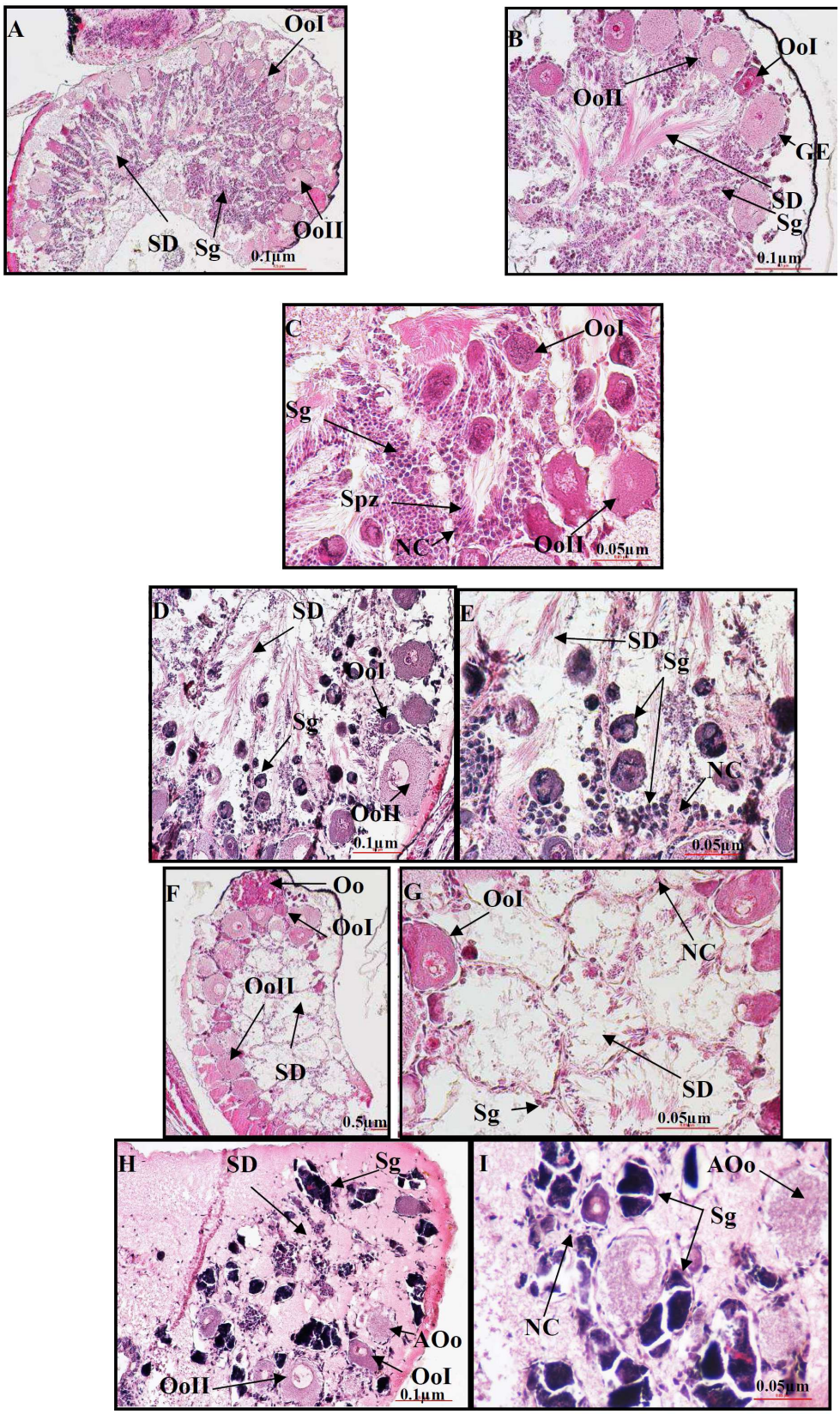


Figure 5: Observation histologiques de la gonade de *V. piscinalis*. A à C Gonades de témoins (eau et solvant), en grossissement croissant (A<C) montrant les structures mâles et femelles. D et E: gastéropodes exposés au mélange 4 après 7 jours. F et G: gastéropodes exposés au mélange 3 après 14 jours. H et I : gastéropodes exposés au mélange 4 après 14 jours. Ac: acini, , GE: épithélium germinal, NC: cellules nourricières, OoI: oocyte primaire, OOII: oocyte secondaire, Oo: oocyte mature, SD: spermiducte, Sg: spermatogonie, Spz: spermatozoïde. Issu de Publi 3

Nos résultats montrent une concomitance entre des effets au niveau de la reproduction et à des niveaux organisationnels inférieurs (histologie des gonades, niveau de stéroïdes, expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation des œstrogènes). Les marqueurs mesurés permettent une meilleure compréhension des effets observés (induction ou répression de la fécondité) de manière intégrée.

Chez l'espèce parthénogénétique, l'induction de reproduction est accompagnée d'une diminution d'E2. Une modification des ratios de stéroïdes sexuels a déjà été rapportée chez des poissons (mâles et femelles) exposés à de faibles concentrations (1-10µg/L) de BPA (see Flint et al., 2012). Les résultats sont plus contrastés avec le NP chez le poisson (Villeneuve et al., 2002; Yang et al., 2008). Cette modulation des niveaux de l'E2 se fait certainement via un rétrocontrôle négatif, similaire à ce qui est décrit chez la truite arc-en-ciel exposée au NP (Harris et al., 2001). Par ailleurs, le BPA modifie les schémas d'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation des oestrogènes (Flint et al., 2012). Cela expliquerait les résultats observés, avec une induction des voies non génomiques à forte dose et une non-inhibition des voies génomiques à faibles doses. Ces résultats dans leur ensemble suggèrent que les effets sur la fécondité de *P. antipodarum* sont issus d'une interaction avec le contrôle endocrinien de la reproduction. De plus, l'exposition aux mélanges induit l'expression d'autres facteurs (récepteurs aux ecdystéroïdes), ce qui est comparable à ce qui est observé chez les arthropodes exposés aux PE (Planello et al., 2008). D'autres éléments de régulation endocrinienne que les stéroïdes sexuels de type vertébrés sont donc impliqués.

De manière intéressante, les effets sont très différents chez l'espèce hermaphrodite, et donc ayant une gonade mâle. Chez *V. piscinalis*, la reproduction est diminuée, ainsi que les niveaux d'E2 (ce qui étaye l'hypothèse du rétrocontrôle négatif). En revanche, contrairement à *P. antipodarum*, des altérations des gonades sont observées, et particulièrement sur la partie mâle (plus marquée et plus précoce que la partie femelle). Ce tropisme plus marqué de ces polluants (BPA et OP) sur la partie mâle de la gonade de *V. piscinalis* avait déjà été noté au sein du laboratoire (Gagnaire et al., 2009a). De la nécrose et la perte de l'organisation générale avaient été notées, alors qu'aucun effet n'avait été observé chez *P. antipodarum*. Des altérations des gonades ont également été décrites chez d'autres mollusques : syndrome de « superféminisation » chez les gastéropodes (Oehlmann et al., 2006), résorption de gamètes mâles, oocytes atrétiques chez les bivalves (Aarab et al., 2006; Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2006).

Ainsi, l'opposition des effets qu'il peut y avoir entre les deux espèces s'explique par leur mode de reproduction différent : celle présentant uniquement une partie femelle, et donc sensible uniquement aux effets oestrogéno-mimétiques, chez qui la reproduction est induite, et celle subissant également les effets andogéno-délétères, chez qui la reproduction est diminuée.
Ces expérimentations montrent l'utilité des marqueurs mesurés à différents niveaux d'organisation biologique. Les modifications d'expression de gènes n'ont finalement de sens que mises en relation avec les modifications de niveaux de stéroïdes et de reproduction.

Enfin, lors de cette exposition, les niveaux de BPA, tOP et tNP ont été mesurés directement dans les organismes pour évaluer de l'exposition conjointement à la mesure des effets. Ici, le gradient d'exposition voulu au départ ne se retrouve que sur les concentrations de BPA, pour qui les concentrations vont croissantes dans les organismes. En revanche, en ce qui concerne les alkyphénols (tOP et tNP), les concentrations da sles organismes exposés sont supérieures à celles des témoins eau, mais ne reflètent pas le gradient des mélanges. Les effets observés sont donc principalement dus au BPA. Comme les effets sont plus marqués que lors des expositions au BPA seul, il peut être conclu que même si les alkylphénols ne participaient pas au gradient, ils ont potentialisé les effets du BPA. Cette mesure conjointe des effets et de l'exposition permet de lier les deux et de compléter la démarche intégrée. C'est possible dans une expérience de laboratoire où les paramètres sont contrôlés et les toxiques en présence maitrisés. Dans des expérimentations de terrain, il sera plus difficile de lier les effets à un polluant particulier.

En définitive, il faut noter que dans cette étude, aucun des marqueurs développés ne s'intéresse aux neuropeptides, qui sont pourtant fortement impliqués dans le contrôle de la reproduction chez les gastéropodes (Lagadic et al., 2007). Il serait très intéressant d'approfondir cette voie. Cependant, les modèles biologiques choisis ne sont pas forcément les plus adaptés, les connaissances sur les neuropeptides étant surtout disponibles chez les gastéropodes pulmonés (*Lymnaea stagnalis*).

b. Sur le terrain

Plusieurs expositions *in situ* de *P. antipodarum* ont été réalisées, mettant en évidence sa sensibilité pour évaluer la qualité des écosystèmes (Publis 1, 11, 12, 18, 19) et sur diverses sources de pollutions (urbaines, industrielles, hospitalières, minières). Bien que les expositions terrain soient plus complexes, l'application des différents marqueurs développés permet, comme au laboratoire, de porter un éclairage sur les mécanismes mis en jeu. Cela présente un intérêt certain dans la mesure où ce sont des expositions très réalistes d'un point de vue environnemental. L'objectif est non seulement d'évaluer si un rejet ponctuel a un effet délétère sur les organismes, mais également de comprendre la mise en place de cet effet. Les expositions se sont systématiquement faites sur le même modèle : un ou plusieurs sites en amont du rejet ont été utilisés et considérés comme témoins, et un ou plusieurs sites en aval ont également été suivis (Figure 6). Les travaux de thèse avaient permis d'optimiser les durées d'exposition suivant la température de l'eau (Gust et al., 2011a). Ici encore, les effets et l'exposition sont mesurés de façon conjointe pour avoir une approche la plus globale possible.

α Mécanismes passant par la reproduction

ॐ Sipibel : Contamination hospitalière

Cette exposition s'est faite sur l'Arve (Publi 18), en Haute-Savoie, en aval d'un rejet de STEP traitant les effluents d'une ville (32 000 équivalent habitants) et d'un hôpital nouvellement construit (2 000 équivalent habitants). Elle a été réalisée en collaboration avec l'INRA de Thônon (A. Bouchez), le CNRS de Limoges (J. Labanowski et thèse d'E. Laurent) et l'équipe TRACES du CNRS de Villeurbanne (C. Cren-Olivé et thèse d'A. Berlioz-Barbier) sur le site pilote de Bellecombe (Sipibel).

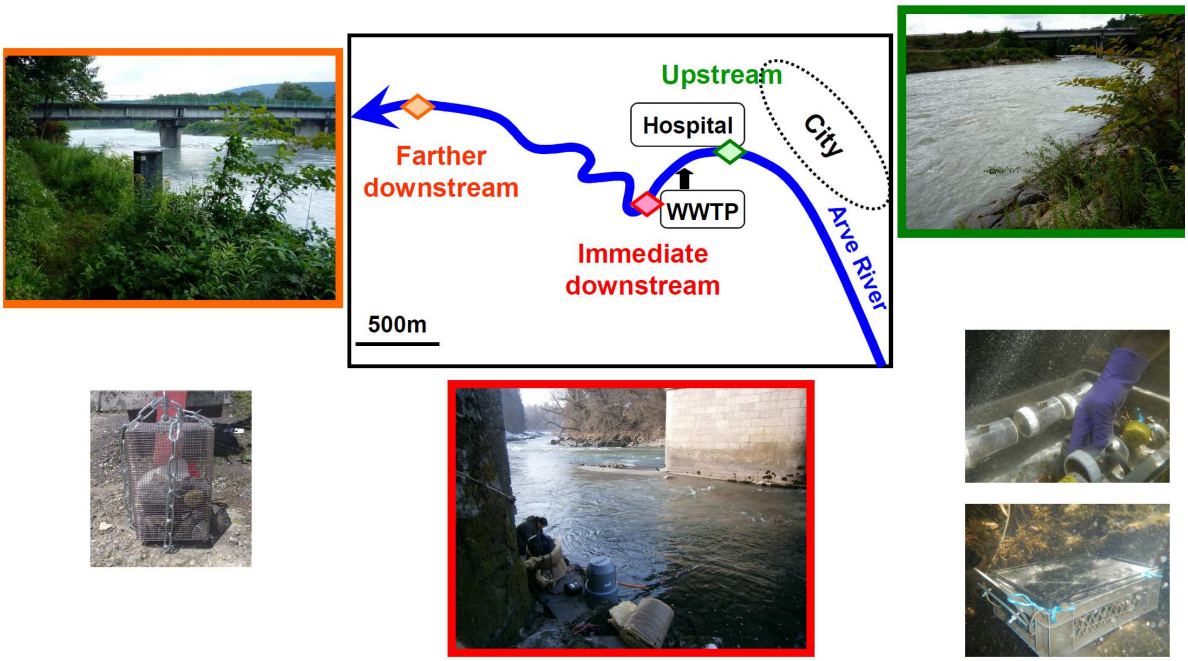


Figure 6: Carte d'exposition aux rejets urbain et hospitalier (Sipibel)

Les effets ont été une induction de reproduction sur le site aval immédiat, avec une récupération sur l'aval lointain, en lien avec la dilution de l'effluent dans la rivière (Figure 7). Il faut noter que les niveaux de reproduction sur le site amont étaient déjà assez élevés par rapport aux valeurs physiologiques usuelles de *P. antipodarum* (Gust et al., 2011b). Ainsi, le nombre total d'embryons (autour de 35 embryons par individus) obtenu sur le site aval immédiat est le signe d'une réelle induction de la reproduction.

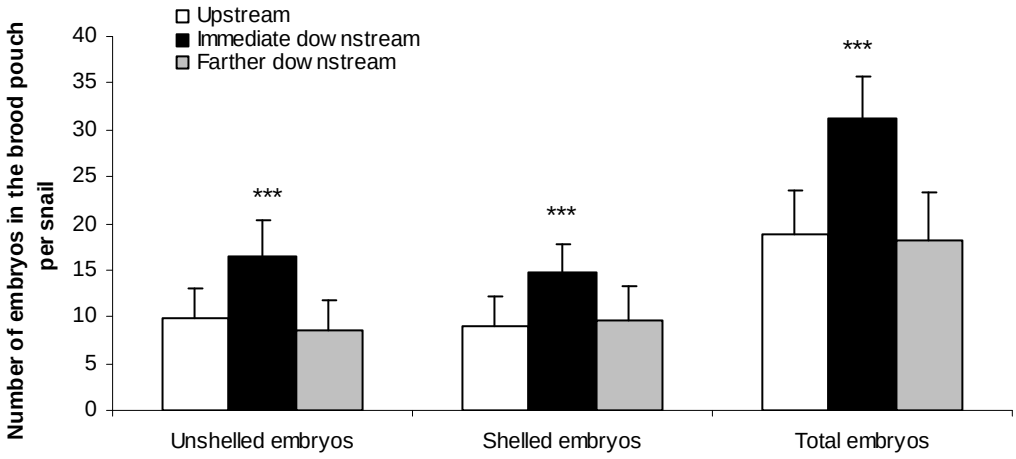


Figure 7: Nombre d'embryons par *P. antipodarum* sur les sites de Sipibel (moyenne et écart-type), d'après Publi 18

Ceci est d'autant plus vrai que les réserves énergétiques n'ont pas été impactées, ce qui conduit à penser que l'induction de reproduction n'est pas due à une ressource alimentaire

augmentée. Elle serait donc due à un apport de toxiques dans la rivière par l'effluent qui induirait une perturbation endocrinienne et une induction de la reproduction. Cette hypothèse est confirmée par les dosages effectués dans l'eau (médicaments, mais également BPA et tOP à plusieurs centaines de ng/L), et dans les bêtes (oxazépam, BPA, tOP, tNP). Ces mesures chimiques permettent d'objectiver clairement la contamination et de mettre les effets en perspective.

Nous avons également envisagé l'hypothèse d'une approche plus mécanistique par le biais des voies de signalisation des œstrogènes qui ont également été affectées. Cela nous a permis de présenter des hypothèses quant aux effets observés sur la reproduction.

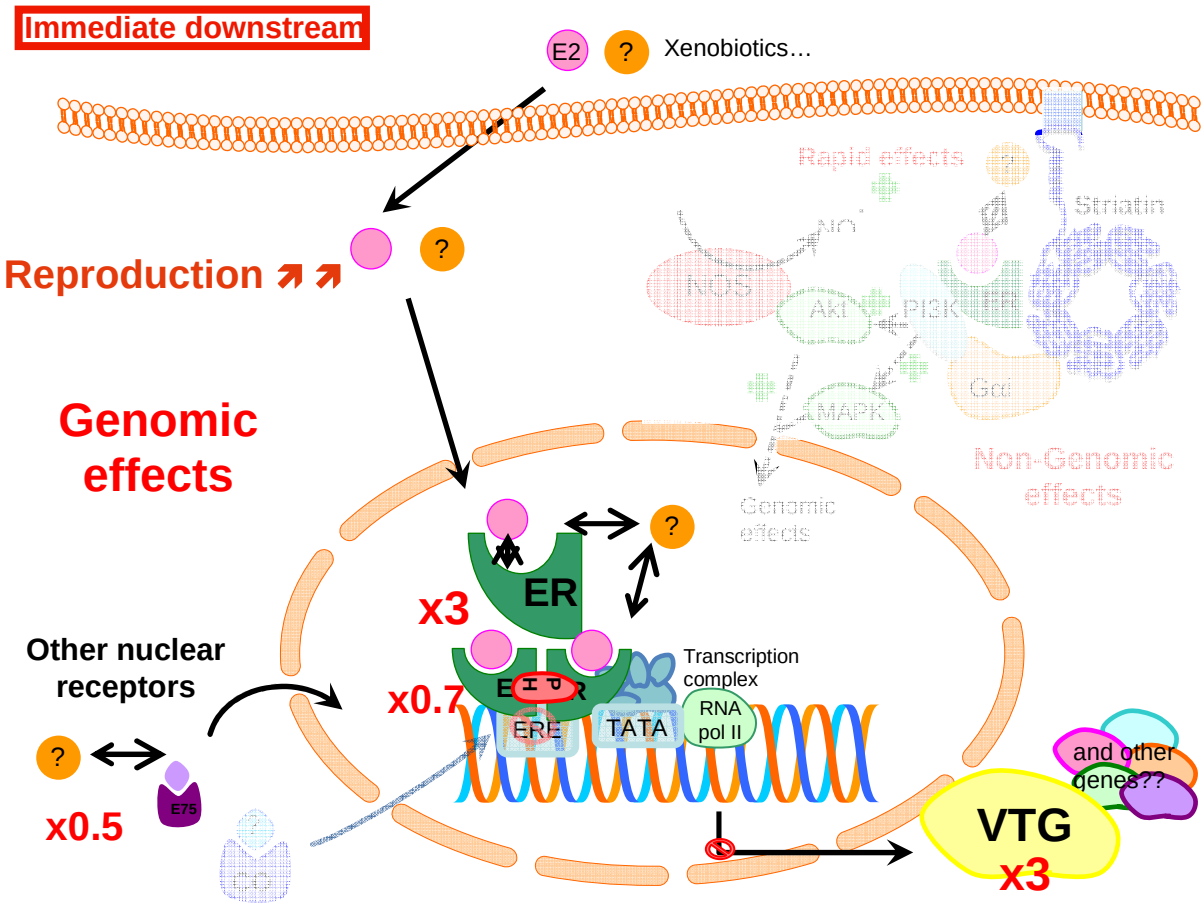


Figure 8: Modification des voies de signalisation des œstrogènes en aval immédiat à Sipibel

Sur le site aval proche (Figure 8), aucun effet n'a été observé sur les voies non génomiques, alors qu'une induction des voies de signalisation génomiques des œstrogènes a été mise en évidence (inhibition de la PHB, induction de l'ER-like et VTG-like, pas d'effet sur le COUP-

TF). Nous pouvons donc en déduire que l'induction de reproduction était due à une activation des voies de signalisation des œstrogènes. Il est difficile de relier un tel effet à un polluant donné. Cependants, les effets obtenus en laboratoire avec les mélanges de PE étaient assez équivalents (induction de reproduction et des voies de signalisation génomiques des œstrogènes). La contamination des eaux de surfaces et des organismes lors de cette exposition est également similaire à celle observée lors des expositions de laboratoire (bien que plus complexe). Il est donc fort possible que les effets observés soient, au moins en partie, dus au BPA et alkylphénols.

Par ailleurs, des études récentes laissent entendre que la VTG pourrait être impliquée dans l'immunité innée, en jouant un rôle de Pattern Recognition Receptor (PRR), reconnaissant de nombreux éléments bactériens et viraux, et favorisant la phagocytose pas opsonisation (Zhang et al., 2011b). Un rôle de la VTG dans l'immunité des mollusques a également été suggéré par certains auteurs (Bouchard et al., 2009). Il est donc possible que l'induction du gène codant pour la VTG soit due à un effet immunotoxique de l'effluent. En effet, les effluents urbains sont reconnus pour leurs propriétés immunotoxiques chez les gastéropodes (Gust et al., 2013).

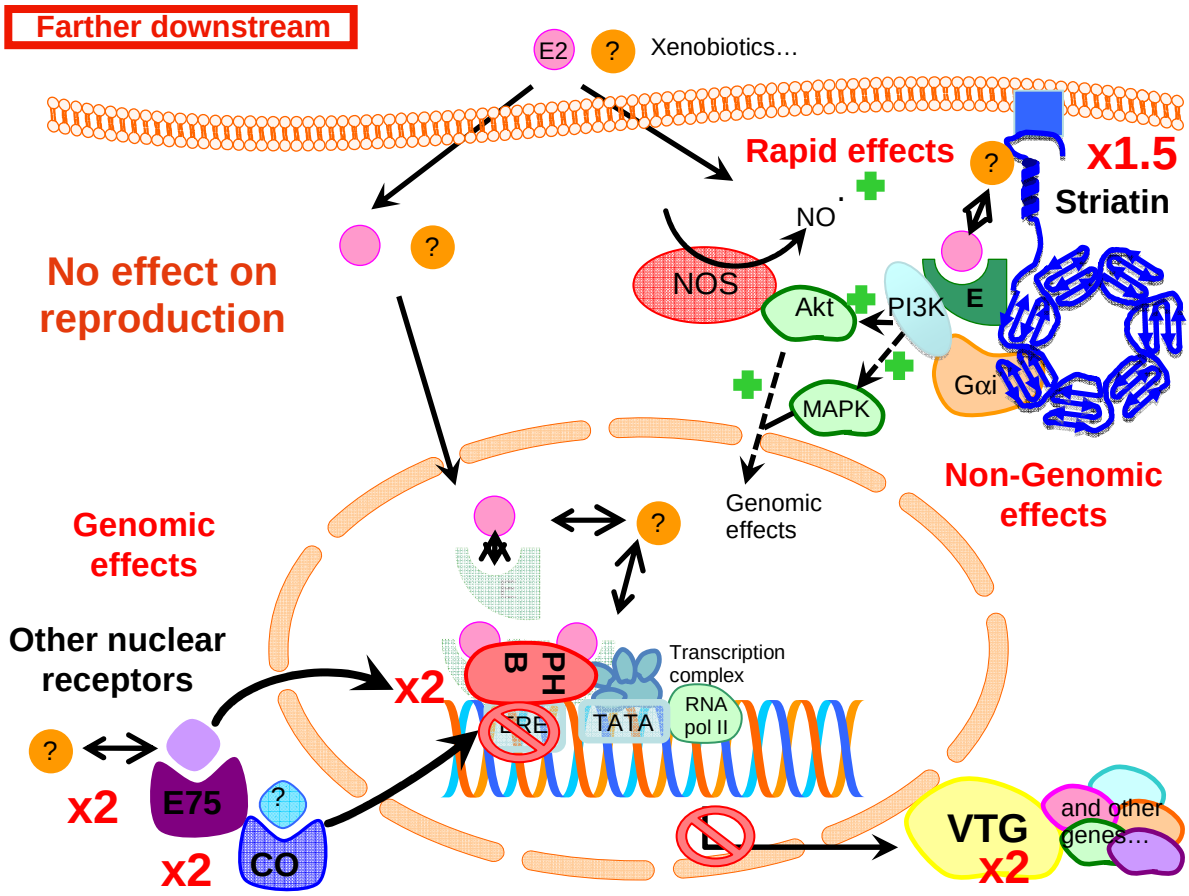


Figure 9: Modification des voies de signalisation des œstrogènes en aval éloigné à Sipibel

Dans cette même étude, les effets observés à l'aval éloigné sont assez différents (Figure 9). La reproduction n'est plus impactée, alors que l'expression de gènes l'est toujours, mais de manière très distincte de ce qui a été observé à l'aval proche. Une induction des voies de signalisation non génomiques des œstrogènes est observée (induction de STN), associée à une inhibition des voies génomiques (induction des répresseurs PHB et COUP-TF). Il est probable que l'absence d'effets observés sur la reproduction soit due à l'équilibre de ces deux voies de signalisation.

En revanche, de même que sur le site aval immédiat, le gène codant pour la VTG est toujours induit, suggérant une signature immunotoxique de l'effluent (l'induction est moindre qu'au niveau de l'aval proche à mettre en relation avec la dilution de l'effluent). Il est également possible que le VTG ne soit pas exclusivement sous contrôle stéroïdien et que son expression soit régulée par d'autres voies endocriniennes chez *P. antipodarum*. En effet, l'hypothèse selon laquelle l'expression de la VTG est sous le contrôle des oestrogènes est controversée(Matozzo et al., 2008).

Enfin, des travaux supplémentaires sont à envisager concernant le récepteur aux ecdystéroïdes (E75), dans la mesure où il était réprimé à l'aval proche et induit à l'aval éloigné. Son

implication dans la reproduction des mollusques est à déterminer, d'autant plus que des mélanges de PE induisent son expression (Publi 3).

Malheureusement, aucune analyse histologique n'a pu être réalisée lors de cette étude pour des raisons techniques de mauvaise conservation des échantillons. Il aurait pourtant été intéressant de déterminer si l'induction de la reproduction observée se traduisait par des altérations tissulaires.

Cette expérimentation a permis de montrer que des effets similaires à ceux obtenus au laboratoire (induction de reproduction en lien avec une modification des voies de signalisation des œstrogènes) sont présents en situation réelle. La mise en perspective des effets par la mesure des contaminants directement dans les organismes permet de compléter la démarche.

- **Bourbre : contamination industrielle et urbaine**

Une autre étude du même type a été réalisée (Publi 1) sur la Bourbre en Isère, avec un rejet de STEP traitant les effluents d'une ville et de nombreuses industries. Elle a été réalisée dans le cadre de la thèse de J. Camilleri (analyses multi-résidus dans l'eau) et A. Berlioz-Barbier (analyses dans les organismes), et en collaboration avec C. Cren-Olivé (CNRS Villeurbanne), F. Gagné (E. Canada) et T. Buronfosse (VetAgro-Sup).

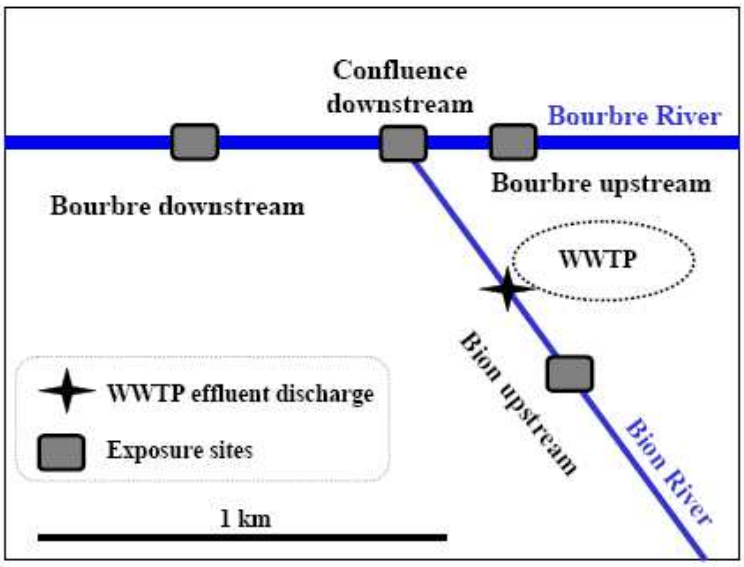


Figure 10: Localisation des sites d'exposition sur la Bourbre: contamination industrielle et urbaine. Issu de Publi 1

Ici les effets observés sur la reproduction étaient totalement inversés par rapport à ceux de l'étude précédente, avec une forte diminution à l'aval proche (90% de diminution des embryons néoformés), en partie compensée à l'aval éloigné (75% de diminution des embryons néoformés) avec la dilution de l'effluent, mais toujours significative (Figure 11A).

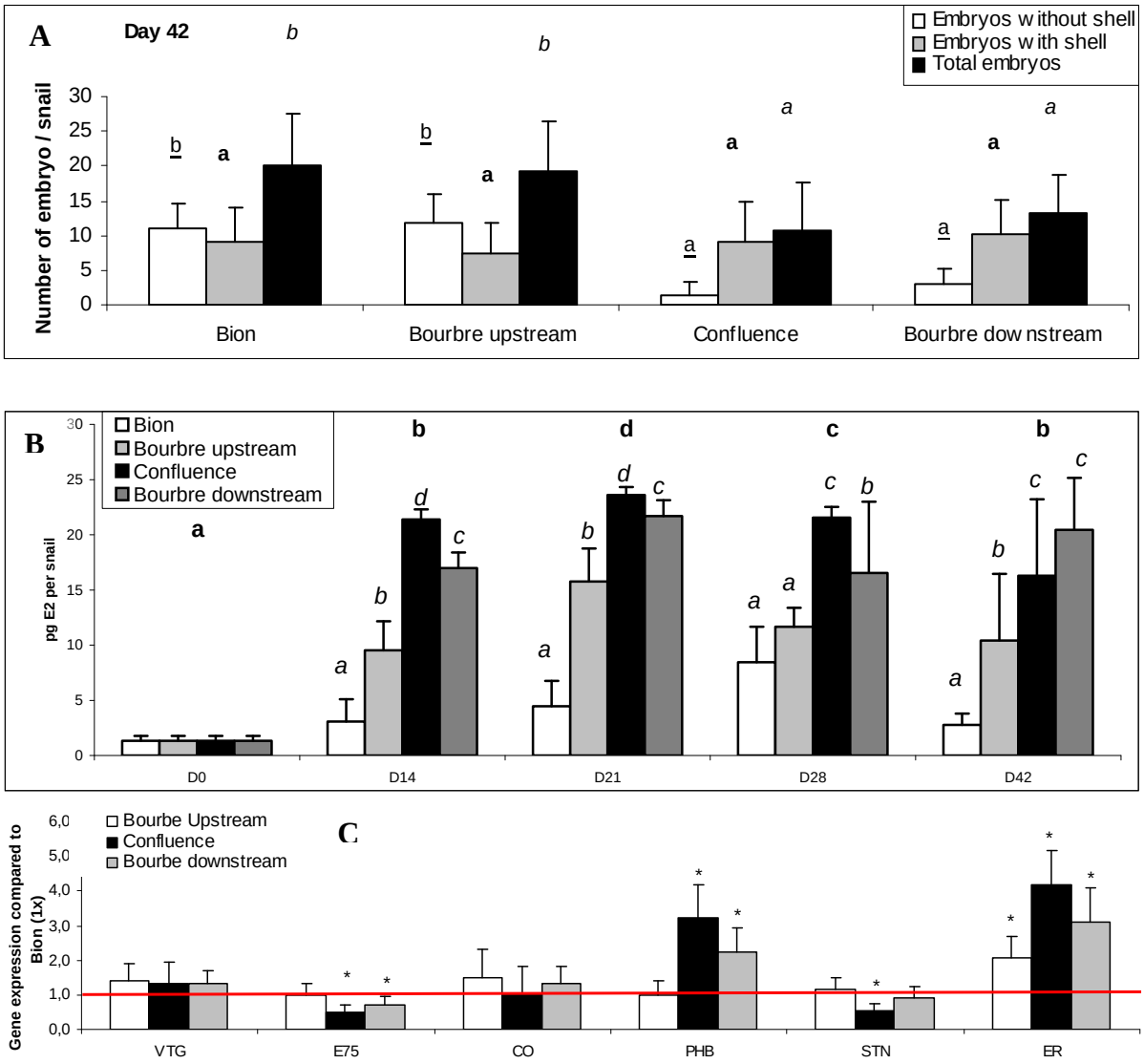


Figure 11: Effets de l'exposition sur la Bourbre sur *P. antipodarum* (moyenne et écart-type). A : Nombre d'embryons par adultes par sites ; B : niveaux d'E2 (pg) par individus, par sites et par échéance ; C : Effets de l'exposition *in situ* sur l'expression de mRNA de gènes (1x correspondant au Bion) . Issu de Publi 1

Aucun effet sur les réserves énergétiques n'a été mesuré entre les différents sites. Cet élément, associé à la croissance des juvéniles équivalentes dans tous les sites lors de l'exposition, exclut le manque de ressource alimentaire comme origine de la diminution de fécondité.

Une bioaccumulation importante de 17β-œstradiol (E2, 25pg/organisme) et testostérone (,T 100pg/organisme) a été mesurée (Figure 11B), bien supérieure aux valeurs physiologiques usuelles (E2<2pg/organisme et T<7.5pg/organisme). Cette bioaccumulation correspond à l'accumulation de l'estrone et la testostérone présentes dans l'eau (Gust et al., 2010a). Les expositions de laboratoire à de l'estrone seule, que nous avons réalisées par ailleurs avec V. Lecomte lors de son Master, ont montré qu'il n'y avait pas d'effet associé sur la reproduction.

Les mesures des protéines Vn-like n'ont pas mis en évidence de différences entre les sites, ce qui a été confirmé par la mesure de l'expression de la VTG.

Ici, encore, l'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation des œstrogènes a été modifiée par l'exposition (Figure 11C). L'expression de l'ER-like est induite sur les 2 sites avals. Les voies de signalisation génomiques sont inhibées sur les 2 sites avals, alors que les voies de signalisation non génomiques le sont seulement sur l'aval proche. Cette inhibition des deux voies de signalisation est à corréler avec la diminution de fécondité. L'induction de l'ER-like peut être liée à un rétrocontrôle positif suite à la répression des voies de signalisation, ou alors à une induction due à la bioaccumulation importante d'E2. Dans cette expérimentation, l'expression de l'E75 est réduite sur les deux sites avals. Cette diminution d'expression, associée à une fécondité très réduite et à une contamination chimique importante en médicaments et PE soulève des questions quant à la fonction des ecdystéroïdes dans la reproduction des mollusques.
Cette expérimentation permet également de mettre en relation les effets observés sur la reproduction avec les voies de signalisation des œstrogènes. Cependant, les mesures chimiques aussi bien dans l'eau que dans les organismes ont montré une forte contamination en médicament (oxazépam notamment) et en PE (BPA et alkylphénols). Les concentrations internes d'oxazépam (près de 3mg/kg de poids frais) étant très nettement supérieures aux doses thérapeutiques humaines, les effets de toxicité directe des médicaments présents dans le milieu sont aussi très probables.

Cette expérimentation, aux effets très distincts de celle présentée précédemment, montre toute la complexité du terrain. La démarche intégrée appliquée lors de ces expériences ne permet pas la compréhension de tous les mécanismes biologiques impliqués, mais l'appréciation de la situation dans son ensemble. Elle met en évidence le lien réel entre les effets reprotoxiques et les contaminants (même si aucun contaminant ne peut être directement incriminé).

β Autres modes de toxicité

Une exposition à des rejets métalliques (Cd et Zn) à Decazeville sur le Riou-Viou, le Riou-Mort et le Lot (Publi 11) a permis de montrer que les effets observés sur la reproduction peuvent aussi être dus à des facteurs indirects. L'exposition a été réalisée sur 5 sites présentant un gradient de contamination (Figure 12).

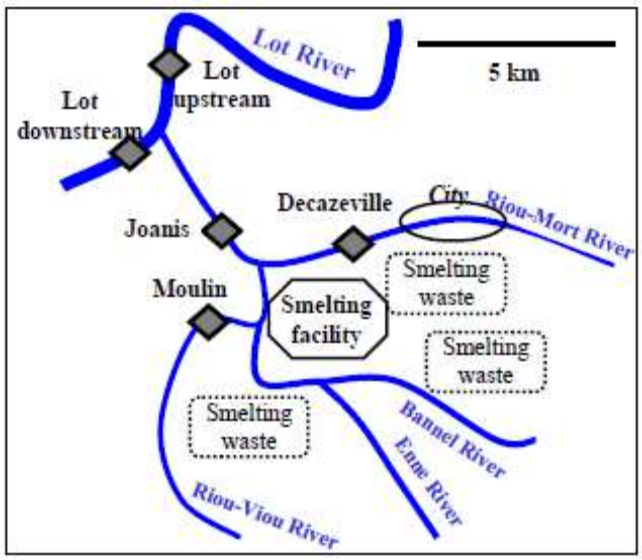


Figure 12: Localisation des sites d'exposition à Decazeville: contamination minière. Issu de Publi 11

Lors de cette exposition, une diminution drastique de la reproduction a été observée sur le site le plus impacté (Joanis), ainsi qu'une diminution de croissance des juvéniles. Elles avaient été liées à une diminution de réserves énergétiques chez les adultes. Par ailleurs, l'analyse histopathologique de la gonade a montré une altération importante de la glande digestive caractéristique des contaminations métalliques (Marigomez et al., 2002, Figure 13).

Sur les sites témoin (Decazeville et Lot amont), la structure digestive n'est pas altérée, avec des tubules de la glande digestive composés de 3 types cellulaires : les cellules digestives, les cellules à calcium et les cellules basophiles. Sur le site de contamination intermédiaire (Moulin), les cellules à calcium sont hypertrophiées et plus nombreuses, mais la structure de la glande digestive est conservée. De manière intéressante, aucun effet biologique associé (de type modification de trait de vie : croissance ou reproduction) n'est observé sur ce site. Cela met bien en évidence la précocité des lésions tissulaires comparées aux modifications de traits de vie. Sur le site le plus contaminé (Joanis), une perte de la structure digestive est notée, avec une vacuolisation des cellules digestives, sans perte apicale. Les cellules à calcium sont toujours hypertrophiées et présentes en nombre supérieur. La reproduction est stoppée chez les adultes, mais la croissance des juvéniles est comparable à celle des autres sites, et dans les gammes de variations physiologiques chez cette espèce. Ces effets sont caractéristiques, à la fois de la contamination métallique (Marigomez et al., 2002; Zorita et al., 2006), et d'une mise à jeun prolongée (Dimitriadis and Hondros, 1992; Porcel et al., 1996).

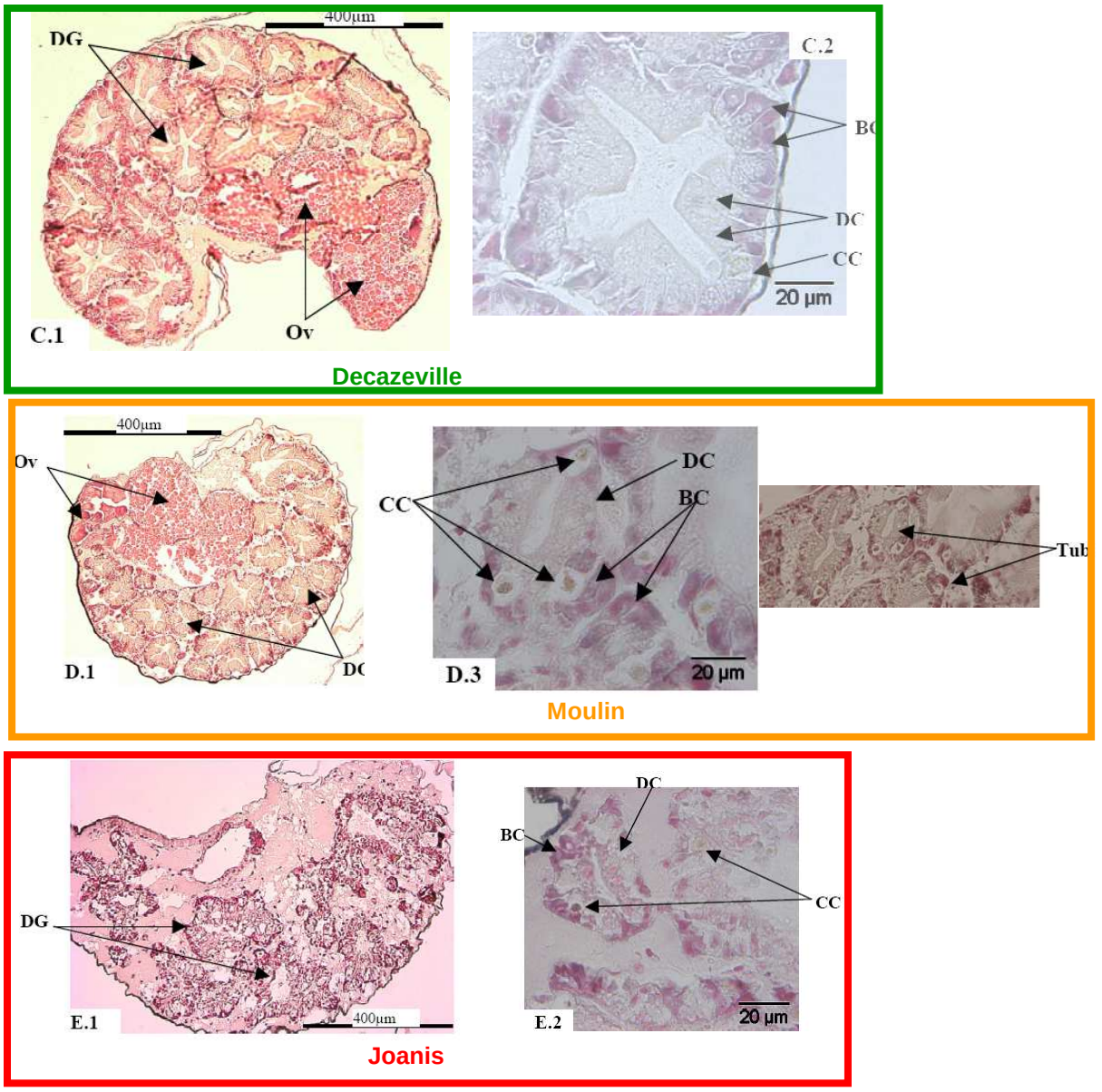


Figure 13: Lésions histologiques de la glande digestive sur le Lot, exposition au Cd et Zn. BC : cellule basophile, CC : cellule à calcium, DC : cellule digestive, DG : glande digestive, Ov : ovocytes, Tub : tubule digestif. Adapté de Publi 11.

Tous ces éléments suggèrent que cette altération a conduit à une diminution de la capacité digestive, provoquant une diminution des réserves énergétiques et par conséquence une altération des traits de vie (reproduction, croissance). Il faut cependant noter que la diminution de l'absorption alimentaire seule, ne peut justifier l'importance des effets sur la reproduction. La croissance n'étant pas altérée sur le site le plus contaminé, d'autres éléments sont en cause et n'ont pas pu être explorés d'avantage (Figure 14).

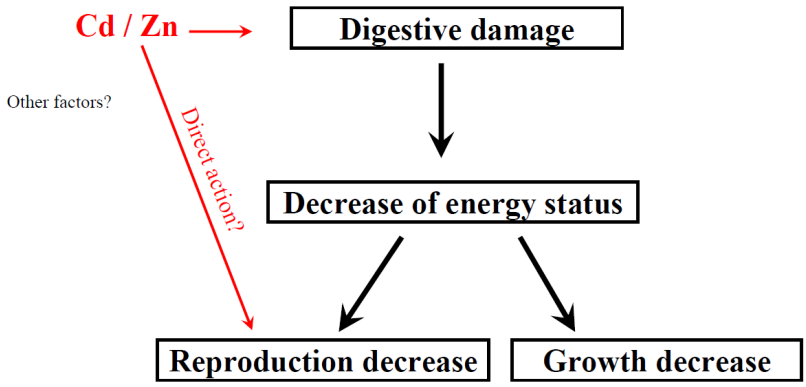


Figure 14: Schéma explicatif des effets observés en cas de contamination métallique

Dans ce cas, l'utilisation de la batterie de marqueurs à différents niveaux d'organisation, a permis de mieux comprendre les mécanismes d'apparition des effets reprotoxiques, même si ceux-ci n'étaient pas d'ordre endocrinien. En revanche, ils n'ont pas permis de les élucider dans leur ensemble et n'expliquent pas l'étendue des effets.

c. Conclusions sur l'application de la démarche intégrée au laboratoire et sur le terrain

Ces quelques exemples ont pour but de montrer l'intérêt de la démarche intégrative qui a été développée chez les gastéropodes au sein du laboratoire. Lorsque j'ai commencé à travailler sur *P. antipodarum*, très peu, voire aucun marqueur n'était disponible (il était alors possible de compter les juvéniles nés, et les embryons dans la poche embryonnaire). Les marqueurs ont pu être développés grâce à de nombreuses collaborations :

- En partenariat avec VetAgro-Sup (T. Buronfosse), j'ai développé des marqueurs basés sur la mesure des stéroïdes sexuels de type vertébrés et sur les réserves énergétiques ;
- avec Environnement Canada (F. Gagné), la mesure des Vn-like ;
- avec mes collègues ou étudiants à IRSTEA, les mesures histopathologiques et transcriptomiques ;
- avec l'équipe TRACES du CNRS (C. Cren-Olivé et thèse d'A. Berlioz-Barbier) des mesures des composés chimiques directement dans les organismes.

Tous ces marqueurs d'effets et d'exposition ont été mis en relation avec les modifications de traits de vie (reproduction, croissance) des organismes afin d'appréhender les effets et l'exposition de manière globale.

Une des qualités et des limites de la démarche intégrative, c'est qu'elle est globale. Il est difficile de lier la variation d'un biomarqueur à celle d'un trait de vie, et dans la batterie de marqueurs étudiés, il est difficile de penser que tous les marqueurs vont aller vers la même conclusion. D'un autre côté, la variation d'un biomarqueur seul n'a pas forcément énormément de sens, biologiquement parlant. Quoiqu'il en soit, peu d'études proposent ce genre d'approche, surtout en situation de terrain.

Ce qui ressort des expérimentations présentées ci-dessus, est que cette démarche permet sinon de comprendre les mécanismes impliqués dans la reprotoxicité, au moins d'avoir des hypothèses sur ces derniers.

Tout l'intérêt de l'histologie est dans l'application de cette démarche intégrée. Les altérations tissulaires, quels que soient les tissus concernés, sont assez « parlantes », et ne nécessitent pas forcément une connaissance approfondie des mécanismes mis en jeu (et particulièrement l'endocrinologie). Une fois la structure tissulaire témoin clairement décrite, les altérations sont facilement identifiables (et souvent plus précoces que l'apparition des effets). Par ailleurs, les modifications histologiques des tissus peuvent permettre de proposer des pistes de mécanismes d'action en ciblant soit les tissus impactés, soit, de manière plus précise, les types cellulaires (comme ça a été le cas pour le mélange de PE ou bien les métaux). En revanche, il faut préciser que c'est un outil fastidieux à mettre en place (en temps de préparation des échantillons et de lecture des plaques), mais extrêmement informatif. Il nécessite tout de même une bonne caractérisation des types cellulaires.

De même, les approches transcriptomiques utilisées ont permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Ces approches sont d'autant plus pertinentes qu'elles sont réalisées conjointement à la mesure d'effets au niveau de l'individu (perturbation de la reproduction). En effet, mesurées seules, les variations d'expression de gènes sont difficiles à rapporter à une réalité biologique. Pour autant, ce n'est pas parce qu'un effet biologique est observé de manière concomitante avec une variation d'expression de gène que les deux sont forcément liés.

La démarche intégrée repose sur des faisceaux de présomptions qui nous permettent de formuler des hypothèses quant aux mécanismes impliqués. Cette démarche, associant la mesure d'effets et d'exposition, est très informative pour relier un effet toxique à un polluant donné (surtout au laboratoire où l'exposition ne se fait pas à de multiples polluants).

L'approche développée ici est relativement complète en ce qui concerne les effets reprotoxiques en lien avec les stéroïdes vertébrés de type sexuels. Pour autant, il reste clair

que beaucoup est encore à faire. Le modèle gastéropode est complexe à utiliser pour ce genre de démarche, sa physiologie étant assez peu connue et très variable suivant les espèces. La physiologie des poissons est bien plus documentée, et donc avoir une démarche intégrative semble plus aisé sur ces espèces, au moins d'un point de vue théorique. Il est très compliqué de comprendre les modes d'action des contaminants lorsque le fonctionnement « normal » n'est déjà pas bien connu.

Il y a peu de gastéropodes sur lesquelles elles soient possibles, puisque assez peu ont été utilisés en écotoxicologie. Outre *P. antipodarum* sur lequel j'ai beaucoup travaillé, *Lymnaea stagnalis* est certainement un de ceux chez qui cela serait le plus aisé. Cet organisme est utilisé depuis de nombreuses années en écotoxicologie par l'INRA, notamment. De nombreux marqueurs ont été développés à différents niveaux d'organisation biologique. Le contrôle peptidique de la reproduction est par exemple un élément beaucoup plus exploré chez cette espèce. Elle a été introduite récemment au laboratoire pour les approches sur la réponse immunitaire, mais jamais les réponses de la limnée et de *P. antipodarum* n'ont été comparées dans des expérimentations similaires à ce qui a pu être fait avec *V. piscinalis*. Ce serait certainement une approche intéressante, d'autant plus que ces deux gastéropodes ont été proposés comme biotests pour l'évaluation des effets toxiques dans le cadre de l'OCDE (OECD, 2010).

Dans le cadre des marqueurs mesurés, il y a le récepteur aux ecdystéroïdes (E75), dont les variations d'expression sont en lien avec la reproduction (Publi 3). Pour autant les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus. Au même titre que des marqueurs peptidiques devraient être développés, l'implication des ecdystéroïdes dans le contrôle de la reproduction devrait être analysée plus en avant.

4. Intérêt des gastéropodes pour l'évaluation des effets reprotoxiques

a. Fenêtre d'exposition critique et effets persistants

Un des intérêts des gastéropodes est la possibilité d'exposer différents stades de vie (embryon, juvénile, adulte) à des polluants, et d'isoler ainsi de potentielles fenêtres d'exposition critiques. Les stades alors exposés sont particulièrement sensibles, et cela peut mener à des effets persistants, qui perdurent une fois l'exposition arrêtée, comme chez les poissons (Brion et al., 2004).

Ces effets persistants après la phase d'exposition, sont très importants à prendre en compte dans le cadre d'une évaluation de risque, puisqu'il n'est pas nécessaire que les individus soient exposés tout au long de leur cycle de vie pour que les effets soient présents.

Nous avons observé ce type de phénomène avec les œstrogèno-mimétiques (Publi 3), lors de l'exposition au mélange de PE (Figure 4C). L'induction de reproduction qui est observée chez des adultes exposés pendant 6 semaines est également observée chez des adultes non exposés, mais dont les phases juvéniles ont, elles, été exposées au mélange, lors du développement de la gonade (Tair-Abbaci and Garric, 2010). Nous avons donc mis en évidence un stade de développement particulièrement sensible qui, une fois exposé, présente des effets irréversibles. Cela correspond à une fenêtre d'exposition critique.

Les gastéropodes utilisés présentent donc l'avantage de pouvoir réaliser ce type d'expérimentations. Elles sont très pertinentes, notamment dans le cadre de l'évaluation des effets reprotoxiques des polluants. Ce sont donc des modèles très adaptés pour l'évaluation des effets moins conventionnels qu'une diminution ou induction de reproduction sur l'adulte.

En revanche, les expérimentations portant sur une phase de développement non sexuellement mature (embryon ou juvénile), et durant jusqu'à la reproduction des adultes, sont lourdes à gérer et chronophages. De plus, chez *P. antipodarum*, qui est ovovivipare, il n'est pas possible d'exposer directement les embryons pendant leur développement (en tous cas, nous n'avons pas développé de méthodologie). Il faut donc exposer les adultes pendant un temps suffisamment long, pour que les juvéniles pondus aient été exposés pendant tout leur développement embryonnaire (Gust et al., 2011a). Une espèce ovipare come *V. piscinalis* (ou *L. stagnalis*) permet des tests sur les stades embryonnaires plus simple (Bandow and Weltje, 2012). L'exposition de juvéniles ou d'adultes ne pose pas de problèmes majeurs, en dehors de la durée d'expérimentation nécessaire (quelques semaines).

b. Effets sur les générations suivantes

Nous avons peu évalué les effets sur les générations filles, issues de parents exposés. Ce type d'effet avait été noté chez *P. antipodarum* lorsque les juvéniles pondus par des adultes exposés à la fluoxétine avaient été directement récupérés et maintenus dans l'eau utilisée à l'élevage (Publi 16). Ces individus ont été exposés à la fluoxétine pendant leur développement embryonnaire seulement. Par rapport à ceux qui n'avaient pas été exposés, ils

ont grandi significativement plus vite et pondu significativement plus tard (et donc plus grands). Ces effets sur la F1 ont permis de formuler des hypothèses, notamment concernant le nombre et la périodicité de mise en place de récepteurs à la sérotonine chez les mollusques (Goldberg and Kater, 1989). Une sensibilité très marquée d'un stade de développement pourrait être le signe d'une forte quantité de récepteurs présents par rapport à un autre stade. Cette hypothèse n'a pas été plus avancée, les travaux engagés s'étant plus orientés vers les stéroïdes sexuels de type vertébrés, que sur le contrôle neuro-endocrinien de la reproduction. Il serait certainement intéressant d'approfondir cette voie dans les années à venir.
Pour autant, les générations suivantes ne sont pas systématiquement impactées chez les gastéropodes : des études menées chez la limnée avec le NP n'ont pas montré d'effet sur la génération fille (Czech et al., 2001).

La durée du cycle de vie des espèces d'étude est assez longue : quelques mois pour avoir la reproduction des F1. Cela implique, ici encore, des contraintes expérimentales fortes, avec des expérimentations sur plusieurs mois. Des organismes à cycle de développement plus rapide (*Daphnia magna* par exemple) pourraient être plus indiqués pour ce type d'explorations. En revanche, il n'est pas certain que les sensibilités aux polluants soient équivalentes.

c. Sensibilité interspécifique

L'intérêt qui avait été soulevé lorsque les gastéropodes ont été choisis comme modèles d'étude, résidait en partie dans leurs modes de reproduction divers (sexes séparés, hermaphrodisme, parthénogénèse). Il avait été supposé qu'il en résulterait des effets variés aux polluants reprotoxiques. Leur différence de sensibilité sera abordée dans le chapitre sur l'évaluation de la qualité des écosystèmes, mais au cours des expérimentations, une différence d'effets a aussi été notée.
Ainsi, lors de l'exposition aux mélanges de PE (Publi 3), il a déjà été évoqué que les effets étaient opposés entre l'espèce femelle (*P. antipodarum*) et l'espèce hermaphrodite (*V. piscinalis*). En se basant sur nos expériences, et sur des études précédentes sur ces deux espèces (Gagnaire et al., 2009a), l'hypothèse a été émise que cette différence d'effets venait du fait que *V. piscinalis* possédait une partie mâle dans ses gonades, alors que *P. antipodarum* non. Les effets histologiques étaient en cette faveur, les tissus mâles étant impactés de manière plus précoce et plus importante que les tissus femelles. Dans ce cas, le mode de reproduction des organismes est clairement lié aux différences d'effets observés.

Une autre expérience avait été réalisée avec de la fluoxétine (Publi 16). Elle a également montré des effets opposés, avec une induction de reproduction aux faibles concentrations chez *P. antipodarum* et une diminution aux fortes concentrations, et aucun effet significatif chez l'espèce hermaphrodite. Des différences d'effets sont encore présentes sur les individus issus de parents exposés : différence de croissance, d'âge et de taille à la première reproduction chez des adultes issus de parents exposés chez *P. antipodarum*, alors que rien n'est observé chez *V. piscinalis*. Plusieurs hypothèses ont été proposées, notamment sur l'exposition et la métabolisation de la fluoxétine en un métabolite actif, ce qui a été évalué par la suite (Publi 4). Une autre hypothèse proposée portait sur les récepteurs à la sérotonine, dont le nombre, la localisation et la période d'apparition pourraient être différents suivant les espèces (Goldberg and Kater, 1989). Ces récepteurs sont la cible biologique de la fluoxétine (inhibiteur de la recapture de la sérotonine). Une différence de nombre et de moment d'apparition de ces récepteurs pourrait donc être à l'origine des effets (et de la sensibilité) différents suivant les espèces. Contrairement à l'exemple précédent, dans cette expérimentation, la différence d'effets ne semble donc pas imputable aux modes de reproduction distincts.

Dans tous les cas, d'un point de vue « mécanistique », nos expériences montrent que le choix des espèces d'études a une importance capitale : des effets totalement opposés sont mesurés alors que les expositions se font conjointement, dans des conditions strictement similaires et aux mêmes polluants.

d. Conclusion sur la compréhension des effets reprotoxiques

En conclusion, les modèles gastéropodes utilisés sont pertinents pour l'évaluation des effets reprotoxiques des polluants (Tableau 1) : la combinaison des différents marqueurs d'effets et d'exposition permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués. Ce sont également des espèces sensibles aux PE (Matthiessen, 2008; Oehlmann et al., 2007).

Des études, notamment sur *Marisa cornuarietis*, ont été réalisées par d'autres équipes pour caractériser les effets du BPA, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le syndrome de « super-féminisation » observé. Les auteurs avaient conclu que le BPA avait un rôle d'agoniste de l'ER-like (Oehlmann et al., 2006). Cette étude est une des rares présentant une démarche explicative des effets reprotoxiques des polluants chez les gastéropodes. Les études présentées dans ce manuscrit sont dans la même lignée et tentent d'aborder une démarche intégrative, à la fois sur les effets et leur compréhension, mais également sur l'exposition (évaluation chimique, stades biologiques, choix d'espèces…). Ce qui en ressort,

est qu'elle est applicable à la fois au laboratoire et sur le terrain, qu'elle est très informative, mais dans la limite des marqueurs disponibles.

Tableau 1: Avantages et inconvénients des gastéropodes d'eau douce pour l'évaluation des effets reprotoxiques

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Sensibilité aux PE	
Modes de reproduction variés	
Exposition des différents stades de vie possible	
	Peu de connaissances sur la physiologie de la reproduction (schéma de contrôle endocrinien ?)
Diversité des hormones impliquées dans le contrôle de la reproduction (stéroïdiennes, peptidiques…)	
	Effets parfois contradictoire
	Durée du cycle de vie
Développement de marqueurs (relativement aisé et diversifiés mais signification biologique pas toujours claire)	

En effet, la plupart des marqueurs qui ont été développés se sont basés sur l'hypothèse d'un contrôle, pour le moins partiel, de la reproduction des mollusques par les stéroïdes de type vertébrés. Or, cette hypothèse, bien qu'étayée par un faisceau de preuves (Matthiessen, 2008), reste très controversée (Scott, 2012; Scott, 2013). Les résultats que nous avons obtenus, notamment en laboratoire avec le mélange de PE (Publi 3), suggèrent néanmoins que les stéroïdes jouent un rôle, même s'il reste à préciser. Il est cependant évident que d'autres facteurs sont impliqués, notamment, peptidiques. Les variations d'expression du gène codant pour le récepteur aux ecdystéroïdes suggèrent une implication des ecdystéroïdes dans le contrôle de la reproduction. Ici encore c'est une hypothèse à explorer.

Ainsi, afin d'améliorer la démarche proposée, il conviendrait d'approfondir la compréhension de la physiologie de la reproduction des organismes d'études. Nos résultats ont confirmé l'intérêt d'utiliser des modes de reproductions différents. Toutefois, cela implique également des contrôles endocriniens différents, ou du moins des variations dans le schéma de base, et donc de la complexité supplémentaire. La limite majeure de la démarche intégrative réside dans ce manque de connaissance. Des variations de marqueurs sont observées, et des hypothèses sont émises, mais au final, il n'y a que très rarement des certitudes.

L'introduction de nouvelles techniques, comme la génomique, ou la protéomique, aiderait certainement à mieux comprendre la physiologie des organismes. Il est fort possible que notre vision de leur physiologie, soit biaisée par ce qui est connu chez d'autres espèces. Cela pourrait limiter notre « imagination » pour concevoir des voies de signalisation ou de contrôle totalement différentes de ce qui est connu par ailleurs. Un des défis, et des intérêts, majeur de l'utilisation des gastéropodes en écotoxicologie se trouve dans cette part d'inconnu et de créativité. Il faudrait se donner les moyens technologiques, d'aller plus loin, et ne pas se limiter. C'est un projet ambitieux, mais qui, il me semble ferait certainement évoluer la vision et surtout la compréhension des effets reprotoxiques.

B / IMMUNOTOXICITE ET POLLUANTS

1. Contexte

Pour rappel, une part importante des pollutions (médicaments, hormones, plastifiants, sous-produits industriels, métaux…) entrant dans les systèmes aquatiques d'eau douce se fait par le biais des rejets urbains, via les effluents de STEP. Ils contiennent de nombreux polluants en particulier organiques, tels que des détergents, des PE, des médicaments et produits d'hygiène, ainsi que des métaux lourds (Kolpin et al., 2002). Nos travaux (Publis 1, 2, 6, 11, 12, 18, 19), ainsi que ceux d'autres auteurs ont mis en évidence la pression exercée par les effluents de STEPs sur les organismes du milieu (poisson, invertébrés) récepteur en particulier sur leur reproduction (Jobling et al., 2003). Cependant, les effets ne se limitent pas à de la reprotoxicité. D'autres fonctions physiologiques peuvent être affectées. En effet, il a été montré que les effluents municipaux pouvaient induire des modifications du statut immunitaire, notamment chez les bivalves (Akaishi et al., 2007; Bouchard et al., 2009; Farcy et al., 2011; Gagne et al., 2011; Gagné et al., 2011; Gagne et al., 2008). Ainsi, les effluents ont des conséquences sur les systèmes de défenses des organismes (réponse au stress et système immunitaire). L'altération de ces systèmes de défense a, par la suite, des effets potentiels sur la fitness et la capacité de résistance des organismes aux pressions environnementales (sensibilité aux infections, aux polluants…).

2. Système de défense des mollusques

Chez les mollusques, la majorité des études sur le système de défense immunitaire et contre le stress a été faite sur des espèces commerciales de bivalves marins. Peu d'études ont été réalisées sur les gastéropodes et elles concernent majoritairement l'ormeau (milieu marin), également une espèce commerciale (De Zoysa et al., 2010a; De Zoysa et al., 2010b; De Zoysa et al., 2008; De Zoysa et al., 2009; De Zoysa et al., 2010c) et la limnée (milieu d'eau douce), hôte intermédiaire de parasites (Russo and Lagadic, 2000; Russo and Lagadic, 2004; Russo et al., 2007; Russo and Madec, 2007; Russo et al., 2008 et Publis 2, 6, 7). Les études sont surtout ciblées pour améliorer les performances d'élevage ou de contrôle des parasites, mais très peu pour évaluer les effets de toxiques environnementaux sur les systèmes de défenses.

Je n'ai pas travaillé directement sur la caractérisation du système de défense des mollusques. Je me suis intéressée aux effets de médicaments sur la réponse immunitaire *in vitro* chez une

moule d'eau douce (Publi 8) et *in vivo* sur la limnée (Publi 7), et aux effets d'effluents municipaux sur la limnée (Publis 2 et 6). En revanche, il m'apparaît nécessaire de décrire un minimum le système de défense des mollusques en me basant sur la littérature disponible, afin de permettre une meilleure compréhension des expérimentations.

La réponse au stress est indissociable du système immunitaire. En effet, tout stress induira une modulation de la réponse immunitaire. La réponse aux stresseurs de l'environnement, chimiques et biologiques, est médiée par les hémocytes, car ce sont les cellules productrices de médiateurs de stress et de la réponse immunitaire majoritaire (van der Knaap et al., 1993). Il existe des différences importantes du système immunitaire chez les mollusques, suivant les espèces, bien que les types cellulaires soient partagés (Hooper et al., 2007). Seule la réponse innée est présente chez les invertébrés, par opposition à la réponse immunitaire acquise chez les vertébrés, basées sur les anticorps (Galloway and Depledge, 2001).

a. Système de réponse au stress

Chez les mollusques, et notamment les gastéropodes, les molécules de réponse au stress sont comparables à celles des mammifères : CRH (corticotropine releasing hormones), qui induit l'ACTH (adrenocorticotrophic hormone), qui induit à son tour des réponses secondaires transitoires via des molécules cytokines-like, des amines biogéniques (noradrénaline, adrénaline et dopamine) et des molécules de type cortisol. Elles induisent l'augmentation de mobilité des hémocytes, de l'activité phagocytaire, la nitrite oxide synthétase (NOS), également impliqués dans la défense immunitaire. Ces effets dépendent des espèces (mais le mécanisme reste identique) (Hooper et al., 2007). Ce sont donc des réponses pertinentes, car elles induisent les réponses immunitaires et sont plus précoces. Cependant, elles sont encore moins spécifiques, puisqu'elles sont activées par un stress (quelle qu'en soit la nature), et non pas par des pathogènes.

b. Système immunitaire

Le système immunitaire des mollusques est constitué d'une composante cellulaire, mais privée de système lymphoïde (lymphocytes et immunoglobulines). Il s'appuie sur des cellules spécialisées et se comporte comme un système de réponse immunitaire inné. Les hémocytes représentent le type cellulaire de défense majoritaire. Il existe principalement deux types de cellules immunocompétentes : les granulocytes et les hyalinocytes (Donaghy et al., 2009; Russo and Lagadic, 2000; Travers et al., 2008).

D'un point de vue fonctionnel, les granulocytes et les hyalinocytes sont capables de chimiotactisme, reconnaissance d'antigène, accrochage suivi d'agglutination, de phagocytose et d'élimination des facteurs en cause par des mécanismes oxydatifs (induction de ROS intracellulaires), augmentation de l'activité lysosomiale ou de l'exocytose. Ce sont donc des cellules entièrement compétentes pour la destruction des germes pathogènes invasifs, ce qui en fait des modèles pertinents pour l'étude des défenses immunitaires. La fonction la plus efficace pour l'élimination des pathogènes, reste la phagocytose, suivie du burst oxydatif (Galloway and Depledge, 2001). Le stress oxydant engendré par la phagocytose est aussi un marqueur de la réponse immunitaire.
Il est donc possible de développer des marqueurs fonctionnels de suivi de la réponse immunitaire, comme la phagocytose, le burst oxydatif, l'activité lysosomiale…

La réponse immunitaire se base sur une reconnaissance non spécifique des antigènes par des récepteurs (Pathogen Recognition receptor, PRR) (Kawai and Akira, 2009), suivie d'une cascade de signalisation reposant sur les MAPK, et induisant la réponse immunitaire à proprement parler (phagocytose et burst oxydatif) (Lacchini et al., 2006; Plows et al., 2006). Cela est associé à des voies de signalisation extra-cellulaires de type cytokines, ainsi qu'à l'induction des molécules de défense (peptides antimicrobien…) (De Zoysa et al., 2010a; Hoek et al., 1996).
De la même façon que des marqueurs fonctionnels peuvent être disponibles, des marqueurs ciblés sur le contrôle de la réponse immunitaire (reconnaissance, voies de signalisation et de communication intra et inter-cellulaires) ou sur les molécules de défense produites sont à développer. L'association de tous ces types de marqueurs permet d'appréhender la réponse dans son ensemble et de comprendre les mécanismes impliqués.

3. Marqueurs développés

Lorsqu'il a été décidé de travailler sur la réponse immunitaire en écotoxicologie chez les gastéropodes d'eau douce, il a fallu choisir une nouvelle espèce de travail : les espèces sur lesquelles je travaillais jusque là présentaient le défaut majeur d'être de petite taille, et donc possédant de très faibles volumes d'hémolymphe. Afin de travailler en cytométrie de flux et d'être capable d'évaluer la capacité de phagocytose, base de la réponse immunitaire, il me fallait trouver une espèce de taille supérieure.

Lymnaea stagnalis est un gastéropode d'eau douce, représentatif des habitats lentiques, de grande taille (plutôt 5cm que 5mm), présent dans les écosystèmes tempérés. Cette espèce avait été utilisée pour évaluer les effets des pesticides sur la réponse immunitaire (Russo and Lagadic, 2000; Russo and Lagadic, 2004). La limnée se prête aisément à la collecte d'hémolymphe de manière non invasive à plusieurs reprises au cours de l'expérimentation (Sminia, 1972). Il est donc possible de mesurer plusieurs paramètres fonctionnels en cytométrie de flux (Publis 6, 7), tels que la phagocytose, la production de ROS, de thiols… Par ailleurs, de nombreuses ressources génomiques sont disponibles chez cette espèce, permettant de mesurer l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire directement sur les hémocytes.

Lors de ma mission à Environnement Canada, je me suis donc formée à la cytométrie de flux, en collaboration avec l'INRS-IAF et l'équipe de M. Fournier, d'abord sur un bivalve (Publi 8) et ensuite sur la limnée (Publis 6 et 7). Nous avons développé (avec ces collaborations et lors du post-Doc de M. Gélinas) des marqueurs en cytométrie de flux et des marqueurs génomiques.

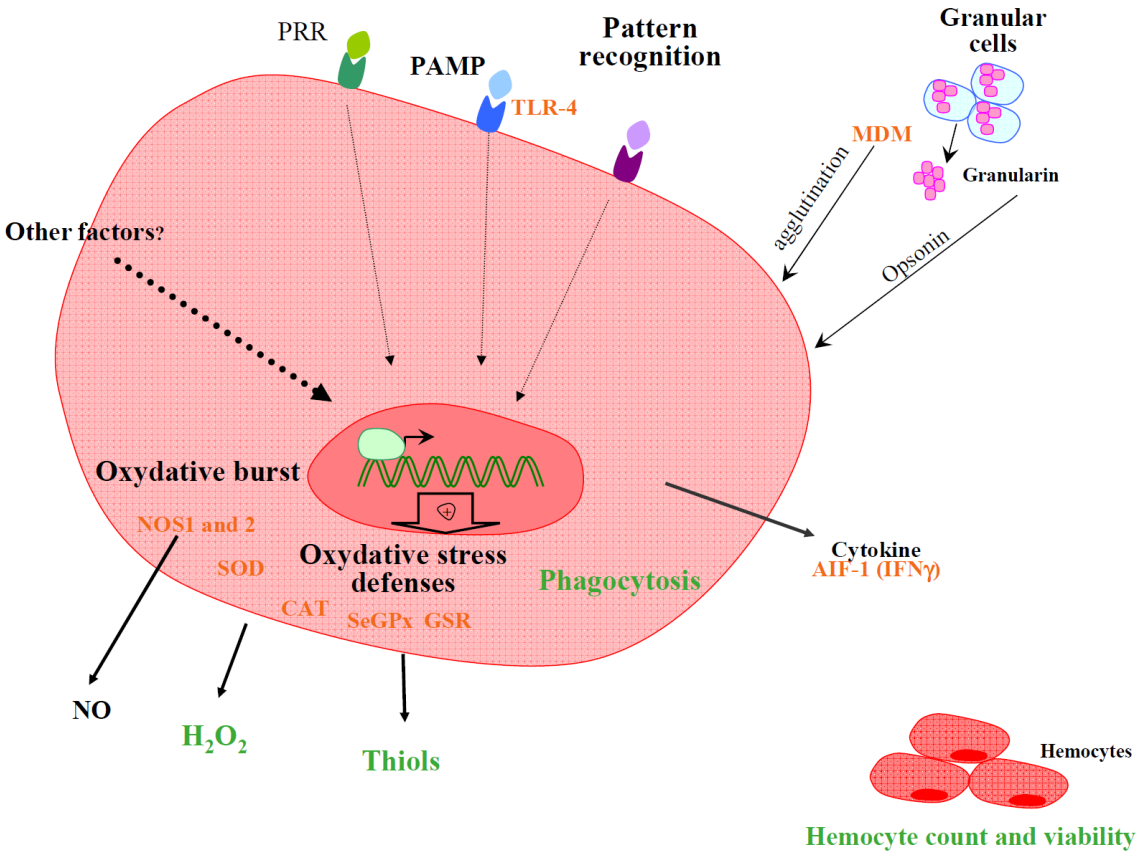


Figure 15: Représentation schématique des marqueurs disponibles en immunotoxicité chez la limnée. En vert les marqueurs en cytométrie de flux, en orange ceux en RT-qPCR. AIF-1: allograft inflammatory factor, CA: catalase, GSR : gluthathion reductase, MDM: molluscan defensive molecule, NO : oxyde nitrique, NOS : nitric oxide synthase, PAMP : pathogen associate molecular pattern, PRR : pathogen recognition receptor, SeGPX: Gluthathion peroxidise selenium-dépendante, SOD; superoxide dismutase, TLR4: toll-like receptor 4

a. Cytométrie de flux

Sur cette espèce, avec l'aide de M. Fortier de l'INRS-IAF, j'ai développé des marqueurs fonctionnels en cytométrie de flux, qui ont été appliqués aussi bien sur le bivalve que sur le gastéropode (en vert sur la Figure 15):

- nombre d'hémocytes
- viabilité des hémocytes,
- capacité de phagocytose,
- production de thiols
- production de ROS (sous forme d'H_2O_2).

La figure 16 montre ces différents marqueurs en cytométrie de flux.

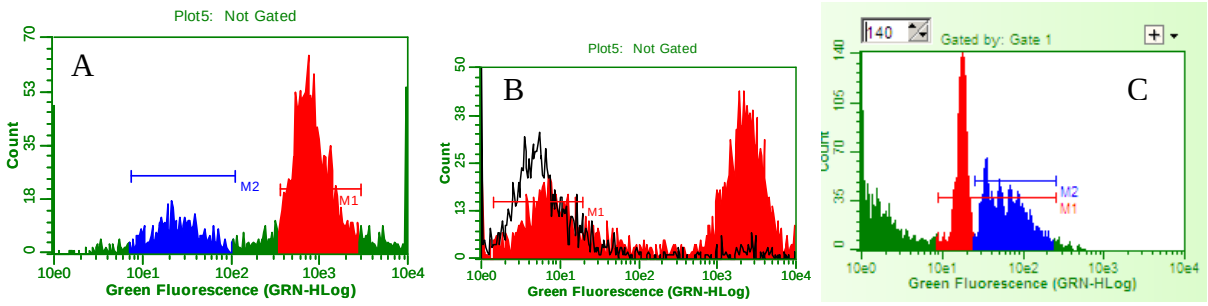


Figure 16: Exemples de marqueurs en cytométrie de flux. A: ROS, B: thiols (avec le témoin négatif en noir), C: phagocytose (M1: immunocapacité, M2: immunocompétence)

b. Immuno-toxicogénomique

Par ailleurs, j'ai développé des marqueurs génomiques basés sur l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans différentes fonctions immunitaires (en orange sur la Figure 15).

α Réponse au stress

L'élimination rapide des ROS est essentielle pour la survie des organismes, ce qui explique la mesure de marqueurs de stress oxydatif lorsque l'on évalue l'inflammation provoquée par la réponse immunitaire. Le système de stress oxydatif est composé de superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) et glutathione reductase (GSR). Le Gluthation (GSH) permet l'élimination des radicaux libres et joue un rôle important dans le maintien de la balance redox des protéines avec des groupes –SH.
Les HSP (Heat-shock proteins) sont des protéines de stress qui sont induites par de nombreux facteurs. Elles sont impliquées dans la protection cellulaire et la survie (Das et al., 1995).
L'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress mesurée porte donc sur : SeGPx, GSR, CAT, SOD et HSP70.

β Réponse cellulaire

Le NO est produit par des NOS dans les hémocytes lors de la phagocytose, et réagit avec l'H_2O_2 pour former le peroxynitrite, un bactéricide très actif (Gourdon et al., 2001). De plus, tout comme chez les vertébrés, le NO serait un immunomodulateur, et sert de médiateur pour les effets des oestrogènes et des opioïdes dans l'immunité et l'inflammation (Stefano et al., 2000).
La limnée présente deux isoformes de NOS, dont nous avons mesuré l'expression (NOS1 et NOS2).

χ Réponse humorale

L' AIF-1 (allograft inflammatory factor-1) est un interferon-like (IFN-γ) qui a été cloné chez les gastéropodes (De Zoysa et al., 2010a). C'est un modulateur de la réponse immune lors de l'activation de la phagocytose. Il joue un rôle significatif non seulement dans les réactions de défense immunitaire, mais également dans les différentes réponses aux stimuli inflammatoires.

Le MDM (molluscan defence molecule) présente des similarités avec l'hémolin, une immunoglobuline d'insecte. Son expression est régulée principalement lors de parasitose. Elle joue le rôle de médiateur dans la reconnaissance du non-soi. Elle active les réponses cellulaires pour éliminer les cellules ou particules étrangères par agglutination (Hoek et al., 1996).

L'expression de ces deux gènes a été mesurée.

δ Reconnaissance antigénique

La famille des TLR (Toll-like receptor) est la classe la mieux caractérisée de PRR (pattern recognition receptors), qui sont impliqués dans la détection de PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) variés, dont les lipopolysaccharides (LPS; détectés par le TLR4) et d'autres molécules biogéniques comme les peptides ou l'ADN. La reconnaissance de ces structures moléculaires est couplée à plusieurs réponses fonctionnelles, incluant la phagocytose (Iwasaki and Medzhitov, 2004).

L'expression du gène codant pour le TLR4 a été mesurée.

L'intérêt des marqueurs suivis est l'association de marqueurs fonctionnels à des marqueurs génomiques. Cela permet la prise en compte de l'ensemble de la réponse immunitaire, depuis la reconnaissance des pathogènes (TLR4), jusqu'à la réponse fonctionnelle finale, la phagocytose, avec la gestion du stress oxydatif induit, en passant par la communication intercellulaire (AIF-1) et les molécules de défense développées par l'organisme (MDM).

Tous ces marqueurs (en cytométrie et génomiques) sont mesurés sur un seul et même individu dont l'hémolymphe est prélevée de manière non-invasive.

4. Intérêt de l'étude de la réponse immunitaire

Le temps dévolu à l'approche immunotoxique a été moindre que celui de l'approche reprotoxique, ce qui explique que la démarche est moins aboutie. La thèse de Paul Boisseaux, qui a démarré en novembre 2013, devrait apporter beaucoup et permettre d'avoir plus de recul. Quoiqu'il en soit, en écotoxicologie d'eau douce, l'évaluation des toxiques sur la réponse immunitaire de gastéropode n'a été réalisée que chez la limnée, au départ sur des pesticides (Russo and Lagadic, 2000; Russo and Lagadic, 2004) et plus récemment sur des effluents urbains et des mélanges médicamenteux (Publis 2, 6, 7).

a. Corrélation des réponses fonctionnelles et génomiques

Les réponses suivies lors d'exposition aux pesticides ont été uniquement fonctionnelles (densité d'hémocytes, phagocystose, burst oxydatif, NRRT…), alors que nous avons inclus les réponses génomiques lors de nos études, de manière à faire le lien entre les deux. Nous avons d'ailleurs pu montrer une bonne corrélation entre ces deux types de réponses lors d'une exposition de 7 jours à l'effluent de la station d'épuration de Montréal (Publi 6, Figure 17). Les gènes ont été regroupés suivant leur fonction (reconnaissance d'antigènes, réponse humorale ou cellulaire, réponse au stress ou anti-oxydante). Chaque groupe a été corrélé par une analyse canonique avec les réponses fonctionnelles. La corrélation est la plus forte entre les réponses au stress (r^2=0.97) et de reconnaissance d'antigène (r^2=0.84). Cette étude a donc permis de montrer que le couplage des approches génomiques et fonctionnelles était physiologiquement cohérent, et que nous intégrions bien la réponse immunitaire dans son ensemble.

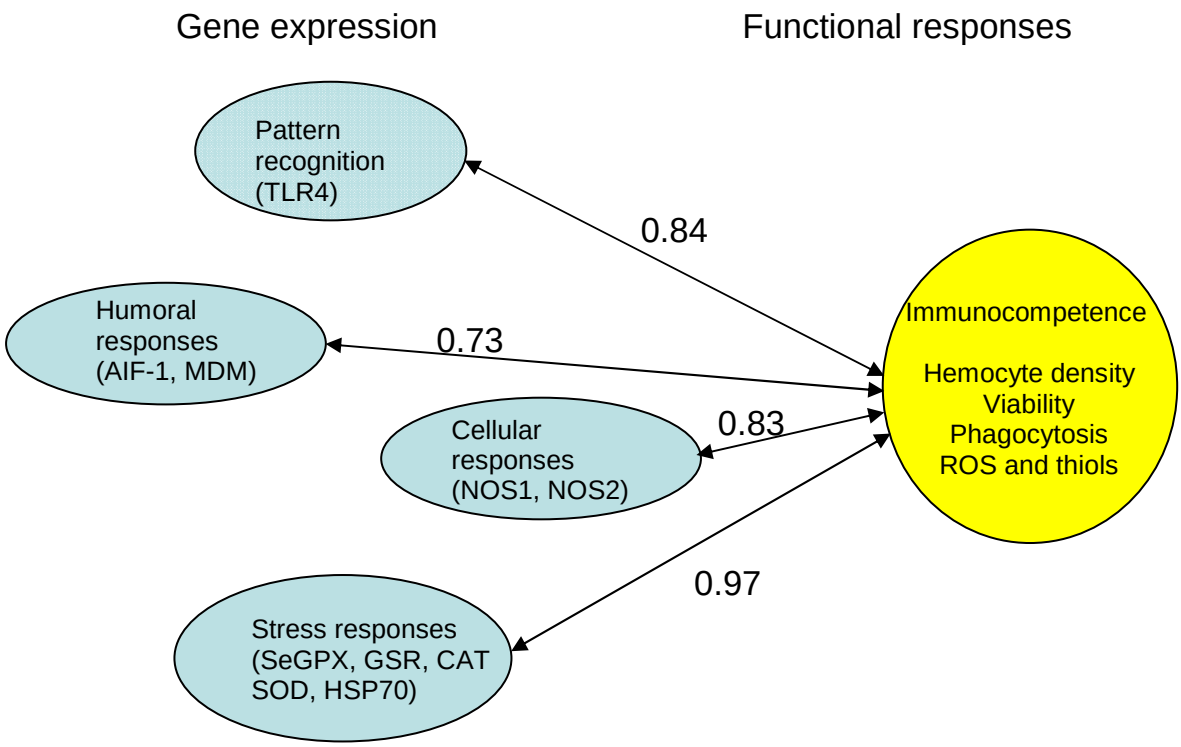


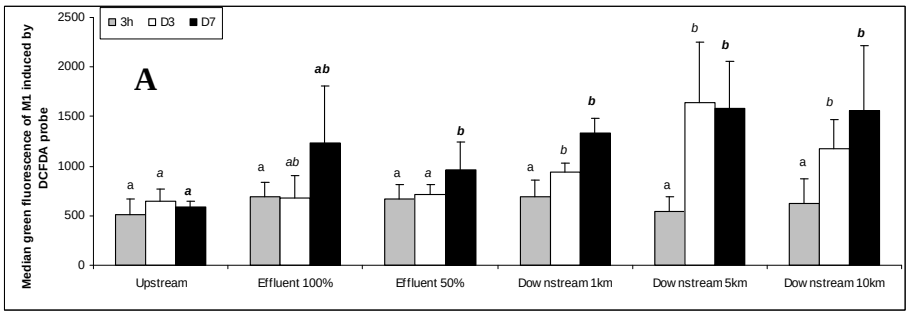
Figure 17: Analyse canonique entre les marqueurs génomique d'immunotoxicité regroupés par fonction et les marqueurs de réponse immunitaire fonctionnels. Issu de Publi 6

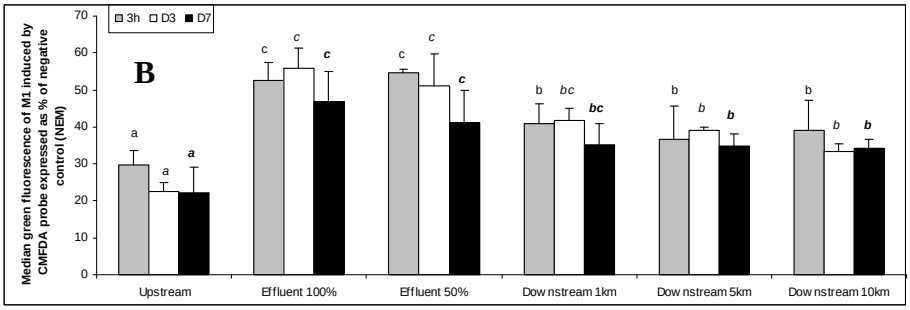
b. Effluent urbain et réponse immunitaire

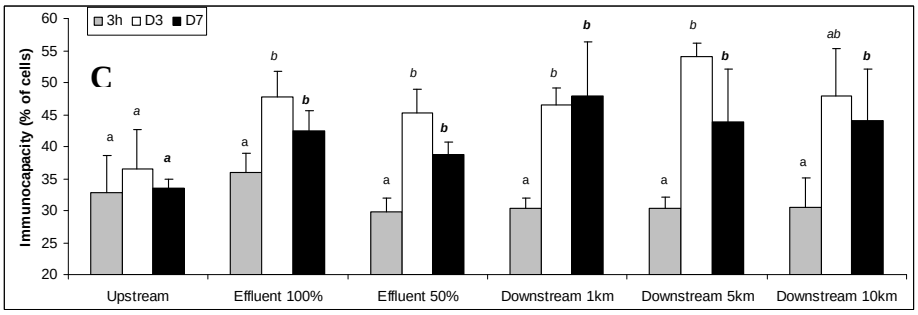
α Effets à court-terme

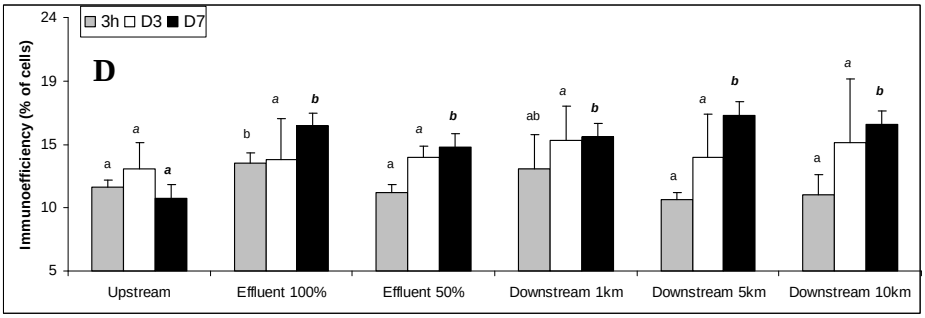
Une étude de 7 jours sur l'effluent de Montréal a également montré que la réponse immune était impactée par ce dernier (Publi 6). La phagocytose et les niveaux de ROS sont augmentés de manière dose-dépendante, alors que les niveaux de thiols sont diminués, indiquant une induction de la réponse immune fonctionnelle. En parallèle, l'expression des gènes TLR4 (reconnaissance du LPS), SeGPx et CAT (stress oxydant) et HSP70 (stress) a été induite (Figure 18), confirmant l'altération de la réponse immune.

Nous avons montré une corrélation entre les effets observés et la charge bactérienne de l'effluent. Les effets sont donc principalement dus aux pathogènes présents dans l'effluent. Cependant, l'effluent de Montréal est connu pour sa charge en toxiques (et notamment en médicaments). L'objectif premier de la réponse immunitaire est la défense contre les pathogènes, mais notre étude suggère que la charge en polluant module également la réponse.


3h D3 D7
A
Median green fluorescence of M1 induced by DCFDA probe
2500
2000
1500
1000
500
0
Upstream
Effluent 100%
Effluent 50%
Dow nstream 1km
Dow nstream 5km
Dow nstream 10km


3h D3 D7
B
Median green fluorescence of M1 induced by CMFDA probe expressed as % of negative control (NEM)
70
60
50
40
30
20
10
0
Upstream
Effluent 100%
Effluent 50%
Dow nstream 1km
Dow nstream 5km
Dow nstream 10km


3h D3 D7
C
Immunocapacity (% of cells)
60
55
50
45
40
35
30
25
20
Upstream
Effluent 100%
Effluent 50%
Downstream 1km
Downstream 5km
Downstream 10km


3h D3 D7
D
Immunoefficiency (% of cells)
24
19
15
10
5
Upstream
Effluent 100%
Effluent 50%
Downstream 1km
Downstream 5km
Downstream 10km

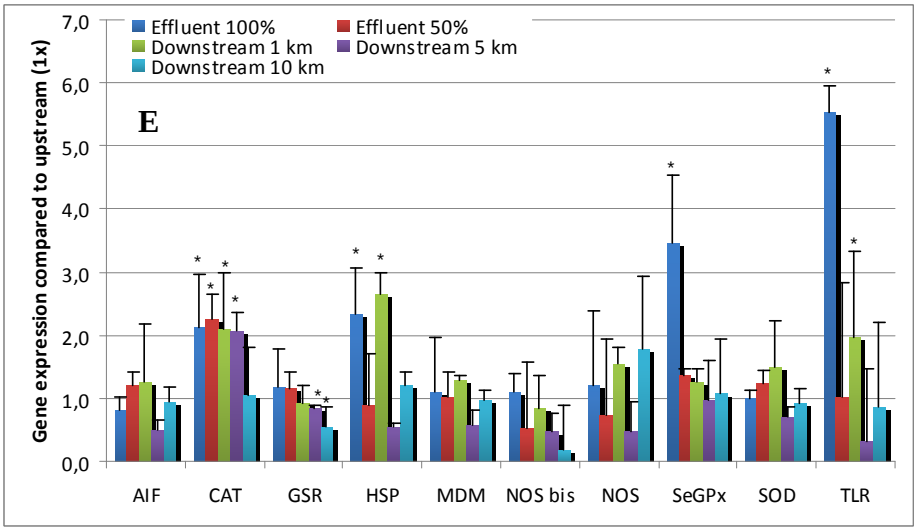


Figure 18: Effets de l'effluent de Montréal sur la réponse immunitaire de la limnée. A:production de ROS, B : niveaux de thiols intracelllulaires, C : immunocapacité (phagocytose d'une bille ou plus), D : immunocompétence (phagocytose de deux billes ou plus), E : expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (1x correspondant à l'amont). Adapté de Publi 6

β Effets à moyen terme

Afin de mieux caractériser les effets d'effluents urbains sur la réponse immunitaire, une autre expérimentation a été réalisée lors du Post-Doc de J. Faburé et du Master de A. Hubert-Louis (Publi 2). Elle a permis d'évaluer la persistance des effets génomiques lors d'expositions plus longues (28 jours) à un rejet de station d'épuration. Ici encore, l'effluent induit des modifications significatives d'expression de gènes. Il a des propriétés inflammatoires et induit du stress oxydatif persistant. Des corrélations significatives (Figure 19) sont notées entre les gènes impliqués dans les défenses anti-oxydantes (CAT, SOD, GSR, SeGPx), dans la reconnaissance d'antigènes et la réponse humorale (TLR4, AIF-1, MDM), et le stress cellulaire (HSP70).

Il ressort de ces études qu'il faut maintenant évaluer les conséquences à plus long terme de ces expositions à des effluents, notamment au niveau physiologique (reproduction, croissance…)

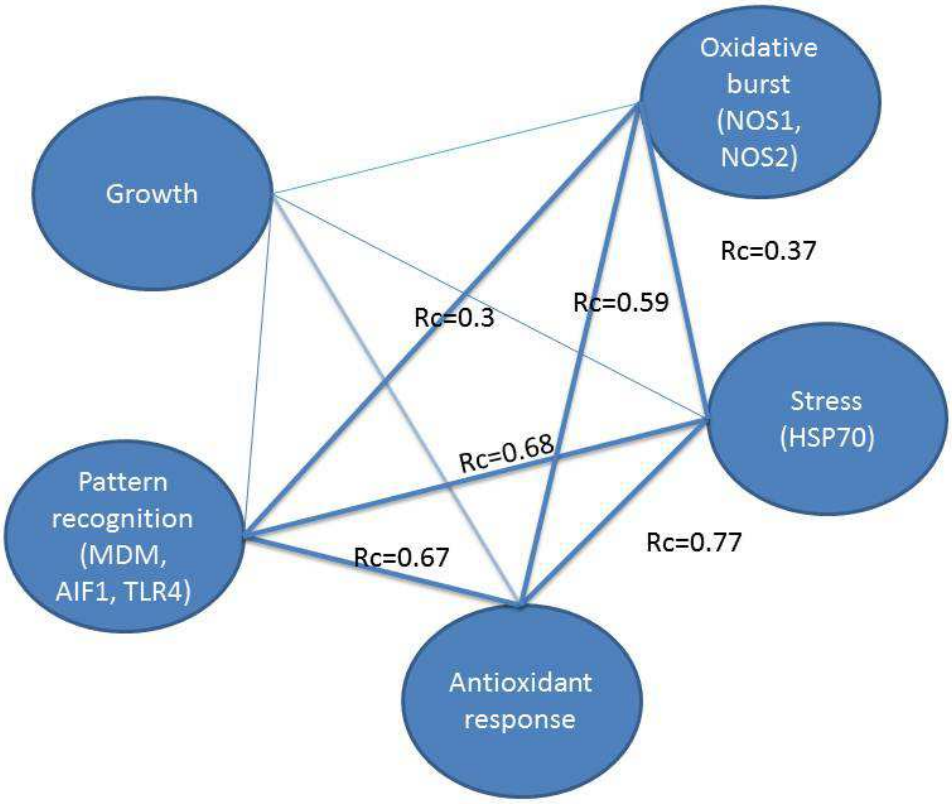


Figure 19: Analyse canonique montrant les corrélations entre l'expression de gènes regroupés par fonctions prédictives, et la croissance de limnée exposées à un effluent urbain. Les lignes en gras indiquent des corrélations significatives (p<0.01).

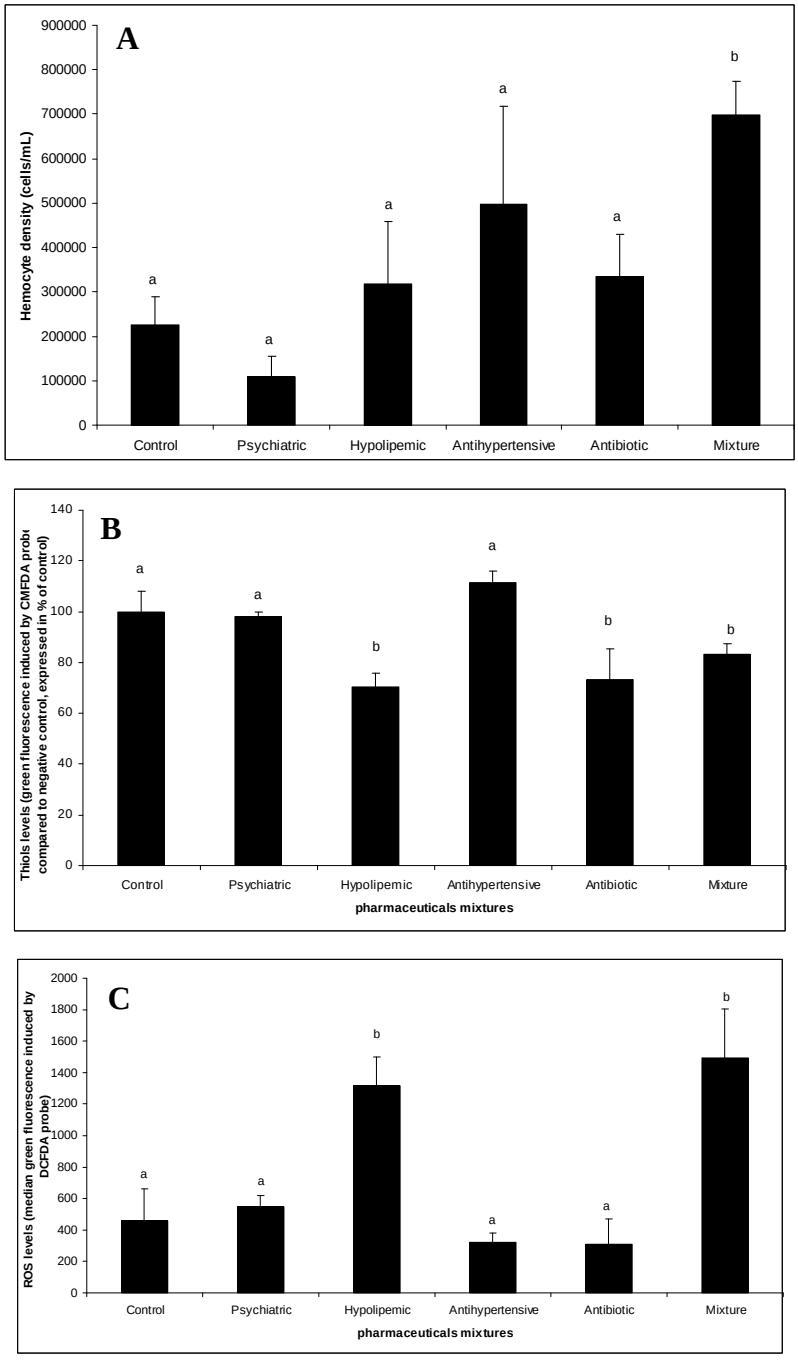
c. Réponse immunitaire et médicaments

α Chez la limnée

L'implication des toxiques, et plus particulièrement des médicaments, a été évaluée dans une deuxième série d'expérimentation, où les mêmes marqueurs, chez le limnée, ont été mesurés suite à une exposition de 3 jours à des mélanges de médicaments regroupés par classe thérapeutique, à des concentrations environnementales (Publi 7).

Les mélanges testés étaient de composés de médicament utilisés pour des traitements psychiatriques (venlafaxine, carbamazepine, diazepam), antibiotiques (ciprofloxacine, erythromycine, novobiocine, oxytetracycline, sulfamethoxazole, trimethoprime), hypolipémiants (atorvastatine, gemfibrozil, benzafibrate), anti-hypertensifs (atenolol, furosemide, hydrochlorothiazide, lisinopril), ainsi que le mélange global de tous ces composés. La réponse immunitaire est affectée de manière différentielle par les mélanges comparée au mélange global (Figure 20). Ce dernier provoque une augmentation du nombre

d'hémocytes, du niveau de ROS et de l'activité de phagocytose, et une diminution des thiols intracellulaires. L'expression du gène codant pour le TLR4 est la plus induite, notamment par le mélange psychiatrique (x19), alors que celle des gènes codant pour l'AIF-1, la GSR et la CAT est diminuée.



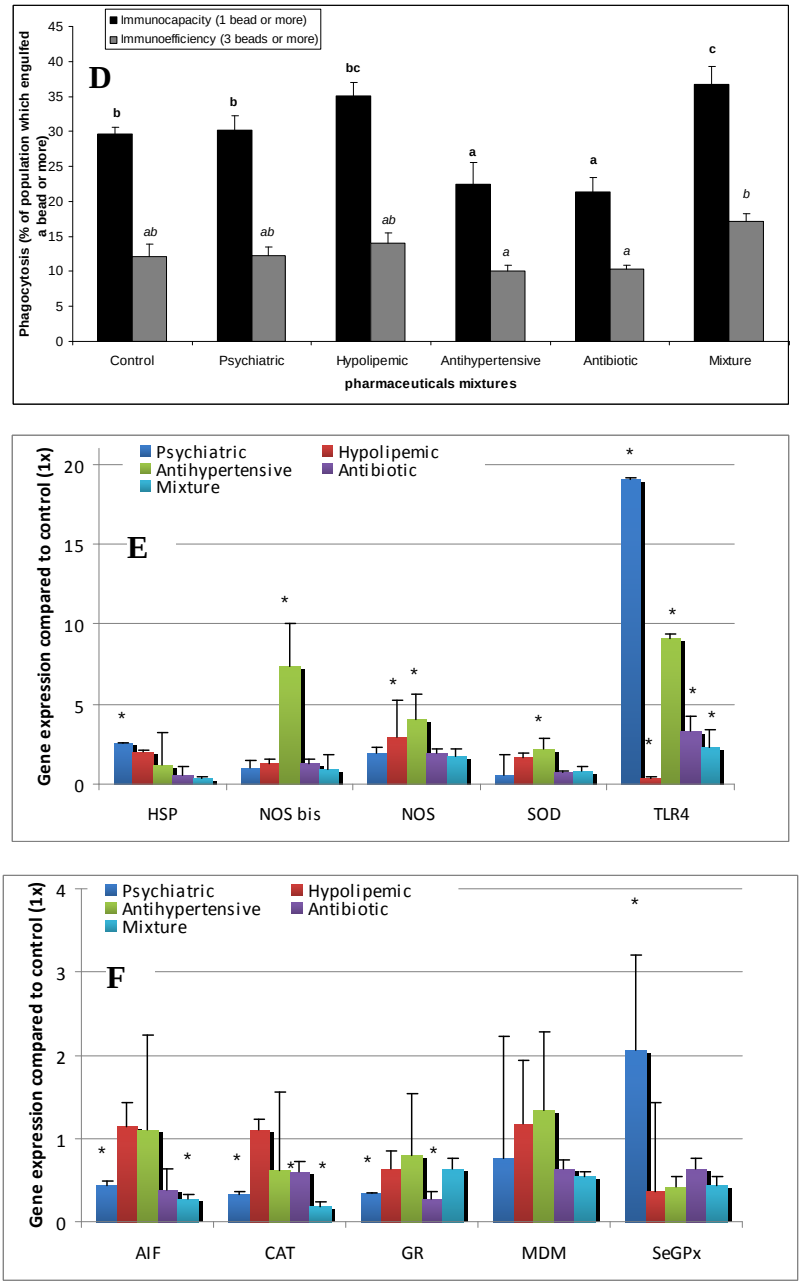


Figure 20: Effets de mélanges de médicamments sur la réponse immunitaire de la limnée. A : densité cellualire ; B : niveaux de thiols intracelllulaires, C : production de ROS, D : immunocapacité (phagocytose d'une bille ou plus) et immunocompétence (phagocytose de deux billes ou plus), E et F : expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (1x correspondant à l'amont). Adapté de Publi 7

Les effets observés, suite à l'exposition au mélange global, sont du même type que ce qui est obtenu avec l'effluent, ce qui suggère que les médicaments sont responsables en partie des effets de l'effluent. Ainsi, en faisant une analyse en arbre décisionnel (Figure 21A), les effets du mélange complexe sont le plus proches de celui de l'effluent. De plus, le mélange d'antibiotiques est celui qui provoque des réponses les plus proches de celles du mélange global. Les réponses de marqueurs qui ont le plus de poids d'un point de vue prédictif (Figure

21B) sont l'expression de certains gènes (TLR4, GSR, CAT, AIF-1). Les schémas de réponse obtenus avec les différents mélanges étaient distincts, laissant supposer des signatures spécifiques des types de médicaments. L'exemple le plus marquant est la très forte induction de l'expression du gène codant pour le TLR4, observée avec le mélange psychiatrique. Il semblerait que l'expression de ce gène puisse être régulée par ce type de composés, comme chez les vertébrés (Hutchinson et al., 2010a; Hutchinson et al., 2010b).

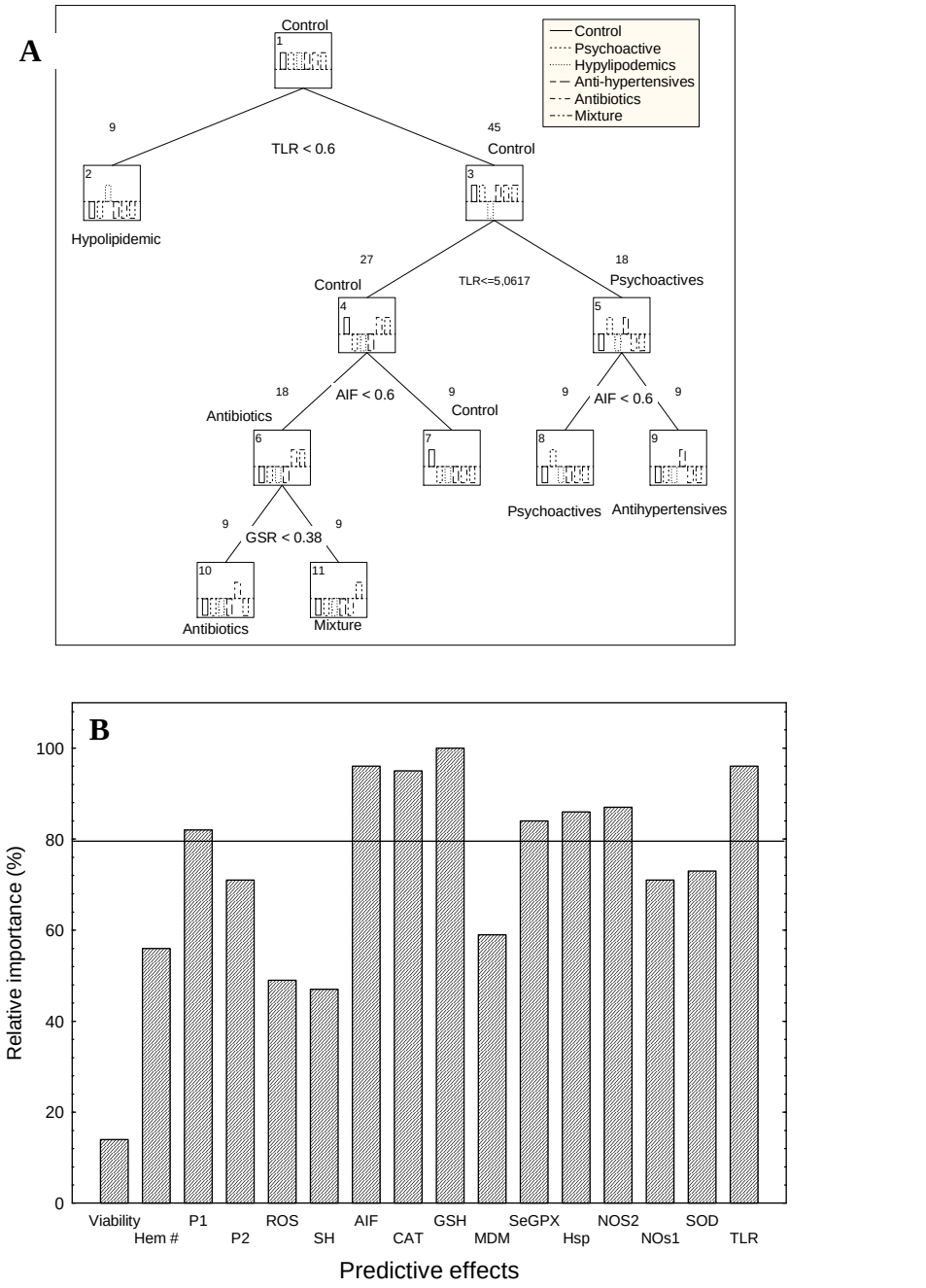


Figure 21: Analyse en arbre décisionnel des réponses immunes de la limnée. Les réponses fonctionnelles et génomiques ont été analysées. L'arbre décisionnel (A), montre la discrimination des classes thérapeutiques par la réponse immunitaire, et les biomarqueurs les plus importants (>75% d'importance) sont montrés dans le (B). Hem#: hemocyte count, P1: immunocapacity, P2: immunoefficiency, SH: thiol levels. Issu de Publi 7

β Chez Elliptio complanata

Une dernière exposition *in vitro* a été réalisée dans le cadre du Post-Doc de M. Gélinas sur une moule d'eau douce *Elliptio complanata* (Publi 8). L'hémolymphe a été directement prélevée et exposée 24 heures à des concentrations environnementales d'antibiotiques (novobiocin –NOV-, ciprofloxacine –CIP-, trimethoprim –TMT-, sulfamethoxazole –SMZ-, oxytetracycline –OTC-, érythromycine –ERY-), leur mélange, et l'effluent de la ville de Montréal filtré à 0.2µm (sans bactéries –ME filtrate) et non filtré –ME-.

Les effets des expositions sur la viabilité des hémocytes, la production de ROS et de thiols, la phagocytose, l'activité cyclooxygénase (COX) et lyzozyme ont été évalués. Cette étude montre que les antibiotiques seuls provoquent des altérations de la réponse immunitaire. Le mélange de tous les antibiotiques induit des réponses plus marquées que celles des composés pris individuellement. Les réponses de l'effluent filtré (sans bactéries) sont différentes de celles de l'effluent non filtré. Cela confirme que les polluants seuls induisent des modifications de la réponse immunitaire, mais que ces réponses ne sont pas équivalentes à celles provoquées par des pathogènes.

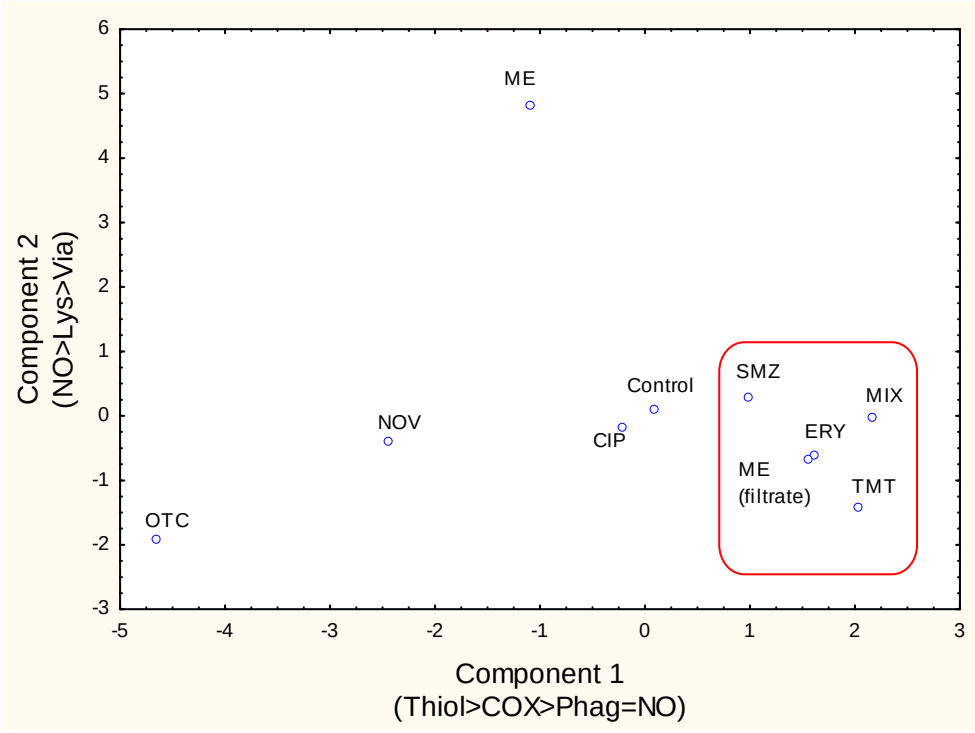


Figure 22: Analyse discriminante des réponses immunes. Issu de Publi 8

Une analyse discriminante a été réalisée (Figure 22) afin de déterminer les relations entre les différentes conditions d'exposition. Les effets du mélange d'antibiotiques sont très similaires de ceux du trimethoprim, erythormycine ou sulfamethoxazole, pris seuls. Les effets de

l'effluent filtré sont équivalents à ceux du mélange d'antibiotiques, alors que ceux de l'effluent non filtré sont très différents. Cela suggère que les antibiotiques sont en grande partie responsables des effets immunotoxiques de l'effluent de Montréal. Ces résultats sont assez similaires à ce qui avait été obtenu chez la limnée *in vivo*, où les effets de l'effluent étaient proches de ceux du même mélange antibiotique.

Ces résultats encourageants restent préliminaires. Ils montrent que des études sont encore nécessaires pour mieux caractériser les conséquences d'une diminution de capacité immunitaire sur les organismes et les populations. De nombreuses applications pourraient être dérivées de l'utilisation de la réponse immunitaire chez les gastéropodes en écotoxicologie. Les paramètres mesurés pourraient être utilisés pour suivre les mouvements des organismes exposés dans les rivières, ou pour permettre l'identification de groupes de produits chimiques qui génèrent la réponse globale. Enfin, ces informations pourraient être utilisées pour cibler les améliorations de traitement des effluents.

5. Conclusions et perspectives

L'approche proposée en immunotoxicologie est moins intégrée que celle utilisée en reprotoxicité. Ici encore, elle souffre des mêmes limites, avec un regard partiel sur la réponse immunitaire, du fait de l'absence de caractérisation globale de celle-ci chez la limnée. Celle-ci semble donc nécessaire pour approfondir cette voie. Les perspectives seront développées plus en avant dans la conclusion générale du manuscrit.

La caractérisation de la réponse immunitaire des organismes aura trois retombées majeures : (i) la meilleure compréhension des mécanismes d'effets biologiques observées (reproduction, croissance…) sur des organismes exposés *in situ* à des stress multiples en lien avec les systèmes de défense, (ii) la caractérisation des conséquences d'une dépression du système immunitaire, souvent multifactorielle chez les organismes, (iii) le développement potentiel de marqueurs de stress multiples précoces susceptibles d'influer sur la fitness des individus.

Une thèse (Paul Boisseaux) a débuté en novembre 2013 sur le sujet des marqueurs immunotoxiques sur la limnée. Celle-ci ne pourra pas répondre à toutes les questions posées, mais devrait permettre d'avancer dans la voie de la validation de l'existant.

C / REPRODUCTION ET IMMUNITE ?

En écologie, l'importance du système immunitaire dans un contexte écologique et dans l'histoire de vie de l'organisme est reconnue (Demas et al., 2011), alors que de telles considérations sont très peu étudiées en écotoxicologie, pour la survie des organismes et le maintien des populations dans des milieux pollués.

Ce n'est pas d'actualité, mais il me semble qu'à terme, les deux approches reprotoxicité et immunotoxicité devraient se rejoindre et être déployées conjointement. Il ressort des études où les marqueurs de réponse immunitaire sont suivis, un besoin de comprendre et d'évaluer les conséquences à plus long terme des modifications de statut immunitaire. Il semble assez évident que des organismes soumis à des stress (toxiques ou pathogènes), vont au final devenir plus sensibles aux pressions usuelles du milieu. Il se pourrait donc que la fitness soit diminuée et que les performances reproductives le soient également. Des études récentes s'intéressent d'ailleurs aux conséquences des pathogènes plus spécifiques aux mammifères sur les organismes non cibles, une fois que ceux-ci sont introduits dans le milieu aquatique par les stations d'épurations (Gauthier-Clerc et al., 2013).

Par ailleurs, un organisme ne peut se reproduire correctement que si son état de santé le lui permet. Il semble très indiqué d'interpréter les effets sur la reproduction en gardant cela en mémoire.

D / CONCLUSION SUR L'UTILISATION DES GASTEROPODES POUR LA COMPREHENSION DES MECANISMES

Je ne suis pas persuadée qu'un organisme ait plus de valeur qu'un autre, en terme d'évaluation de risque. Je pense qu'il faut se concentrer sur des éléments pragmatiques (Tableau 2). L'évaluation de risque est d'autant meilleure que les mécanismes mis en jeu sont compris, et notamment sur l'espèce testée. Il me semble donc qu'il faut travailler sur des espèces dont la physiologie est connue, et lorsque l'on travaille sur des organismes moins « conventionnels », qu'il faut faire un gros effort de compréhension de cette physiologie.

Par ailleurs, par respect pour ceux qui font les expérimentations (ce que l'on oublie parfois une fois qu'on ne les fait plus), des organismes faciles à manipuler, sur lesquels les contraintes expérimentales ne sont pas trop importantes, sont à favoriser. Pour avoir fait un bon nombre d'expérimentations, je reconnais avoir un faible pour *P. antipodarum*. Je

reviendrai sur ses limites en ce qui concerne la variabilité de réponse, mais en terme de facilité de manipulation, il faut reconnaitre ses avantages. Les expérimentations sont aisées, la mortalité très faible (contrairement à ce qui a pu être observé chez *V. piscinalis*), et les organismes robustes. C'est d'ailleurs ce qui en fait un organisme de choix pour les expérimentations de terrain. En revanche, le cycle de vie est long, ce qui est assez commun aux gastéropodes,. La limnée est un excellent organisme de laboratoire (et certainement à préférer à *P. antipodarum*, sa physiologie étant nettement plus connue), mais semble plus fragile.

Ainsi, en conclusion de cette partie sur l'évaluation de risque :

- *P. antipodarum* pour les expérimentations de terrain avec la mise en évidence d'effets reprotoxiques,
- Limnée au laboratoire pour développer les approches immunotoxiques,
- Dans l'idéal, exposition des deux (nous avons vu l'intérêt avec les expositions conjointes *P. antipodarum* et *V. piscinalis*),
- Et au final, faire le lien entre la reproduction et la réponse immunitaire.

Tableau 2: Utilisation des différents gastéropodes d'eau douce pour la compréhension des mécanismes des toxiques

	P. antipodarum	***V. piscinalis***	***L. stagnalis***
Mécanismes explorés	Reprotoxiques (limité aux marqueurs disponibles et espèces parthénogénique)	Reprotoxiques (marqueurs histologiques très pertinents sur cette espèce hermaphrodite)	Reprotoxiques (non testé, mais bonne connaissance de la physiologie de la reproduction) Immunotoxiques (cytométrie de flux et génomique)
Type d'expérimentations	Laboratoire et terrain (petite taille, robuste, facile de manipulation)	Laboratoire (peu robuste)	Laboratoire (peu robuste et grande taille impliquant beaucoup de place)
Sensibilité aux polluants	Très sensible aux reprotoxiques		

LES GASTEROPODES SONT-ILS DE BONS OUTILS D'EVALUATION DE LA QUALITE DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES D'EAU DOUCE ?

La partie précédente a fait le bilan sur l'utilisation des gastéropodes (et plus particulièrement ceux sur lesquels j'ai pu travailler) pour la compréhension des effets reprotoxiques et immunotoxiques. Un autre volet de l'écotoxicologie est l'évaluation de la qualité des écosystèmes. Celle-ci base sur deux éléments majeurs :

- L'évaluation de l'exposition aux polluants (bioaccumulation)
- L'évaluation des effets de ces mêmes polluants (sensibilité aux polluants).

Dans un premier temps, je me suis assez peu intéressée à l'évaluation de l'exposition, et donc la biodisponibilité des polluants. Cependant, après avoir mis en évidence des effets biologiques, il est difficile de ne pas se poser la question de l'exposition, surtout lorsque des espèces proches biologiquement présentent des sensibilités très différentes. En effet, l'utilisation de plusieurs espèces modèles a mis en évidence des différences de sensibilité aux polluants.
Ce chapitre s'intéresse donc à ces deux volets, au travers des travaux menés, bien que, pour la plupart, l'objectif de départ n'ait pas été celui-là.

A / EVALUATION DE L'EXPOSITION : BIOACCUMULATION

Dans le cadre de l'approche intégrée que j'ai développée dans le chapitre précédent, l'évaluation de l'exposition a semblé indispensable. Elle est issue d'une collaboration de plusieurs années avec l'équipe de chimistes TRACES du CNRS (C. Cren-Olivé et thèse d'A. Berlioz-Barbier) qui a miniaturisé ses méthodes d'analyses pour les adapter aux organismes utilisés.

Mon objectif premier n'était pas l'évaluation de la contamination, mais plutôt la compréhension des effets. Je réitère donc mes réserves quant à l'exhaustivité de l'approche présentée ici. Très peu des expérimentations réalisées avaient réellement l'évaluation de l'exposition pour objectif premier.

1. Au laboratoire

a. Fluoxétine

Une première étude sur les effets de la fluoxétine (Publi 16) a montré une différence de sensibilité marquée entre *P. antipodarum* et *V. piscinalis*. Pour rappel, une des hypothèses alors avancée fut une différence d'exposition des deux espèces (soit due à une moindre bioaccumulation de fluoxétine, et donc un accès moins important aux cibles biologiques, soit due à une différence de métabolisation en son métabolite actif). Cette hypothèse a été testée par la suite en évaluant la capacité de bioaccumulation de la fluoxétine de ces deux espèces, associée à sa métabolisation en norfluoxétine, un métabolite majoritaire et plus actif chez les vertébrés (Publi 4).

Des individus ont donc été exposés aux mêmes concentrations que celles qui provoquaient des effets. Il en est ressorti que les deux espèces bioaccumulent la fluoxétine, *P. antipodarum* plus que *V. piscinalis* (Tableau 3). Une raison possible pourrait être la composition lipidique nettement supérieure chez *P. antipodarum* que chez *V. piscinalis*. Chez *P. antipodarum*, aucune différence significative n'est notée entre la bioaccumulation après 7 ou 14 jours d'exposition, montrant que la phase de plateau a été atteinte.

Nominal fluoxetine 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
Fluoxetine (µg/g)	*P. antipodarum*	D0	< LOD			
		D7	< LOD	1.199 ± 0.277	5.474 ± 0.240	32.473 ± 4.213
		D14	< LOD	1.755 ± 0.309	6.272 ± 0.503	33.478 ± 4.312
	V. piscinalis	D0	< LOD			
		D7	< LOD		2.827 ± 1.136	13.862 ± 3.226
Norfluoxetine (µg/g)	*P. antipodarum*	D0	< LOD			
		D7	< LOD	< LOQ	0.009 ± 0.002	0.099 ± 0.014
		D14	< LOD	0.004	0.012 ± 0.003	0.060 ± 0.014
	V. piscinalis	D0	< LOD			
		D7	< LOD		0.008 ± 0.003	0.058 ± 0.026

Tableau 3: Bioaccumulation et métabolisation de la fluoxétine chez *P. antipodarum* et *V. piscinalis*. Issu de Publi 4

Les organismes ont métabolisé la fluoxétine en norfluoxétine. Cette étude a été la première a mettre en évidence une métabolisation de ce composé chez des gastéropodes. Cette dernière est remarquable, parce qu'existante, mais reste très limitée. Elle n'explique donc certainement pas les différences de sensibilité des espèces.

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'autres études similaires chez les poissons et une moule d'eau douce, *Elliptio complanata* (Tableau 4). Il est assez difficile de comparer des résultats de bioaccumulation entre différentes espèces, si les expositions n'ont pas été réalisées exactement dans les mêmes conditions. Pour la fluoxétine, la bioaccumulation dépend énormément du pH de l'exposition (Nakamura et al., 2008). Ainsi, si cette information n'est pas disponible (comme c'est le cas pour le bivalve), toute comparaison devient hasardeuse. Ces limites bien définies, il semble que la bioaccumulation, notamment chez *P. antipodarum* soit comparable à celle observée chez les poissons, dans les tissus gras, à des pH comparables. En revanche, la métabolisation est bien moindre que chez les poissons. Il semblerait que le bivalve bioaccumule plus que les gastéropodes.

Tableau 4: Bioaccumulation et métabolisation de la fluoxétine chez les organismes aquatiques. BCF: bioconcentration factor. Issu de Publi 4

Species	Water concentration	Exposure duration	pH	Fluoxetine BCF	Norfluoxetine pseudo-BCF
O. latipes *(Nakamura et al., 2008)*	10µg/L	30 days	7.2 8.1 8.9	8.8 (B[22]), 339 (L), 13 (B+L) 30 (B), 580 (L), 37 (B+L) 260 (B), 3100 (L), 330 (B+L)	84 (B), 1500 (L), 100 (B+L) 130 (B), 3300 (L), 170 (B+L) 650 (B), 3700 (L), 720 (B+L)
O. latipes *(Paterson and Metcalfe, 2008)*	0.64µg/L	7 days	7.4	74	117
O. mykiss *(Zhang et al., 2010)*	3µg/L	8 days		59 (M), 143 (AT)	
P. antipodarum	11 µg/L 33 µg/L 100 µg/L	7 /14 days	7.9	400/585 228/261 411/424	1.3 0.5 0.8
V. piscinalis	33 µg/L 100 µg/L	7 days	7.9	118 175	0.3 0.7
E. complanata *(Bringolf et al., 2010)*	2.4 ng/L 7 ng/L 14 ng/L 119 ng/L	14 days		125 1347 1250 665	

[22] B : body ; L : liver, B+L : body + liver ; M : muscle, AT : adipose tissue

b. BPA

De la même manière que les deux espèces ont été exposées conjointement à la fluoxétine, leur capacité d'accumulation et de dépuration du BPA a été évaluée (Figure 23) lors du Master de M. Dupré (Publi 3).

Les facteurs de bioconcentration (BCFs) ont été mesurés en utilisant les concentrations moyennes de BPA dans les organismes à l'équilibre (C_{snail} en $ng.g^{-1}$ of poids frais –ww-) et dans l'eau (C_{water} in µg/L). Les constantes d'accumulation (*ku* en $mL.g^{-1}.h^{-1}$) et d'élimination lors de la phase d'accumulation (*ke* in h^{-1}) ont été calculées de la manière suivante:

$BCF_{tot} = C_{snail} / C_{water} = ku / ke$ (1)

Les données de la phase d'accumulation ont été utilisées dans un modèle de premier rang (Landrum, 1989):

$C_{snail}(t) = (ku/ke * C_{water}) * (1-e^{-ke*t})$ (2)

Les données de la phase de depurations ont été utilisées dans un modèle de depuration du première ordre où *kd* (h^{-1}) est la constante de dépuration et C*i* ($ng.g^{-1}$ de ww) est la concentration de BPA dans les organismes au début de la phase de dépuration :

$C_{snail}(t) = Ci * e^{-kd*t})$ (3)

La demi-vie de dépuration ($t_{1/2}$) a été calculée en divisant le ln(2) par *kd*.

La bioaccumulation est très rapide, le plateau est atteint en 24 heures. Il en est de même pour la dépuration. Contrairement à la fluoxétine, *V. piscinalis* bioaccumule plus le BPA que *P. antipodarum* (BCF de 12.5 contre 7.7), mais les concentrations diminuent entre 24 et 48 heures. La demi-vie est de 8 heures seulement chez l'hermaphrodite, alors qu'elle est de 18 heures chez le parthénogénique. La métabolisation du BPA se fait sous forme de conjugués sulfonés. Or ces enzymes sont fortement inductibles, ce qui pourrait expliquer la diminution de concentration significative chez *V. piscinalis* entre 24 et 48 heures et la dépuration très rapide des organismes.

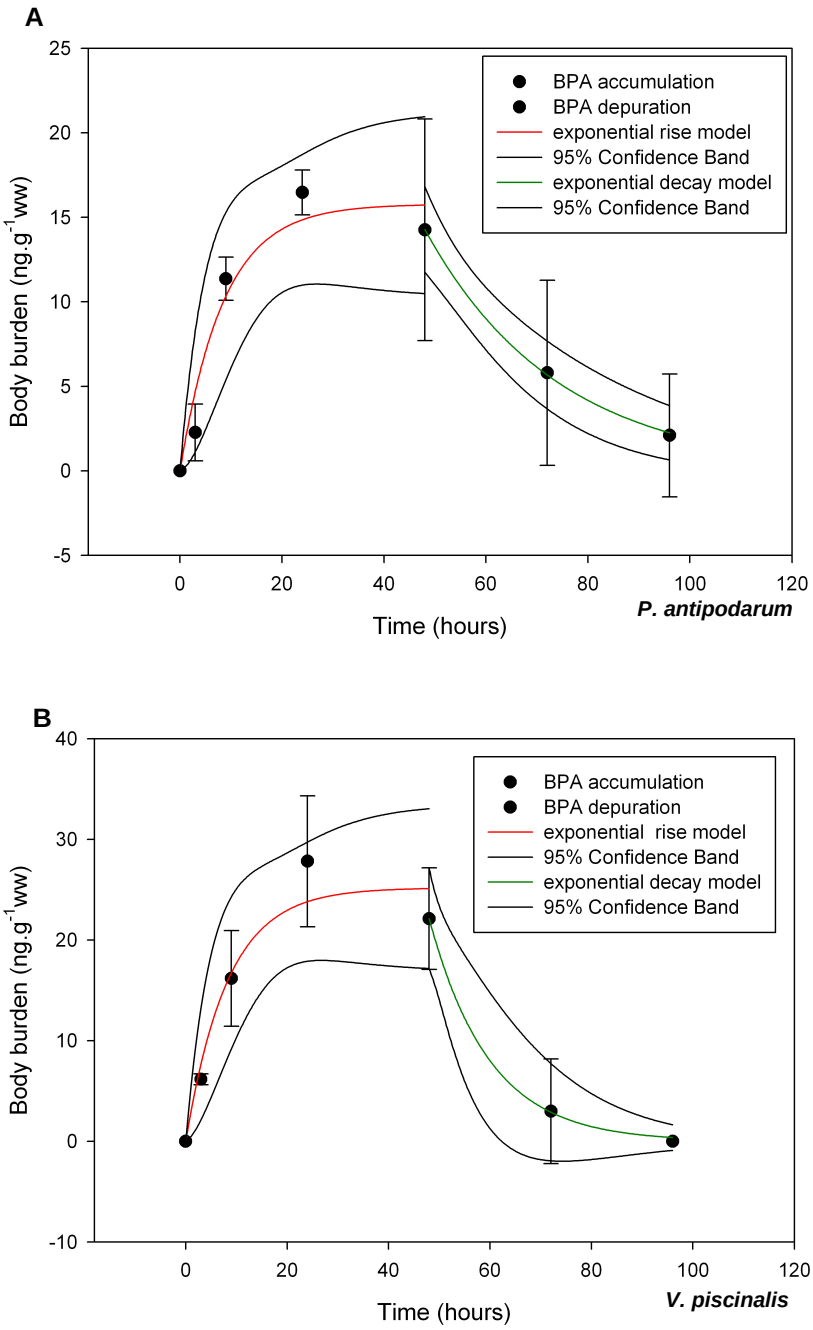


Figure 23: Courbes de bioaccumulation (48h) et dépuration (48h) de BPA (2µg/L) chez *P. antipodarum* (A) et *V. piscinalis* (B). Moyenne et écart-type et modèles de croissance exponentielle et de décroissance appliqués aux données. Adapaté de Publi 3

Cette étude est la première s'intéressant à la bioaccumulation de BPA chez les gastéropodes, puisque seule la bioaccumulation chez les bivalves avait été évaluée jusqu'à présent (Gatidou et al., 2010; Hayashi et al., 2008; Heinonen et al., 2002). Les paramètres de toxico-cinétique (Tableau 5) sont inférieurs à ceux des bivalves, mais les comparaisons sont difficiles du fait de conditions expérimentales différentes (température, concentration…)…

Les capacités de bioaccumulation du BPA sont plus proches de celles des poissons, et sont limitées (Liu et al., 2011).

Tableau 5 :Paramètres toxico-cinétiques et BCF du BPA chez *V. piscinalis* et *P. antipodarum*. Issu de Publi 3

	ku[23] ($mL.g^{-1}.h^{-1}$)	***ke***[a] (h^{-1})	***kd***[24] (h^{-1})	**Half-life of BPA** (h)	$BCF_{Csnail/Cwater}$ ($mL.g^{-1}$)	$BCF_{ku/ke}$[25] ($mL.g^{-1}$)
P. antipodarum	0.9352	0.1186±0.0423 (r^2=0.9722)	0.0385±0.012 (r^2=0.9997)	18	7.7	7.9
V. piscinalis	1.5283	0.1214±0.0412 (r^2=0.9731)	0.0847±0.0055 (r^2=0.9997)	8	12.5	12.6

Tableau 6: Concentrations de BPA, tOP et tNP (µg/L) dans l'eau lors de l'exposition aux mélanges. Concentrations d'E2, T, BPA, tOP et tNP dans les organismes (ng/g) lors de l'exposition. Les éléments en gras signalent une différence significative par rapport au témoin. Issu de Publi 3

		Control	Solvent control	Mixt 1	Mixt 2	Mixt 3	Mixt 4
Concentrations in water (µg/L)	**BPA**	-	-	0.2 (0.7±0.1)	0.6 (0.9±0.2)	1.8 (1.7±0.6)	5.4 (4.2±1.2)
	tOP	-	-	0.1(<LOQ)	0.3 (<LOQ)	0.9 (<LOQ)	2.7 (<LOQ)
	NP	-	-	0.5 (<LOQ)	1.5 (<LOQ)	4.5 (<LOQ)	13.5 (<LOQ)
Concentrations in the mudnsail (ng/g)	**E2** (x10)	0.73±0.21	0.77±0.20	0.69±0.26	0.53±0.36	0.45±0.22	**0.37±0.18**
	T	0.19±0.08	0.16±0.05	0.17±0.07	0.20±0.8	0.15±0.7	0.16±0.08
	BPA	18.70±0.87	17.80±0.17	**24.27±2.42**	**26.10±2.31**	**28.40±2.69**	**35.10±1.48**
	tOP	471.33±14.84	447.67±26.10	**261.00±36.17**	494.00±135.82	**664.67±11.50**	**546.33±47.50**
	tNP	528.00±29.46	**1823.33±144.68**	**254.00±25.87**	555.00±95.79	**763.00±36.01**	**268.67±36.95**

[23] Conditional uptake clearance (*ku*) and elimination rates (*ke*) estimated by using a first –order rate coefficient model.
[24] Depuration rate constant (*kd*) determined in the depuration experiment.
[25] BCF determined as a ratio of *ku* and *ke* parameters.

c. Mélanges de BPA, tOP et tNP

Lors de l'exposition aux mélanges de PE (Publi 3) réalisée lors des Masters de V. Lecomte et M. Dupré, les concentrations de BPA, tOP et tNP ont été mesurées dans les *P. antipodarum* adultes à la fin de l'exposition (thèse d'A. Berlioz-Barbier).

Les concentrations de BPA ont été croissantes par rapport au témoin et témoin solvant dans les différents mélanges (Tableau 6). Bien que les concentrations de tOP et tNP soient en dessous des limites de quantification dans l'eau, ces composés sont retrouvés dans les bêtes. En revanche, les concentrations de tOP sont significativement inférieures à celles des témoins dans le mélange 1, puis supérieures dans les mélanges 3 et 4. Elles ne font pas état du gradient de contamination, tout comme celles de tNP. Ces dernières sont très élevées dans le témoin solvant (alors qu'il n'est pas mesuré dans ce dernier !), et bien supérieures à celles qui sont retrouvées dans les organismes.

Les solvants doivent être distillés avant leur utilisation pour les dosages chimiques, sinon ils sont source de contamination. Le solvant utilisé lors de l'expérimentation n'avait pas été distillé, ce qui explique certainement cette contamination forte. De manière intéressante, nous avions noté, lors d'une précédente étude (Publi 5) des effets biologiques des solvants seuls à de très faibles concentrations. Il est fort probable que cette contamination en alkylphénols en soit la cause.

Cette exposition montre que la bioaccumulation des alkylphénols est supérieure à celle du BPA. Cependant, en terme d'effet biologique, c'est le BPA qui est en cause, puisque les effets sont corrélés à son gradient.

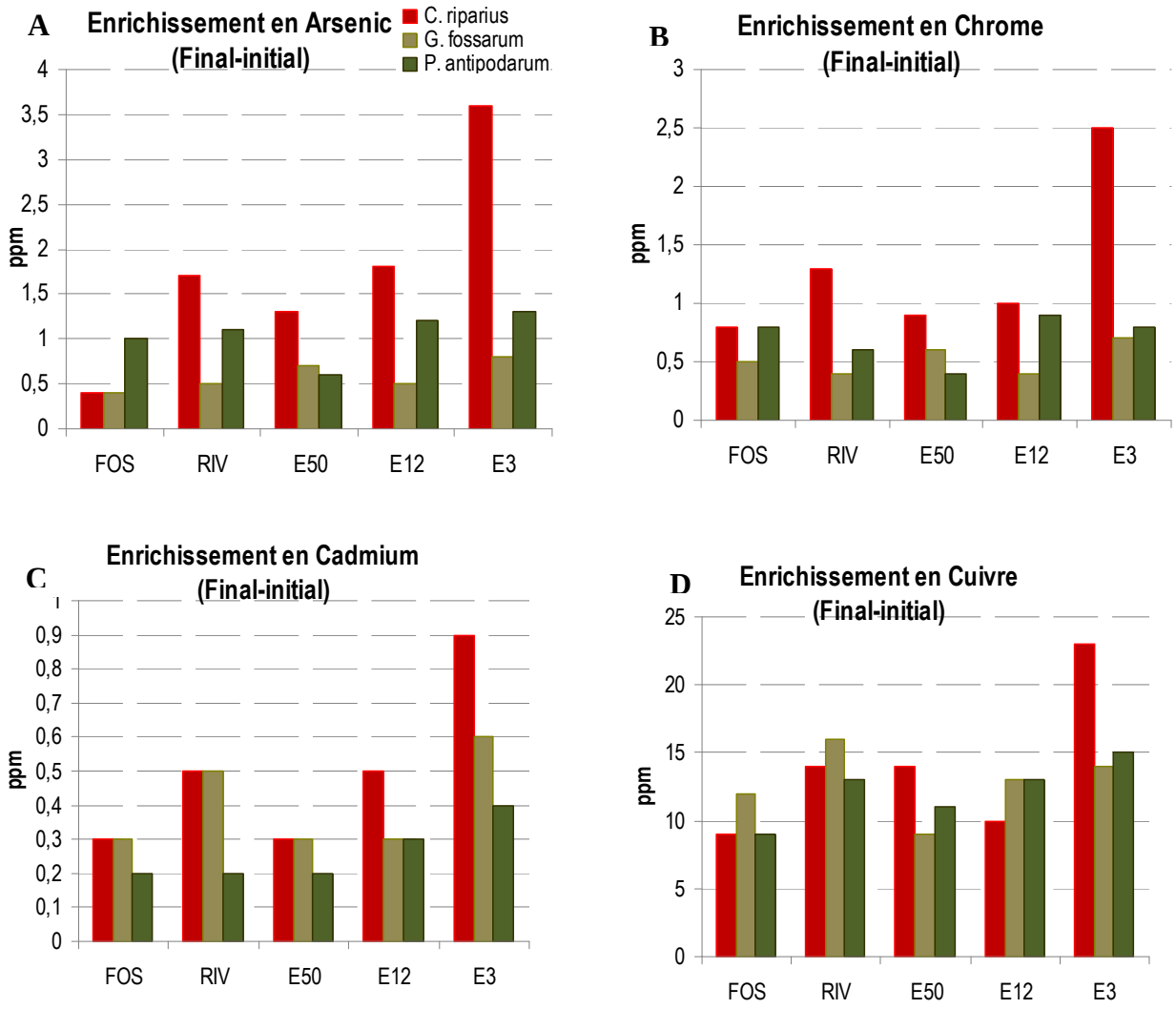
Ce qui ressort finalement de ces expositions de laboratoire, c'est une grande difficulté de comparer les études entre elles, hormis quand les expositions ont été réalisées conjointement (ce qui est le cas des deux gastéropodes que nous utilisons…). Concernant les gastéropodes, nos études montrent qu'ils sont capables de bioaccumuler au laboratoire des polluants organiques, et que globalement cette bioaccumulation est modérée. Les cas de la fluoxétine et du BPA montrent des capacités finalement relativement proches de celles des poissons.

Je n'ai pas directement participé à des études portant sur les métaux, au laboratoire. En revanche, des études ont montré que *P. antipodarum* accumulait également les métaux, dont le cadmium au laboratoire. Lorsque l'exposition se fait par voie sédimentaire, il accumule plus qu'un organisme pélagique (*Gammarus fossarum*) et moins qu'un organisme benthique

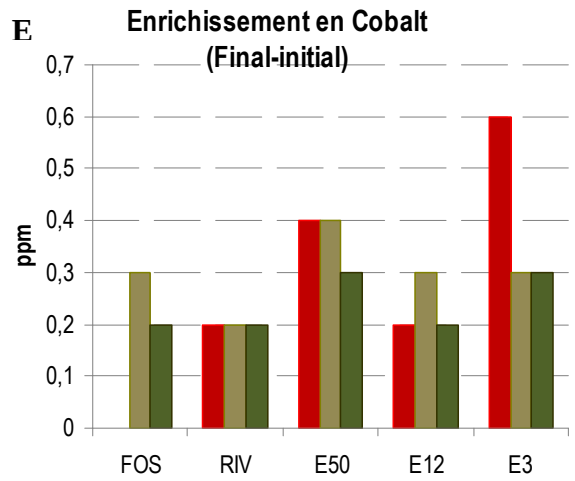
(*Chironomus riparius*). Ce qui semble assez compatible avec sont mode de vie épi-benthique (Dabrin et al., 2012).

d. Comparaison avec d'autres espèces

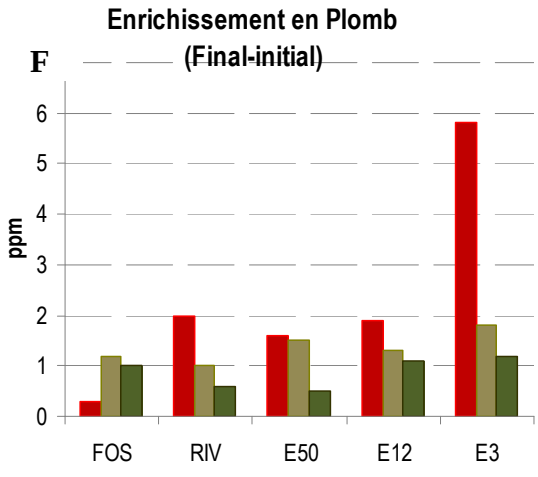
Une exposition plus complexe a été réalisée au laboratoire à différentes concentrations (3, 12 et 50%) de rejet urbain dans le cadre du Post-Doc de J. Faburé (Publi 19). L'exposition a été réalisée *via* l'eau, sur trois espèces conjointement : *P. antipodarum*, *G. fossarum* et *C. riparius*. Les métaux et les contaminants organiques ont été mesurés dans les organismes. La réalisation des mesures des polluants organiques dans les bêtes a été réalisée grâce à une méthode de chimie analytique de pointe (Thèse A. Berlioz-Barbier), et permet la mesure de 36 composés organiques dans des échantillons de quelques dizaines de mg de poids frais.



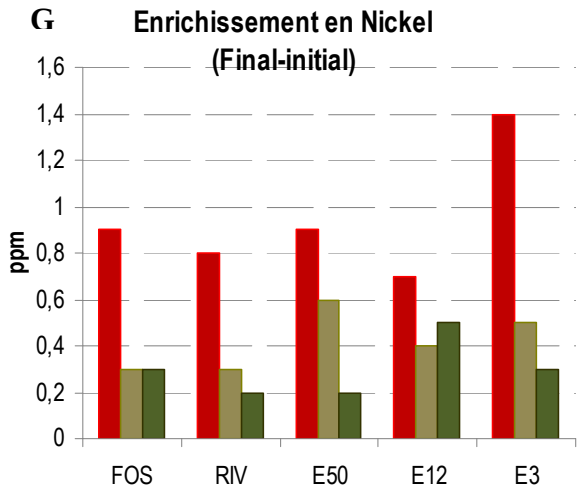
E


Enrichissement en Cobalt
(Final-initial)
ppm
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
FOS
RIV
E50
E12
E3

F


Enrichissement en Plomb
(Final-initial)
ppm
6
5
4
3
2
1
0
FOS
RIV
E50
E12
E3

G


Enrichissement en Nickel
(Final-initial)
ppm
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
FOS
RIV
E50
E12
E3

H

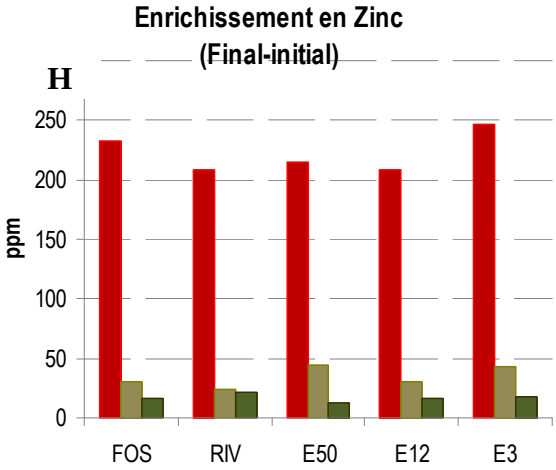

Enrichissement en Zinc
(Final-initial)
ppm
250
200
150
100
50
0
FOS
RIV
E50
E12
E3

Figure 24: Bioaccumulation (concentration finale retranchée de la concentration initiale) de métaux au laboratoire chez trois invertébrés aquatiques: *C. riparius*, *G. fossarum* et *P. antipodarum*. Arsenic (A), Chrome (B), Cadmium (C), Cuivre (D), Cobalt (E), Plomb (F), Nickel (G), Zinc (H).

Concernant les métaux, bien que peu présents dans les échantillons d'eau, tous on été bioaccumulés (Figure 24). De manière générale, le chironome bioaccumule plus que le gammare et le gastéropode. Il y a peu voire, aucune différence entre la bioaccumulation observée chez ces deux espèces, indiquant des capacités modérées comparées à celles de l'insecte. Les dosages dans l'eau ne montraient pas de gradient, ce qui semble confirmé par la bioaccumulation dans les organismes. Les expositions au laboratoire ont été effectuées avec un mélange complexe (aussi bien l'eau de rivière que l'effluent), et l'accumulation des métaux est interdépendante entre eux (Daka and Hawkins, 2006). L'interprétation de la bioaccumulation ne peut donc se faire que dans son ensemble.

D'autres dosages des composés organiques sont en attente, mais pour l'heure, non disponibles.

2. En conditions réelles : expositions *in situ*

a. Contamination métallique

Une exposition conjointe de *P. antipodarum* et *G. fossarum* a été réalisée à une pollution terrain polymétallique (Cd et Zn) sur le site de Decazeville (Publi 11). Les effets sur les deux organismes ont été évalués en en encageant sur 5 sites (Figure 12), présentant un gradient de pollution varié.

J'ai déjà détaillé les effets observés lors de cette exposition dans le chapitre précédent (Chapitre I-A-3-b), et je vais focaliser ici sur la contamination différentielle observée chez les organismes. Celle-ci est comparable dans la mesure où les expositions ont été réalisées strictement en même temps, et donc les conditions d'expérimentation étaient similaires.

P. antipodarum bioaccumule du Cd et du Zn sur les 5 sites d'expérimentation (Tableau 7), avec un gradient correspondant à celui observé dans l'eau. Les niveaux de bioaccumulation sont distincts entre les sites, et sur les 3 sites contaminés, aucun plateau n'est atteint, même après 14 jours d'exposition. Chez le gammare, les niveaux de bioaccumulation sont supérieurs (environ 25µg/g sur le site de Moulin comparé à 4µg/g pour le Cd), indiquant une plus grande bioaccumulation en situation de terrain (Lacaze et al., 2011). Les niveaux de bioaccumulation de Zn sont aussi environ trois fois plus importants chez l'amphipode que chez le gastéropode.

En ce qui concerne la bioaccumulation de métaux, ces deux études terrain menées conjointement montrent une meilleure capacité de bioaccumulation de l'amphipode. Il faut cependant noter que de fortes mortalités avaient été observées sur cette espèce, alors que la survie du gastéropode restait excellente. Le choix se pose donc entre une espèce extrêmement robuste, mais bioaccumulant moins les métaux, et une autre qui accumule plus les métaux, mais présentant une mortalité plus importante.

Tableau 7: Concentration en Cd et Zn sur les sites et dans les organismes, et marqueurs associés chez *P. antipodarum* (a<b<c<d, P<0.0005). Issu Publi 11

		Lot upstream	Lot downstream	Decazeville	Moulin	Joanis
Cd	**In water µg/L, (dissolved Cd)**	nd[1]	0.8µg/L[1]	"Cd-Free[3]"		26µg/L[1] 30µg/L[3]
	In suspended particulate matter µg/g		16mg/kg[2]		40mg/kg[2]	
Zn	**In water µg/L, (dissolved Zn)**	nd[1]	50µg/L[1]	"Zn-Free[3]"		900µg/L[1] 1500µg/L[3]
	In suspended particulate matter µg/g		600mg/kg[2]		1600mg/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]

b. Contamination organique

De nombreuses études d'encagement ont été réalisées ces dernières années. La majorité d'entre elles ont été réalisées en aval de rejets de STEP, et donc la contamination organique a été un élément largement suivi. Et ce d'autant plus que les méthodes analytiques le permettant ont été développées. Il a donc été possible de mesurer sur un nombre très restreint d'organismes (1 à 3 gastéropode de quelques mm), 36 polluants différents avec des limites de sensibilité de l'ordre du ng/g (Thèse A. Berlioz-Barbier).

α Rejets urbains

Plusieurs études ont été réalisées sur le rejet de la STEP urbaine de Bourgoin-Jailleu dans la Bourbre. La plus récente d'entre elles, et la plus élaborée, visait à comprendre plus précisément les mécanismes de toxicité mis en jeu (Publi 1). Par ailleurs, l'évaluation de la contamination des organismes a également été réalisée.

Ici, comme dans les autres expérimentations, il est très difficile de faire le lien entre les effets et un contaminant particulier. Bien que beaucoup de polluant soient mesurés, ils sont loin de l'être tous. Dans cette étude, des effets très marqués sont observés sur la reproduction. En parallèle, des prélèvements d'eau tout au long de l'expérimentation ont permis de caractériser une contamination importante du milieu récepteur en médicaments principalement, mettant bien en évidence l'impact du rejet de STEP sur le milieu récepteur (Tableau 8). Le gradient de contamination est également présent, ce qui confirme la pertinence des sites d'exposition choisis.

Tableau 8: Contamination chimique des 4 sites d'exposition (moyenne et écart-type, * indique la présence du composé dans tous les prélèvements). Issu de Publi 1

Concentration (ng/L) and SD	LQ	**Bion**	**Bourbre Upstream**	**Confluence**	**Bourbre Downstream**
Pharmaceutical Products					
Bezafibrate	2.5	**0.60**	**10.28***	**17.40***	**15.42***
		1.34	*2.93*	*3.74*	*4.21*
Carbendazim	0.5	**<LQ**	**1.63**	**2.10**	**2.11**
			1.00	*0.28*	*0.61*
Carbamazepine	2.5	**4.08***	**13.30***	**36.53***	**27.50***
		1.41	*3.57*	*13.26*	*7.22*
Diclofenac	1	**2.04***	**13.43***	**42.35***	**28.00***
		0.36	*6.72*	*17.74*	*7.12*
Fenofibrate	1	**0.20**	**0.42**	**1.33**	**1.32**
		0.45	*0.65*	*0.20*	*0.14*
Ketoprofen	2.5	**6.88***	**8.02***	**21.15***	**20.37***
		2.11	*3.60*	*9.50*	*7.03*
Lorazepam	2.5	**2.34**	**2.15**	**11.44**	**8.85***
		2.56	*2.87*	*6.59*	*1.61*
Metronidazole	1	**1.46**	**4.37**	**21.83***	**10.68**
		3.26	*9.64*	*3.37*	*7.84*
Ofloxacine	3	**<LQ**	**6.07**	**29.93***	**19.73***
			3.98	*8.64*	*4.34*
Oxazepam	5	**15.84***	**48.55***	**193.00***	**154.00***
		4.80	*15.42*	*59.66*	*46.04*
Paracetamol	5	**26.92***	**25.88***	**19.37***	**18.90***
		9.72	*14.09*	*4.43*	*6.32*
Roxythromycine	5	**<LQ**	**15.65**	**21.42***	**19.88**
			30.83	*21.42*	*19.88*
Sulfamethoxazole	1	**0.72**	**0.38**	**4.58***	**2.33**
		1.07	*0.59*	*2.03*	*0.91*
Tamoxifen	5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Trimethoprim	1	**1.18**	**0.86**	**7.13**	**9.48**
		0.69	*1.04*	*5.84*	*3.84*
Hormones and derivates					
17β-Estradiol	5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Estrone	2	**<LQ**	**0.43**	**3.75**	**2.90**
			0.16	0.78	0.30
Megestrol Acetate	1	**1.54**	**1.30**	**2.48**	**3.03**
		0.88	*1.57*	*1.15*	*0.61*
Progesterone	2.5	**<LQ**	**1.18***	**5.43***	**12.60***
			1.84	*0.79*	*11.04*
Testosterone	2.5	**<LQ**	**2.25**	**17.05***	**8.25***
			1.17	*5.84*	*3.34*
UV-filter					
4 Methylbenzyliden Camphre	5	**<LQ**	**5.16**	**21.57**	**14.55**
			5.24	*10.39*	*6.88*

Pesticides					
Acetochlor	2.5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Alachlor	1	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Atrazine	1	**10.96*** *1.22*	**7.80*** *1.13*	**6.32*** *1.48*	**7.22*** *1.79*
2.4Dichlorophénoxyacétique acid	2	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**0.33** 0.*82*
Diuron	2.5	**<LQ**	**0.42** *1.02*	**2.95** *0.64*	**0.60** *1.47*
Linuron	2.5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Prochloraz	1	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Thiram	10	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Phenylurea metabolite					
3,4 Dichloroaniline	1	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Alkylphenols					
n-Nonyl Phenol	5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Tert Nonyl Phenol	10	**26.50*** *24.00*	**128.17** *148.03*	**70.40*** *65.27*	**105.80*** *115.68*
n-Octyl Phenol	2	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Tert Octyl Phenol	10	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Phenols					
Bisphenol A	10	**546.40** *717.28*	**253.17** *326.31*	**635.50** *275.06*	**224.25** *221.43*
2,4 Dichlorophenol	10	**<LQ**	**<LQ**	**1717.50** *2237.99*	**3200.00** *1306.39*
Resorcinol	10	**45.60*** *46.42*	**100.00*** *84.90*	**108.50*** *77.16*	**97.00*** *74.04*

En parallèle, les mesures dans les organismes montrent que cette contamination les affecte également, les concentrations les plus élevées étant sur l'aval éloigné. Le tableau 9 ne reprend que les composés qui ont été mesurés dans les organismes.

Des médicaments sont retrouvés, et principalement l'oxazépam (qui était déjà le médicament le plus présent dans les prélèvements d'eau). Cette molécule est, en effet, à la fois un principe actif de médicament et le métabolite de 4 autres benzodiazépines. De plus, l'oxazépam est glucurono-conjugué dans les organismes, et excrété comme tel. Ce métabolite est ensuite

clivé dans les STEPs et régénéré en tant que molécule active (Besse et al., 2008). Il y a peu d'études sur son comportement dans l'environnement, mais il semble qu'il soit peu éliminé par les STEPs (Wahlberg et al., 2011), et qu'il soit résistant à la photodégradation (Calisto et al., 2011).
Les concentrations d'oxazépam dans les organismes (3mg/kg) sont très nettement supérieures à la dose thérapeutique humaine (1mg/kg). Bien que ce composé soit relativement hydrophile (Kow = 2.31), il se bioaccumule fortement. Ses effets biologiques doivent être évalués plus en avant.

De fortes concentrations d'alkylphénols sont également mesurées, ce qui confirme la capacité importante de bioaccumulation de *P. antipodarum* de ces molécules. Les concentrations dans les gastéropodes sont plus importantes que dans des poissons pêchés dans des rivières plus contaminées en alkylphénols, (Lozano et al., 2012). Les capacités de bioaccumulation des gastéropodes semblent donc supérieures à celles des poissons concernant ces molécules.

Enfin, les concentrations en PFOS sur les sites amont sont relativement élevées comparées à ce qui se retrouve dans l'environnement (Loi et al., 2011). Le rejet de l'effluent dilue la contamination en PFOS.

Tableau 9: Contamination chimique des organismes exposés sur les 4 sites d'exposition (moyenne et écart-type, * indique une différence significative avec l'amont). Issu de Publi 1

Concentration (ng/g) and SD	LOQ (ng/g)	**Bion**	**Bourbre Upstream**	**Confluence**	**Bourbre Downstream**
Pharmaceutical Products					
Carbamazepine	0.42	**0.875** *0.014*	**0.827** *0.025*	**1.120*** *0.040*	**1.060*** *0.026*
Diclofenac	24.9	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Ibuprofen	11.2	**20.177** *2.333*	**16.517** *2.128*	**16.307*** *0.225*	**19.863** *1.646*
Ketoprofen	6.7	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Levonogestrel	12.5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Lidocaine	4.27	**5.680** *2.442*	**7.577** *2.889*	**4.803** *0.924*	**7.347** *5.329*
Oxazepam	0.9	**603.667** *59.774*	**862.333*** *29.905*	**1336.667*** *92.916*	**2606.667*** *361.156*
Alkylphenols					
Tert Nonyl Phenol	196	**291.667** *79.286*	**280.667** *40.649*	**717.667*** *24.420*	**687.333*** *85.629*
Tert Octyl Phenol	184	**558.667** *80.786*	**381.667** *56.323*	**855.333*** *77.938*	**914.333*** *137.784*
Phenols					
Bisphenol A	16.8	**18.767** *0.896*	**36.433*** *3.510*	**20.600*** *1.967*	**91.667*** *15.972*
PFAS					
PFOA	3.06	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
PFOS	0.97	**4.100** *0.407*	**3.693** *0.251*	**1.890*** *0.061*	**2.163*** *0.544*

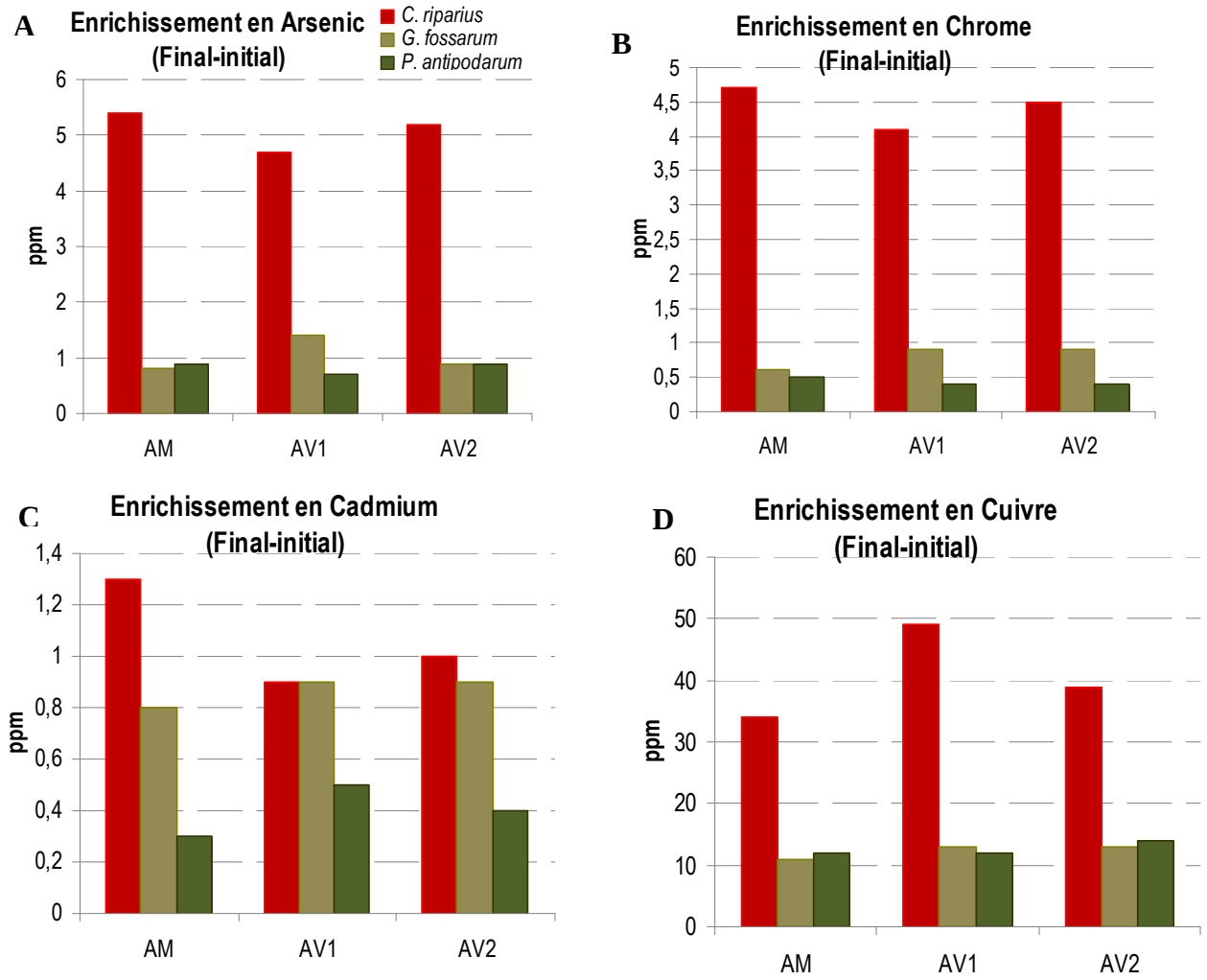
Ces résultats confirment l'exposition des gastéropodes aux polluants en situation de terrain. Certain polluants, tels que l'oxazepam, ou les alkylphénols sont très fortement bioaccumulés, mettant en évidence la possibilité d'utiliser les gastéropodes pour l'évaluation de la biodisponibilité des polluants organiques. Ils soulèvent notamment des questions concernant le transfert trophique des polluants dans la chaîne alimentaire.

β Comparaison avec d'autres organismes

L'exposition réalisée au laboratoire de l'amphipode, l'insecte et du gastéropode aux rejets urbains, a aussi été réalisée sur le terrain par encagement sur 3 sites : amont, aval immédiat et aval proche dans le cadre du Post-Doc de J. Faburé (Publi 19).

Comme pour l'exposition au laboratoire, l'insecte est l'espèce qui bioaccumule le plus de métaux (Figure 25). Hormis pour le cuivre et le cobalt, les niveaux sont légèrement supérieurs chez le gammare comparé au gastéropode. Cela semble confirmer ce qui avait été observé sur le Lot (Publi 11). Ce qui est assez intéressant de noter est la forte bioaccumulation chez le chironome. Celle-ci est certainement due au mode alimentaire du chironome et à la présence de matières en suspension dans le milieu. Quoiqu'il en soit, ces données suggèrent que pour la bioaccumulation des métaux, le chironome est un modèle nettement plus pertinent que les deux autres.

Pour ce dernier, les niveaux de bioaccumulation sont plus élevés sur le terrain qu'au laboratoire. Ce n'est le cas uniquement pour le Cd sur les deux autres organismes.



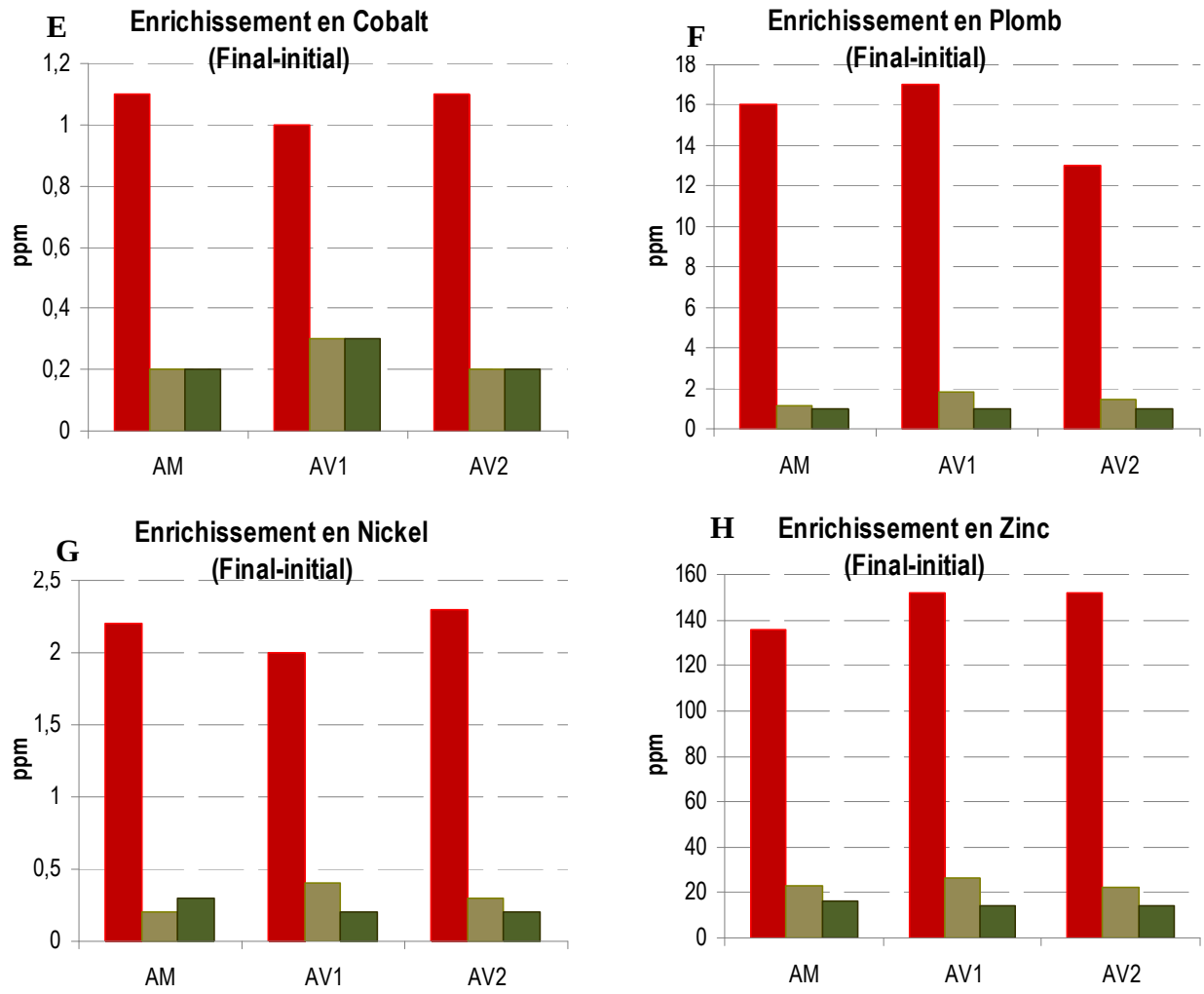


Figure 25: Bioaccumulation (concentration finale retranchée de la concentration initiale) de métaux *in situ* chez trois invertébrés aquatiques: C. riparius, G. fossarum et P. antipodarum. Arsenic (A), Chrome (B), Cadmium (C), Cuivre (D), Cobalt (E), Plomb (F), Nickel (G), et Zinc (H)

3. Conclusion sur les gastéropodes et la bioaccumulation

A ma connaissance, les gastéropodes ne sont pas utilisés pour évaluer la biodisponibilité des polluants en écotoxicologie d'eau douce, les bivalves leur étant préférés. Il n'y a pas d'étude permettant la comparaison fiable de leurs capacités d'accumulation. Cependant, d'après les études disponibles, il semble que les bivalves aient des capacités de bioaccumulation supérieures. Ce serait à confirmer, notamment pour l'oxazépam et les alkylphénols.

Le modèle gastéropode présente l'intérêt d'être épi-benthique et donc de permettre l'évaluation de la colonne d'eau (Gust et al., 2010a), comme le sédiment (Schmitt et al., 2011b) en encagement. En ce qui concerne *P. antipodarum*, il présente une résistance très importante aux variations de facteurs abiotiques. Cela permet des expositions dans des sites très variés, ce qui est un avantage non négligeable. En revanche, il semble que, comparé à d'autres invertébrés aquatiques, présentant ce genre de tolérance (le chironome), ses capacités de bioaccumulation (au moins des métaux) soient moindres. Il me semble donc que le chironome soit à privilégier si l'objectif de l'étude est l'évaluation de la biodisponibilité des polluants inorganiques. C'est à confirmer quand aux polluants organiques. Des résultats non encore disponibles au moment de la rédaction de ce manuscrit devraient permettre de le faire d'ici peu.

Cela dit, le chironome va principalement permettre l'évaluation de la qualité du sédiment, alors que *P. antipodarum*, par exemple, interagit également fortement avec la colonne d'eau. Par ailleurs, cette espèce présente l'avantage d'être sensible aux polluants (des effets sont observables sur les traits de vies comme la reproduction), contrairement au chironome. Il n'y a pas de mortalité associée aux expositions, mais un bon organisme pour la bioaccumulation de polluants est tolérant aux contaminants, donc peu sensible à leurs effets. *P. antipodarum* permet donc l'évaluation à la fois des effets, et de l'exposition. Le choix de l'espèce d'étude dépend donc de l'objectif fixé.

Une étude récente, dont tous les résultats ne sont pas disponibles au moment de la rédaction de ce manuscrit, s'intéressait notamment aux liens entre la bioaccumulation dans le gastéropode, dans le biofilm et la présence de polluants dans l'eau (Publi 18). Une exposition d'encagement a été réalisée en amont et en aval d'un rejet de station d'épuration traitant les effluents d'une ville et d'un hôpital. En parallèle, des systèmes de colonisation par le biofilm et des échantillonneurs passifs (chemcatchers) ont été associés. *P. antipodarum* se nourrit

principalement de biofilm lorsqu'il est encagé (Brown, 1980). L'objectif de cette étude était donc de comparer la bioaccumulation de composés organiques par rapport à ce qui est mesuré dans l'eau et le biofilm, afin de préciser la part de chacun dans l'exposition du gastéropode. En parallèle, les effets de l'effluent sur la biologie de l'organisme ont, bien entendu, été évalués. A ce stade, les effets biologiques ont été caractérisés, avec une induction très significative de la reproduction. Le biofilm est également contaminé, ainsi que l'eau (les résultats de l'expérimentation ne sont pas disponibles pour cette dernière), avec des différences notables entre les deux concernant la présence des molécules (kétoprofène par exemple présent dans le biofilm, mais pas dans l'eau). La contamination des gastéropodes (Tableau 10) a été évaluée et permettra d'évaluer si l'origine est plus due aux biofilms ou à la colonne d'eau, suivant les profils de bioaccumulations de chacun. Cette étude confirme la bioaccumulation importante d'oxazépam (même si elle reste nettement inférieure à ce qui avait été mesuré dans la Publi 1) et d'alkylphénols.

Cette étude est très préliminaire, mais ouvre déjà des perspectives très intéressantes sur l'importance de la voie trophique. Il est clair que le modèle gastéropode, se nourrissant de biofilm, est très pertinent dans ce cadre.

Tableau 10 : Contamination chimique des organismes exposés sur les 3 sites d'exposition (moyenne et écart-type, * indique une différence significative avec l'amont). Issu de Publi 18

Concentration (ng/g) and SD	LOQ (ng/g)	**Upstream**	**Immediate downstream**	**Farther downstream**
Pharmaceutical Products				
Carbamazepine	0.42	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Diclofenac	24.9			
Ibuprofen	11.2	**16.52** *2.13*	**16.31** *0.23*	**19.86** *1.65*
Ketoprofen	6.7			
Levonogestrel	12.5	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Lidocaine	4.27	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
Oxazepam	0.9	**902.00** *86.19*	**608.00** *55.22*	**1223.33** *77.69*
Alkylphenols				
Tert Nonyl Phenol	196	**280.67** *40.65*	**717.67** *24.42*	**687.33** *85.63*
Tert Octyl Phenol	184	**381.67** *56.32*	**855.33** *77.94*	**914.33** *137.78*

Phenols				
Bisphenol A	16.8	**36.43** *3.51*	**20.60** *1.97*	**91.67** *15.97*
PFAS				
PFOA	3.06	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**
PFOS	0.97	**<LQ**	**<LQ**	**<LQ**

En effet, ces organismes ont été choisi au départ pour leur grande sensibilité aux polluants, notamment de type PE (Matthiessen, 2008; Oehlmann et al., 2007). Nos résultats montrent qu'ils sont également capables de bioaccumuler les polluants, de manière relativement modérée pour certains (BPA) et importante pour d'autres (oxazépam, alkylphénols). Des études complémentaires seraient nécessaires pour caractériser de manière poussée leur intérêt pour évaluer l'exposition. L'évaluation de l'exposition est une discipline très complète en soi.

Ces quelques résultats soulignent tout de même l'intérêt de ces organismes pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes sur le plan de la mesure de l'exposition. La deuxième caractéristique d'un organisme pour qu'il soit adapté à l'évaluation de la qualité des écosystèmes est sa sensibilité aux polluants, que je vais maintenant aborder.

B / EVALUATION DES EFFETS : SENSIBILITE

Comme il a été retracé dans l'introduction, l'utilisation des modèles gastéropodes en écotoxicologie découle de leur grande sensibilité notamment envers les contaminants de type PE (TBT et BPA notamment). Une revue a été réalisée par Matthiessen (2008) sur le sujet, mettant en évidence le peu de modèles invertébrés disponibles, et l'intérêt des gastéropodes. De nombreuses autres revues se sont intéressées à l'utilisation des gastéropodes en écotoxicologie ces dernières années (Ketata et al., 2008; Lagadic et al., 2007; OECD, 2010; Weltje and Schulte-Oehlmann, 2007), ce qui montre bien l'actualité du sujet.

Au même titre que pour l'évaluation de l'exposition, il faut avouer que l'évaluation de la sensibilité des modèles gastéropodes n'a pas toujours été mon objectif premier. En effet, lorsque l'on rentre par une approche « mécanistique », les concentrations de polluant utilisées sont souvent élevées et pas très réalistes d'un point de vue environnemental. L'objectif est d'obtenir un effet dans un premier temps pour valider les marqueurs, leur sensibilité n'est testée qu'en seconde intention ! Toujours est-il que de nombreuses expérimentations ont été réalisées ces dernières années, aussi bien au laboratoire que sur le terrain. Dans le cas d'expérimentations de terrain, les concentrations sont forcément réalistes. Je ne m'intéresserai ici qu'aux études de laboratoires qui ont la même pertinence environnementale, et donc qui ont été réalisées à de très faibles concentrations.

1. Evaluation des effets en situation contrôlée : au laboratoire

De nombreux tests ont été réalisés au laboratoire ces dix dernières années sur des gastéropodes. Lorsqu'ils sont utilisés dans des batteries de tests, pour évaluer les effets de polluants organiques, les gastéropodes sont souvent parmi les espèces les plus sensibles. Par exemple, dans une batterie contenant un oligochète (*Lumbriculus variegatus*), un insecte (*Chironomus riparius*), un poisson (*Danio rerio*) et deux gastéropodes (*P. antipodarum* et *Melanoides tuberculata*), les deux espèces les plus sensibles au filtre UV testé (ethyl-methoxycinnamate –EHMC-) en terme de traits de vie, ont été les deux gastéropodes (Kaiser et al., 2012).

Le même genre d'études (sur des traits de vie) a été mené sur la fluoxétine, par exemple. Les deux espèces parthénogéniques, *D. magna* et *P. antipodarum* ont été les plus sensibles comparées à *Hyalella azteca* et C. *riparius* (Publi 17).

a. Reprotoxicité

Le tableau 11 fait le bilan des tests réalisés sur *P. antipodarum*, des différents traits de vie mesurés, et de leur sensibilité suivant les polluants.

Je me limite principalement sur cette espèce, car c'est celle sur laquelle j'ai le plus travaillé, et sur laquelle la bibliographie est la plus importante concernant les PE. De nombreux polluants autres que les PE ont été testés. Le tableau montre globalement, une assez bonne sensibilité à divers types de polluants. En revanche, une assez grande variabilité peut être observée suivant les expérimentations, et nous y reviendrons dans la partie sur les facteurs confondants.

Tableau 11: Utilisation de *P. antipodarum* en écotoxicologie

		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 and 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).
		Juvénile	Sédiment	Croissance	$LOEC_{NanoCuO}$=60µg/g	(Pang et al., 2012)
		Adulte	Sédiment	Reproduction (juvénile)	$LOEC_{aqCu}$=240µg/g	(Pang et al., 2012)
		Adulte	Sédiment	Taux alimentation	$LOEC_{NanoCuO}$=30µg/g ; $LOEC_{MicroCuO}$=30µg/g ; $LOEC_{AqCu}$=240µg/g	(Pang et al., 2012)
	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 and Forbes, 2001).

		Adulte	Eau	Létalité	$CL_{50CdCl2}$(48h)=1-7.20mg/l.	(Moller et al., 1994; Moller et al., 1996)
		Juvénile	Eau	Croissance	$LOEC_{CdCl2}$=200µg/L	(Forbes et al., 1995; Moller et al., 1996)
		Adulte	Sédiment	Croissance, âge et taille à la première reproduction, reproduction, taille à la naissance	$LOEC_{CdCl2}$=7,29µg/kg	(Jensen et al., 2001).
		Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$LOEC_{CdCl2}$(4sem)=1µg/L	(Sieratowicz et al., 2011)
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., 2009a)
	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., 2009a)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$LOEC_{BPA}$(4 sem)=20µg/L	(Sieratowicz et al., 2011)
	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	(Gagnaire et al., 2009a)
	NP	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{NP}$(8 sem)=10µg/kg	(Duft et al., 2003b)
	Mélange BPA/OP/NP	Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	$LOEC_{mélange}$(6 sem)=0.2/0.1/0.5µg/L	(Gust et al. Soumis)
		Juvénile	Eau	Reproduction (juvénile)	$LOEC_{mélange}$(4 sem)=1.8/0.9/4.5µg/L	
	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)	$LOEC_{504\text{-}MBC}$(8 sem)=1.17mg/kg	(Schmitt et al., 2008)
	Filtre UV (EHMC)	Adulte	Sédiment	Reproduction (embryons)	$LOEC_{EHMC}$(8 sem)=0.4mg/kg	(Kaiser et al., 2012)
Médicaments	**Carbamazépine**	Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	Pas d'effets	(Oetken et al., 2005)
	Fluoxétine	Adulte	Eau	Reproduction (embryons)	$LOEC_{fluoxétine}$(8 sem)=16µg/L	(Nentwig, 2007)
		Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	$LOEC_{fluoxétine}$(6 sem)=1µg/L	(Gust et al., 2009; Pery et al., 2008)
	Fadrozole	Adulte	Eau	Reproduction (embryon, juvénile)	$LOEC_{fadrozole}$(6 sem)=6.2µg/L	(Gust et al., 2010b)
Autre	**Atrazine**	Juvénile, adulte	Eau	Locomotion	$LOEC_{atrazine}$(5 sem)=10µg/L	(Gerard and Poullain, 2005)

	Toxine de cyanobactérie (mycrocystin L-R)	Juvénile, adulte	Eau	Survie, croissance, reproduction (embryons)	$LOEC_{mycrocysrtineL\text{-}R}$(5 sem)=33µg/L	(Gerard and Poullain, 2005)
	NH_3	Adulte	Eau	Locomotion	$LOEC_{NH3}$(40j)=0.07mg/L	(Alonso and Camargo, 2009)
	NH_4	Juvéniles, adultes et adultes sénescents	Eau	Létalité	CL_{50} (96h)=315µg/l pour juvéniles ; 490µg/l pour adultes ; 850µg/l pour individus sénescents	(Watton and Hawkes, 1984)

α Œstrogèno-mimétiques

Dès le début des années 2000, des études ont mis en évidence une sensibilité particulière au BPA, associée à des syndromes de superféminisation de *M. cornuarietis* (Oehlmann et al., 2000). Ces études ont ensuite été prolongées par d'autres, confirmant les résultats (LOEC de l'ordre de 1µg/L et NOEC d'environ 8ng/L), et suggérant des mécanismes en lien avec les stéroïdes sexuels de type vertébrés (Oehlmann et al., 2006). Ces études, montrant des effets à des concentrations environnementalement réalistes, ont été très controversées par la suite (Forbes et al., 2008). Quoiqu'il en soit, il semble que les gastéropodes présentent une sensibilité très importante à ce type de composés, et plus marquée que celle d'autres phylums. Ceci a été confirmé par des expérimentations sur *P. antipodarum*, qui ont montré des inductions de reproduction par le BPA, l'OP et le NP lors d'expositions par le sédiment (Duft et al., 2007; Duft et al., 2003b). Des résultats similaires ont été obtenus lors d'expositions par l'eau au BPA, l'OP et l'EE2 (Jobling et al., 2003). D'autres études, issues du laboratoire, n'ont pas été aussi concluantes quant à la sensibilité de *P. antipodarum* à l'OP et au BPA (Gagnaire et al., 2009a). Il semblerait également que *L. stagnalis* soit moins sensible à ces composés (Czech et al., 2001; Segner et al., 2003).

Dans une étude réalisée sur des mélanges à très faibles concentrations de BPA, OP et NP (Publi 3, Masters de V. Lecomte et M. Dupré), nous avons également observé une sensibilité (reproduction) moindre de l'espèce hermaphrodite *V. piscinalis*, comparé à l'espèce parthénogénique (*P. antipodarum*). En revanche, cette étude a confirmé la très grande sensibilité de *P. antipodarum* aux œstrogèno-mimétiques, puisque des concentrations inférieures au µg/L de chaque composé en mélange ont provoqué des inductions de reproduction significatives (Figure 4). Ces concentrations sont inférieures à celles qui provoquent des effets pour chaque composé individuellement (Gagnaire et al., 2009a; Jobling et al., 2003), ce qui montre que ces composés sont plus actifs en mélange qu'individuellement. La nature exacte des interactions (synergie, additivité) n'a cependant pas été évaluée.

Ce qui en ressort, en revanche, c'est que le risque environnemental est avéré, puisque des effets sont observés chez les adultes, comme chez les juvéniles à des concentrations très comparables avec ce qui se retrouve dans l'environnement.

Nos études, et de celles issues d'autres laboratoires, montrent clairement que ces espèces sont adaptées pour évaluer la qualité des écosystèmes d'eau douce, au moins en terme de sensibilité aux reprotoxiques.

β Médicaments

Nous avons réalisé d'autres études montrant des effets à des concentrations proches de celles observées dans l'environnement, bien que supérieures. Lors d'une exposition à la fluoxétine (Publi 16), avec *P. antipodarum* la reproduction avait été induite à 1µg/L. Cependant, ici encore, aucun effet significatif n'avait été observé chez *V. piscinalis*.

Il faut aussi noter que des effets de type hormesis sont régulièrement notés dans ce type d'expositions, avec une induction de reproduction pour les faibles concentrations, et une inhibition pour les fortes. Ces réponses non linéaires sont assez fréquentes, et complexes à prendre en compte en terme d'évaluation de risque. Cette étude, réalisée dans notre laboratoire, montre une sensibilité forte de cette espèce aux médicaments. Il faut cependant noter que la fluoxétine interagit avec le système neuroendocrinien (recapture de la sérotonine). Cette molécule n'est donc pas considérée comme un PE au sens limité d'interaction avec le contrôle de la reproduction, mais reste impliquée dans le contrôle hormonal.

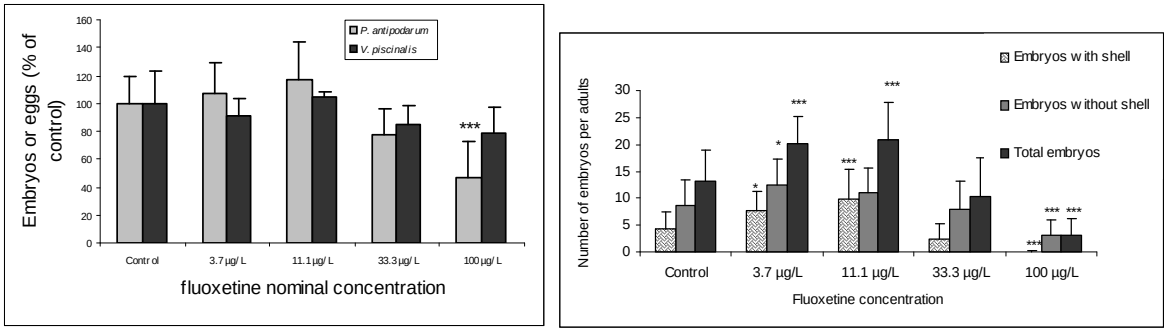


Figure 26: Effets de la fluoxétine sur la reproduction des gastéropodes. A: nombre cumulé de juvéniles (*P. antipodarum*) et d'oeufs (*V. piscinalis*). B, nombre d'embryons par *P. antipodarum* (moyenne et écart-types). Adapté de Publi 16

b. Immunotoxicité

Des études ont également été réalisées sur l'immunomodulation provoquée par les toxiques. C'est une démarche novatrice en écotoxicologie d'eau douce et assez peu répandue chez les invertébrés. A ma connaissance, seules les études sur la limnée sont disponibles. Ces études montrent que les marqueurs d'immunotoxicité sont sensibles aux polluants de type pesticides (Russo and Lagadic, 2000; Russo and Lagadic, 2004), médicaments (Publi 7) et effluents urbains (Publis 2 et 6).

Cette approche est déjà développée depuis plusieurs années chez les bivalves, notamment en situations de terrain (Bouchard et al., 2009; Farcy et al., 2011; Gagné et al., 2011; Gagne et al., 2008; Gagné et al., 2012). Il est important de noter que la réponse immunitaire est d'abord modifiée par des pathogènes, et secondairement potentiellement par des toxiques. Son objectif premier est l'élimination des bactéries, virus, parasites… Cependant c'est un marqueur, à la fois de l'état de santé, et également d'une exposition à des polluants.

Les études que nous avons menées montrent une grande sensibilité de la réponse immunitaire fonctionnelle et génomique à des médicaments à des concentrations environnementalement réalistes et à des eaux de surfaces contaminées par des effluents. Il est donc clair que cette réponse est extrêmement sensible. Ici, les travaux engagés sont encore assez préliminaires, ce qui limite le recul. La question qui se pose dès lors est celle de sa spécificité. En effet, il reste à déterminer si cela correspond à une réponse globale au « stress », ou si certains marqueurs peuvent être plus spécifiques d'un type de pollution. Comme déjà évoqué dans le chapitre précédent, un travail important reste à réaliser dans ce domaine.

c. Variation de sensibilité interspécifique

Nous avons le plus souvent possible travaillé sur deux espèces aux modes de reproduction différents, lorsque nous étudions les effets reprotoxiques. Les effets ont alors été très différents, avec des espèces très sensibles, et d'autres moins. Les études portant sur deux espèces proches, et portant sur leur différence de sensibilité sont assez rares, car complexes à mettre en œuvre. Elles se font notamment sur *D. magna* et *C. dubia*, et certain auteurs en ont conclu qu'il n'y avait pas de différence marquée entre les deux (Constantine and Huggett, 2010).

α Mode de reproduction

Ce qui ressort des études sur les gastéropodes d'eau douce (les nôtres et celles d'autres équipes), est une grande différence de sensibilité suivant le mode de reproduction. Ainsi, si je devais défendre les gastéropodes comme modèles en eau douce par rapport aux bivalves, je pense que je mettrais en avant leurs modes de reproduction, qui en font des organismes plus complexes pour l'évaluation des effets reprotoxiques : ils peuvent être à sexes séparés, hermaphrodites ou parthénogéniques.

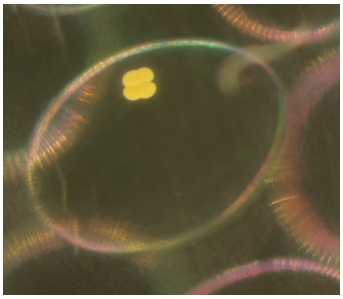
Lorsque les polluants étudiés impactent préférentiellement les gonades mâles ou femelles, la présence du tissu cible sera à l'origine de la sensibilité de l'organisme. Ainsi, une espèce parthénogénique comme *P. antipodarum* n'a que des tissus femelles. Elle sera particulièrement sensible aux polluants les altérant, alors qu'elle le sera moins aux polluants impactant les tissus mâles.

Nous n'avons travaillé que sur deux modèles, une parthénogénique et un hermaphrodite, et nous avons montré une grande variation de sensibilité entre nos deux espèces modèles. Nous n'avons pas introduit de modèle gonochoristique, ce qui aurait certainement été très pertinent. Ici encore, il faut bien noter la difficulté expérimentale liée à l'utilisation de multiples espèces. Outre la partie expérimentale pure, il y a toute la connaissance biologique liée au modèle (cycle de vie, élevage…), qui nécessite un investissement en temps très important.

β Mode de ponte

Par ailleurs, il ne faut pas négliger le mode de ponte. En effet, chez l'espèce ovovivipare (*P. antipodarum*), le développement des œufs se fait entièrement dans l'organisme, avec une protection par la poche embryonnaire. Chez l'espèce ovipare (*V. piscinalis*), les œufs se développent au sein d'une masse, donc théoriquement moins protégés. La sensibilité des phases embryonnaires chez deux ces espèces devrait être étudiée plus en avant. Il est très possible que qu'elle soit différente. Des travaux sur le sujet seraient très intéressants, d'autant plus que de nombreuses études montrent que les phases embryonnaires sont très sensibles à une vaste gamme de polluants (Hagger et al., 2002; Roepke et al., 2005; Saco-Alvarez et al., 2010; Soares et al., 2009; Zhang et al., 2011a). C'est certainement une piste à approfondir. Nous avons d'ailleurs commencé à étudier plus en avant le développement embryonnaire de la limnée (Figure 27, Publi 21).

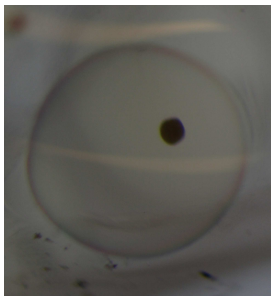
4 cells



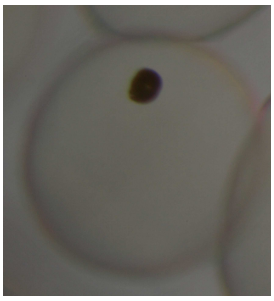
Day 1(magnification factor(m.f.):*63)

Morula

Yellowish colour



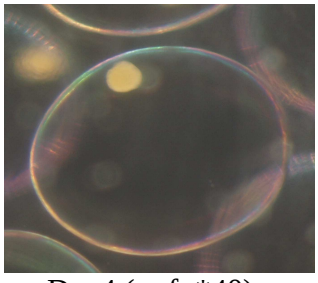
Day2(m.f.:*63)



Day3(m.f. :*63)

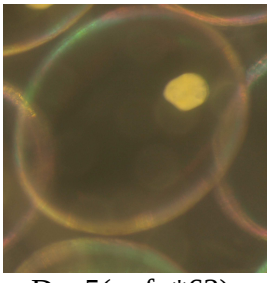
Trocophore

granular appearance



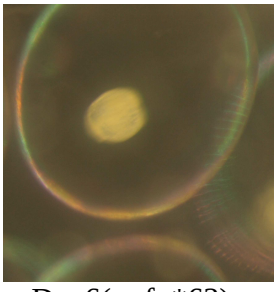
Day4 (m.f.:*40)

loss of round appearance,



Day5(m.f.:*63)

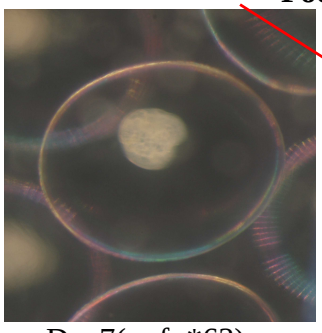
slow-movement



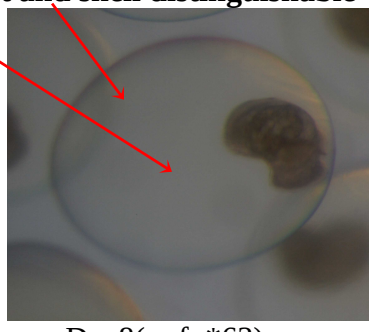
Day6(m.f.:*63)

Veliger

Foot and shell distinguishable



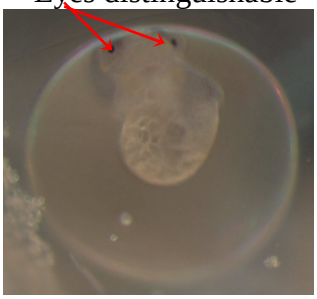
Day7(m.f.:*63)



Day8(m.f.:*63)

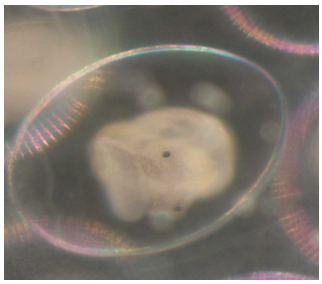
Day9(m.f.:*40)

Eyes distinguishable

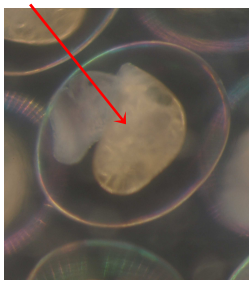


Day10(m.f.:*63)

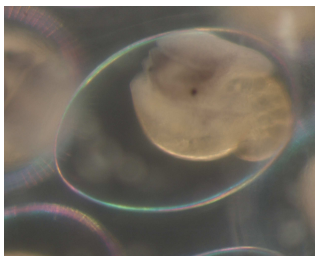
detectable foetal heartbeat



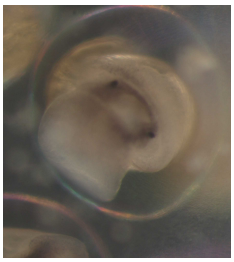
Day11(m.f.:*40)



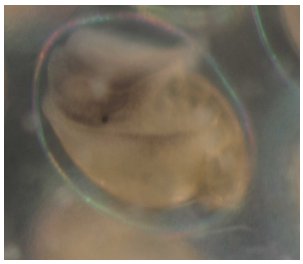
Day12(m.f.:*63)



Day13(m.f.:*63)

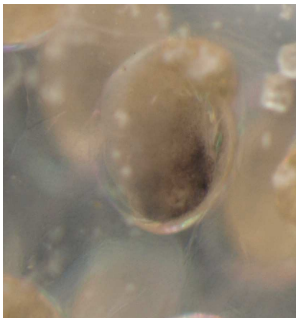


Day14(m.f.:*63)

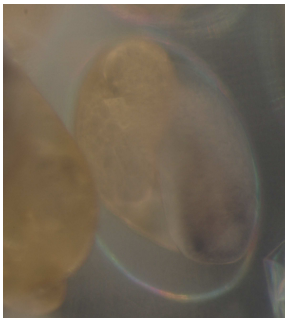


Day15(m.f.:*40)

Disappearance of the cell membrane



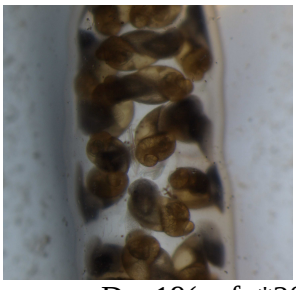
Day16(m.f.:*20)



Day17(m.f.:*63)

Day18(m.f.:*10)

Hatching (juvenile evacuation by egg mass both ends)

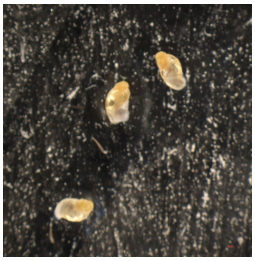


Day19(m.f.:*20)

Day21(m.f.:*10)

Day22(m.f.:*10)

Juvenile



Day25

Figure 27: Stades du développement embryonnaire de la limnée à 16°C. Issu de Publi 21

2. Sur le terrain

Plusieurs études d'évaluation des effets des rejets localisés ont été réalisées *in situ*, principalement avec *P. antipodarum* (un essai avec *V. piscinalis* a montré que cette espèce n'était pas assez robuste). Les effets de rejets de stations d'épuration ont été évaluées (urbaine industrielle…), ainsi que ceux de rejets miniers. Dans tous les cas, la fécondité a été un marqueur sensible, qui a été impactée (augmentation ou diminution) suivant les sites.

a. Bourbre

Dans le cas d'une station d'épuration traitant des effluents urbains et industriels (Publi 1), une diminution de reproduction significative a été observée par rapport aux sites amont, aussi bien à l'aval immédiat que sur un aval plus éloigné (Figure 11). La contamination du site a été caractérisée, par des mesures dans l'eau, mais également dans les organismes pour évaluer l'exposition (Tableaux 8 et 9). Une forte contamination, en médicaments (oxazépam) notamment a été notée. Cette étude est un cas réaliste de l'évaluation de la qualité biologique des milieux, aussi bien en terme d'effets que d'exposition.

Cette étude montre notamment que *P. antipodarum* est une espèce sensible aux pollutions ponctuelles organiques.

b. Decazeville

Elle vient en complément d'études antérieures, où les effets d'un gradient de pollution métallique (Cd et Zn) avaient été évalués (Publi 11). *P. antipodarum* est une espèce très adaptée pour ce type d'exposition.

c. Sipibel

L'encagement de *P. antipodarum* a également été appliqué à des rejets hospitaliers, mettant en lumière une contamination particulière du milieu, en relation avec les transferts trophiques (Publi 18).

Ici, contrairement à l'étude précédente, les effets se sont traduits par une induction de la reproduction à l'aval proche (Figure 7), démontrant une fois de plus la sensibilité de ce trait de vie aux pollutions en situation de terrain. Les niveaux de reproduction de l'amont étaient comparables à ceux observés dans des populations de terrain (Gust et al., 2011b), et cette induction n'est pas due à un apport alimentaire plus abondant. La typologie de contamination est différente, ce qui explique sans aucun doute la différence d'effets.

Par ailleurs, des études précédentes avaient montré une contamination du biofilm et des effets sur la diversité associés. La diversité du biofilm ne permet pas de discriminer les sites entre eux avant la construction de l'hôpital, alors que la STEP était déjà présente mais ne traitait que les rejets urbains. Après son raccordement à la STEP, les sites amont et aval sont discriminés. Les effets temporels restent supérieurs aux effets du rejet de la STEP (Figure 28). Des auteurs avaient rapportés que *P. antipodarum* se nourrissait du biofilm colonisant les systèmes d'exposition lors d'expérimentations de caging (Brown, 1980). Lors de cette exposition, la contamination trophique (biofilm ou colonne d'eau) a été évaluée. Ici encore, les démarches sont très préliminaires et nécessitent des travaux complémentaires.

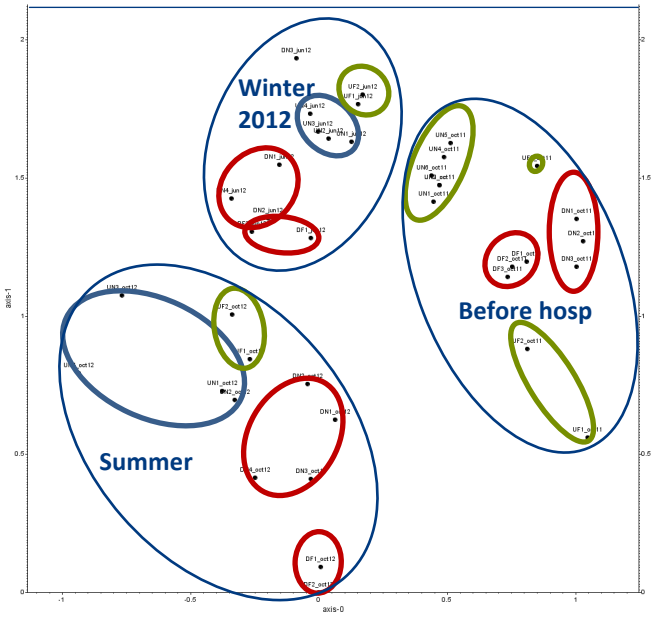


Figure 28: Diversité du biofilm sur les sites de Sipibel suivant les saisons. Les sites en amont de la STEP apparaissent en vert ou bleu et les sites en aval en rouge.

d. Méthodologie d'encagement

Lors du développement de la méthodologie, nous avions mis en évidence une grande robustesse aux variations de facteurs abiotiques (Gust et al., 2010a). La méthodologie développée au laboratoire n'est applicable que pour l'évaluation de la qualité de la colonne d'eau. D'autres auteurs ont développé une méthodologie pour l'évaluation de la qualité des sédiments en utilisant le même organisme (Schmitt et al., 2011b). Je ne remets pas en cause leur méthode d'exposition, que je n'ai pas testée, mais en revanche, les études de ces auteurs souffrent, à mon sens, de validité biologique : les taux de reproduction des témoins sont anormalement faibles, et lorsque les auteurs concluent à une augmentation de reproduction,

les taux sont alors juste dans une norme physiologique basse. L'alimentation n'est pas contrôlée. Une hypothèse serait que le sédiment d'exposition apporte une ressource alimentaire supérieure et donc permet une meilleure reproduction. A mon sens, ces études manquent de réalisme biologique, dans la mesure où la physiologie de base de l'espèce n'est que très peu prise en compte.

Il existe une grande variabilité des réponses chez *P. antipodarum* ce qui reste un défaut majeur pour l'utilisation de cette espèce. Par ailleurs, la démarche appliquée est systématiquement amont/aval, avec un amont qui sert de témoin à l'aval mais qui est en rien une référence (et les mesures chimiques dans les organismes en sont la preuve). Il reste difficile de s'affranchir de ce site amont et de pouvoir interpréter les résultats d'expositions *in situ* indépendamment de lui. Dans l'idéal, il faudrait suffisamment bien connaitre les marqueurs pour pouvoir interpréter leurs variations dans l'absolu et non en relatif. Ici encore, un gros travail de recueil de données et d'étude du modèle serait nécessaire pour permettre cela. Cette démarche est indispensable si l'application de ce biotest doit se faire à grande échelle. Il faut tout de même noter que ces problématiques se posent également lors des expérimentations de laboratoire. Cela me mène tout naturellement à l'importance des facteurs confondants.

3. Facteurs confondants

a. Température

Les résultats obtenus sont variables d'une étude à l'autre, même pour une même espèce et un même composé. Nous l'avons par exemple observé sur *P. antipodarum*, où nous avions une induction de la reproduction aux faibles concentrations (Publi 16), alors que d'autres auteurs ne l'observaient pas (Nentwig, 2007). Un des éléments de différence entre les deux études était la température d'exposition. Plusieurs études ont démontré que la sensibilité des gastéropodes dépendait notamment de la température de test (Aufderheide et al., 2006; Moller et al., 1994; Oehlmann et al., 2006; Sieratowicz et al., 2011), bien que cela puisse être controversé (Forbes et al., 2008).

J'ai également réalisé une expérimentation chez *P. antipodarum* pour déterminer les conséquences de la température d'exposition sur la reproduction et les facteurs associés (Publi 10). L'objectif de cette étude était réellement d'évaluer si des changements de température d'exposition (en laboratoire et sur le terrain) pouvaient avoir des conséquences sur le niveau

des différents marqueurs, hors exposition à des toxiques. Elle a notamment permis de connaître la durée du développement embryonnaire suivant la température.
Par ailleurs, une autre étude sur ce même organisme s'est intéressée à la différence de toxicité d'un polluant modèle, le BPA, suivant la température d'exposition (Sieratowicz et al., 2011). Cette étude montre que la toxicité est diminuée à faible température, certainement du fait de la longueur du développement embryonnaire. Les conditions d'expérimentation sont extrêmement importantes et doivent être un maximum reproductibles et contrôlées (Matthiessen, 2008).

Plus récemment, cette démarche sur les facteurs confondants et la physiologie de la limnée a été amorcée en collaboration avec A. Sapin (technicien en charge de l'élevage au laboratoire) et lors du Post-Doc de J. Faburé, du stage de M. Chapuis et de la thèse de P. Boisseaux (Publi 21). L'éclosion des masses a été suivie à différentes températures physiologiques (16, 20 et 24°C). Le temps de développement embryonnaire est inversement proportionnel à la température de l'eau. Il s'accélère à partir de la phase véligère. En revanche, la croissance d'individus exposés tout au long de leur développement à ces températures est similaire (Figure 29A). Cela montre une adaptation aux températures de l'eau en condition de nourriture *ad libitum*. La reproduction des limnées exposées à 20 et 16°C est comparable, alors que celle des limnées exposées à 24°C est significativement plus faible (Figure 29B). Il semble donc que cette température plus élevée, soit au dessus de ce qui est physiologiquement acceptable, et que les limnées n'investissent que dans la reproduction.
Par ailleurs l'influence des températures d'exposition sur la réponse immunitaire a été évaluée. Comme il est clair que la raison d'être de la réponse immunitaire est la défense contre les pathogènes, il existe forcément de multiples facteurs de variation de celle-ci, indépendamment de l'exposition aux toxiques. Nous avons ainsi pu déterminer que la température d'exposition, tant qu'elle était dans des gammes physiologiques, n'avait pas de conséquence sur la capacité immunitaire (Figure 29C). Lors d'expositions à des chocs thermiques, la réponse immunitaire est impactée en revanche. Il y a donc un phénomène d'adaptation.
Cette étude montre que des traits de vie, comme la reproduction peuvent être impactées, alors que la réponse immunitaire ne l'est pas. Ce ne sont que des études préliminaires, mais ici encore, il faudra améliorer les connaissances.

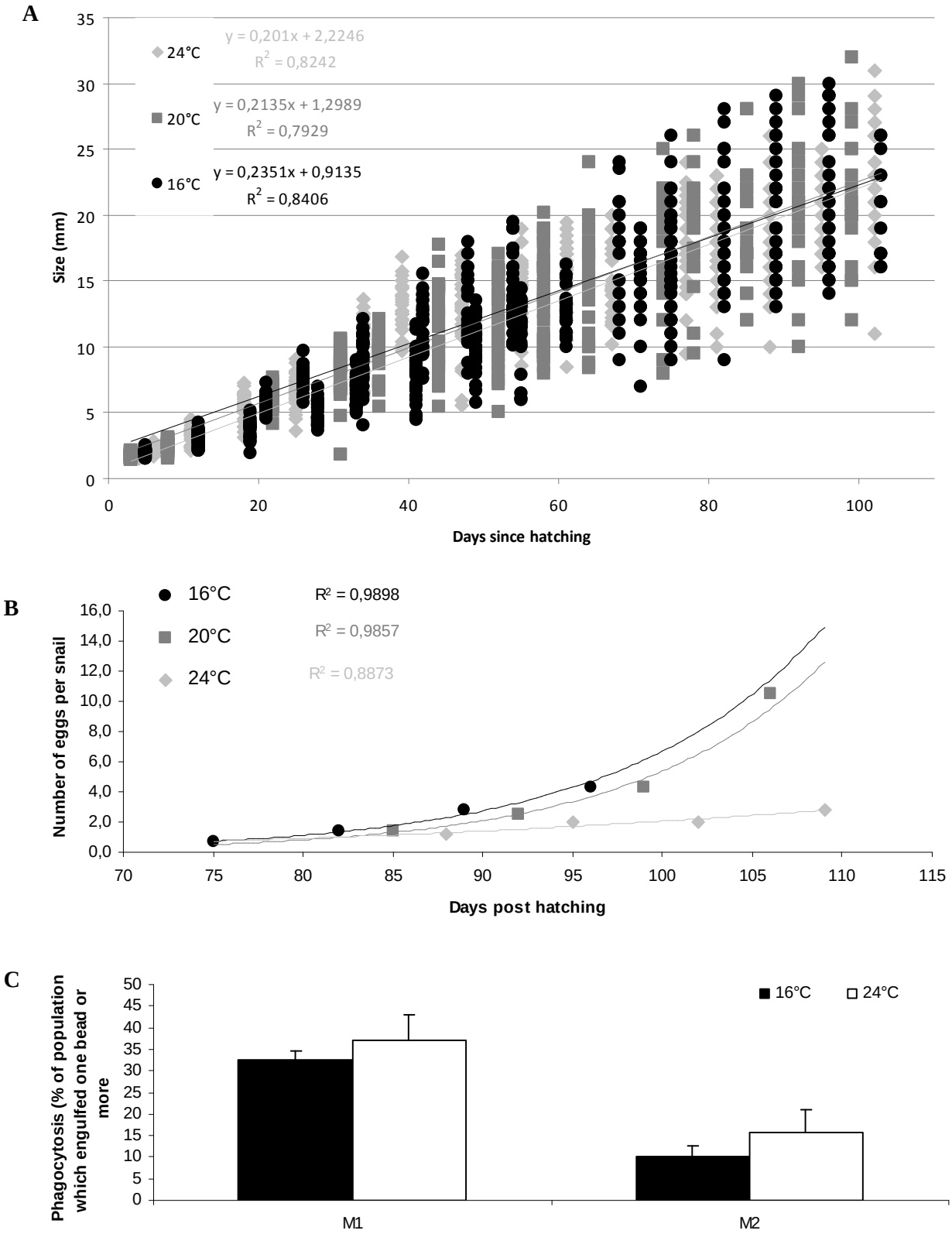
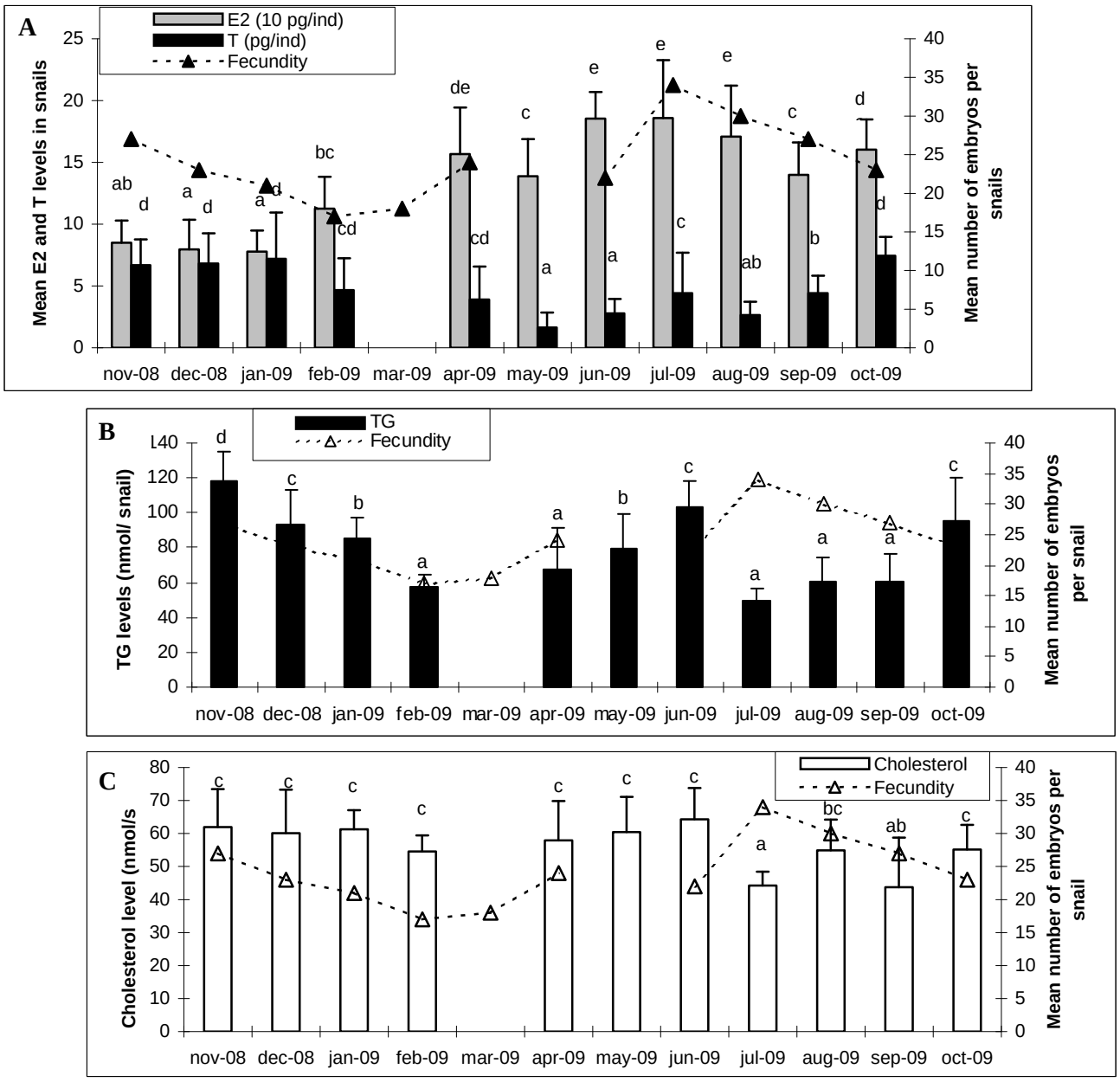


Figure 29: Effet de la température d'exposition (16, 20 et 24°C) sur la physiologie de *L. stagnalis*. A : Croissance après éclosion ; B : Nombre d'œufs par adultes ; C : Phagocytose (M1: immunocompétence et M2: immunocapacité) à différentes températures d'exposistion. Adapaté de Publi 21

b. Variabilité naturelle

Afin de mieux comprendre les modèles d'études, un travail conséquent a été réalisé de compréhension des cycles biologiques. Chez *P. antipodarum*, nous avons étudié les variations des marqueurs suivis au cours d'un cycle annuel de la population dont est issu l'élevage (Publi 9). Cela nous a permis de définir une gamme de variation « physiologique » (Figure 30). Lors des expérimentations qui ont suivi cette caractérisation, il a été possible de replacer les variations des marqueurs dans la gamme physiologiquement acceptable. C'est extrêmement important, en particulier pour le suivi du nombre d'embryons dans la poche embryonnaire.



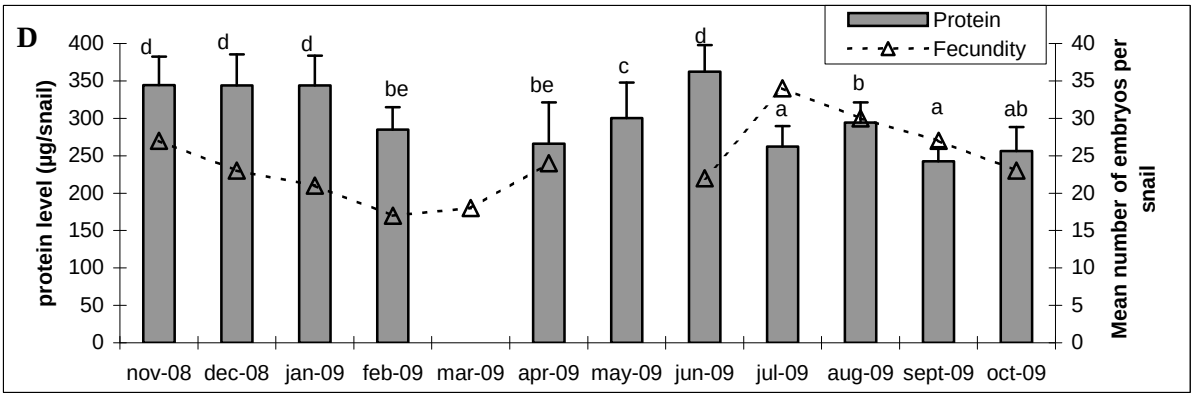


Figure 30: Niveaux de variation physiologiques (moyenne et écart-type) de différents marqueurs dans une population naturelle de *P. antipodarum*. A : stéroides, B : triglycérides, C : cholestérol, D : protéines. Issu de Publi 9

Comme évoqué précédemment, plusieurs études ont conclu à des inductions de reproduction, alors que la reproduction des témoins était très faible (Schmitt et al., 2010; Schmitt et al., 2011a). Les auteurs mettent en évidence des effets très significatifs, alors que la reproduction des témoins est tellement basse, qu'elle-même est le signe qu'un dysfonctionnement est en cours.

Il est absolument nécessaire d'introduire des critères de validité des expérimentations, et le niveau de reproduction des témoins en est un. C'est pour ces mêmes raisons que nous avons introduit la mesure des réserves énergétiques, et particulièrement en conditions de terrain. Il nous est apparu nécessaire de s'affranchir des causes alimentaires lors de suivi de la fécondité. De nombreux facteurs peuvent faire varier la fécondité des témoins (Tableau 12), comme la taille, l'origine des organismes, la température d'exposition, le type d'exposition (caging, eau, sédiment), ou d'alimentation. Il convient de maitriser au maximum les différents facteurs d'exposition pour limiter la variabilité des réponses.

Tableau 12: Fécondité chez les témoins *P. antipodarum* suivant les conditions expérimentales (température, taille, nourriture, origine, alimentation). Issu de Publi 9

Exposition medium	Size of organisms (mm)	Origin of organisms	*T* (°C)	Food	Unshelled embryos	Shelled embryos	Total embryos	References
Laboratory Sediment								
	>3.6	Culture	15 ± 1	Tetraphyll + Fish Tamin				[6,7]
		Culture	15.6		3–6 (14–56 d)	3–8 (14–56 d)	8–14 (14–56 d)	[25]
	4 ± 0.5	Culture	16	Leaves	1 (56 d)			[32]
	3.8 ± 0.5	Culture	15 ± 1	Leaves			2–5 (28–56 d)	[35]
	3.5 ± 1	Field	16	Tetraphyll			15 (28 d)	[34]
Laboratory Water								
		Culture		Lettuce	1–2 (14–42 d)		10–12 (14–42 d)	[20]
	4.6 ± 0.2	Culture	20	Lettuce			7.5 (35 d)	[10]
	4.1 ± 0.1	Culture	20	Lettuce			2.5 (35 d)	[10]
	>3.7	Culture	16 ± 1	Tetraphyll	7 (28 d)	7 (28 d)	14 (28 d)	[30]
	>3.7	Culture	16 ± 1	Tetraphyll	6 (28–56 d)	11 (28–56 d)	17 (28–56 d)	[28]
	4.4 ± 0.3	Culture	21	Tetramin	4 (42 d)	9 (42 d)	13 (42 d)	[14]
	4.3 ± 0.3	Culture	16 ± 1	Tetramin				[13]
		Culture	16	Tetraphyll			2 (28 d)	[36]
	>3	Field	14 ± 0.7		13–2 (14–28 d)		22–6 (14–28 d)	[11]
	4.4 ± 0.2	Field	7.8 ± 0.2	Tetramin	1–3 (14–56 d)	1–2 (14–56 d)	2–5 (14–56 d)	[17]
			15.8 ± 0.2		4–9 (14–56 d)	1–7 (14–56 d)	5–15 (14–56 d)	
			24.3 ± 1.1		2–4 (14–56 d)	1–2 (14–56 d)	4–6 (14–56 d)	
Field								
	3.3–4.3	Culture		Sediment			4–10 (28 d)	[33]
	4.2 ± 0.2	Field		Biofilm	3–10 (7–28 d)	6–10 (7–28 d)	10–17 (7–28 d)	[16]
	4.4 ± 0.4	Field		Biofilm	3–9 (21–28 d)	5–16 (21–28 d)	9–25 (21–28 d)	[15]

Par ailleurs, aussi bien lors du suivi des populations terrain, que dans les élevages, une saisonnalité dans la reproduction est observée (observations personnelles et Gust et al., 2011b; Sieratowicz et al., 2011). A ma connaissance, il n'y a pas réellement d'études qui s'intéressent à la sensibilité de *P. antipodarum* suivant la saison d'exposition. Un travail intéressant serait certainement à mener sur ce sujet, comme cela a été fait chez *M. cornuarietis* chez qui les observations sont relativement contradictoires (Aufderheide et al., 2006; Forbes et al., 2007a; Forbes et al., 2007b; Forbes et al., 2008; Oehlmann et al., 2006).

La caractérisation de la variabilité chez les individus témoins est indispensable lors des tests en écotoxicologie afin de s'assurer que les organismes utilisés sont convenables pour une réalisation correcte des tests. La connaissance des valeurs seuils est également nécessaire à la réalisation de schémas d'expérimentations permettant une puissance statistique suffisante pour discriminer les effets des polluants ou autres conditions expérimentales (Forbes et al., 2007b). Ainsi, chez *M. cornuarietis*, le gastéropodes chez qui le plus d'études de variabilité de réponses ont été effectuées, la fécondité est le trait le plus variable, suivi par la croissance des juvéniles, le pourcentage d'éclosion et la durée d'éclosion (Forbes et al., 2007a). Suite à la caractérisation de cette variabilité, les auteurs sont en mesure de proposer des schémas expérimentaux robustes d'un point de vue statistique.

Aucun travail équivalent n'a été réalisé chez *P. antipodarum*. Il serait nécessaire de le faire afin de : (i) définir des valeurs seuils de reproduction des témoins (10 embryons au minimum par exemple) ; (ii) définir la variabilité des témoins ; (iii) définir le nombre de réplicats et

d'individus par réplicats nécessaires pour détecter un pourcentage d'effet par rapport au témoin avec une puissance statistique de 80% par exemple.

c. Solvants

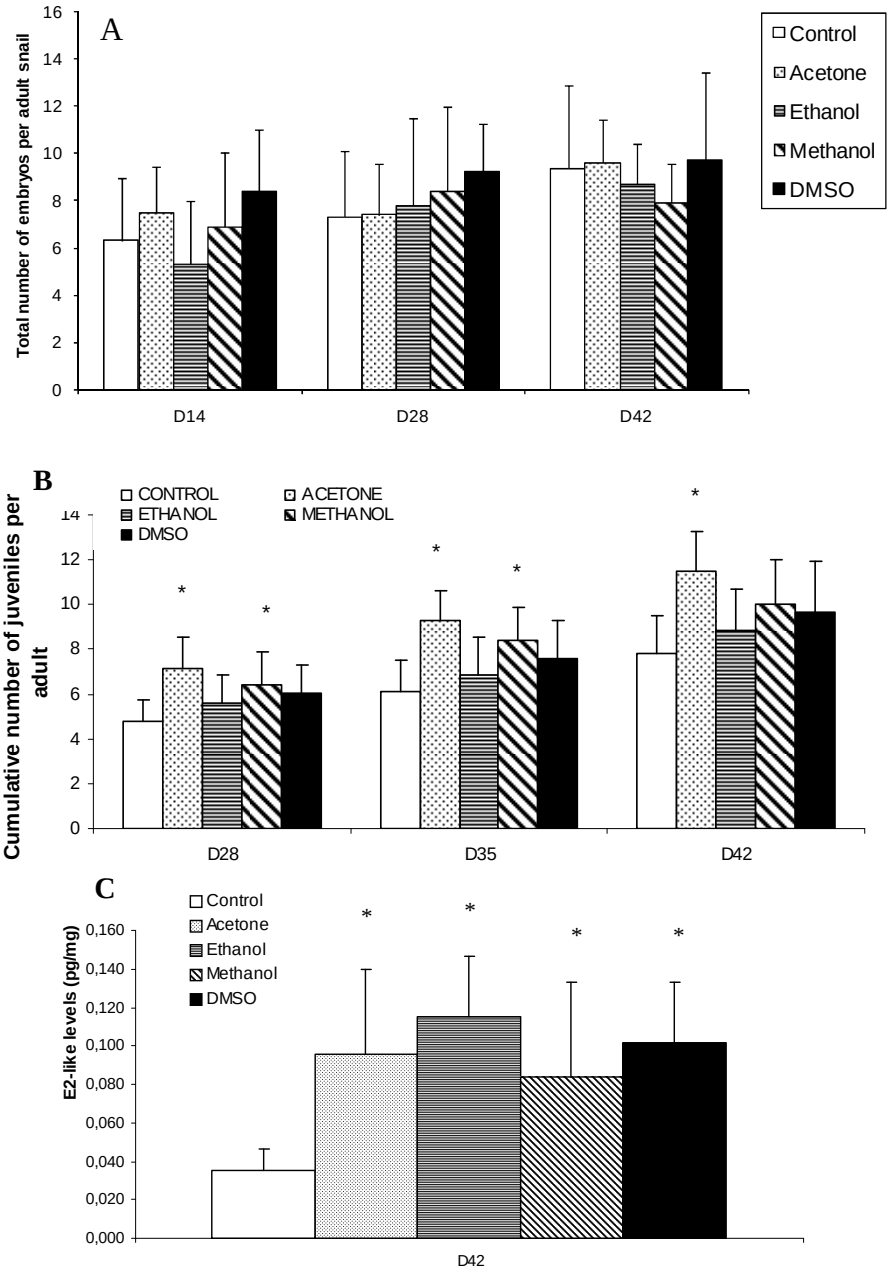
Un autre facteur confondant important est l'utilisation de solvants pour permettre l'exposition via l'eau à des toxiques non miscibles dans l'eau. Une revue de Hutchinson et al. (2006) mettait en évidence les effets délétères de ces derniers et conseillait de limiter les concentrations d'expositions à 20µL/L (norme OCDE de 100µL/L). Ayant également observé des effets dans nos témoins solvants au laboratoire, nous avons voulu caractériser plus en avant les effets de ces derniers à faibles concentrations sur la reproduction et les marqueurs associés chez *P. antipodarum* lors du Master de V. Lecomte (Publi 5).

Ainsi, l'exposition aux solvants seuls (acétone, ethanol, methanol, DMSO) est bel et bien un facteur confondant chez cette espèce, à des concentrations aussi basses que 20µL/L :

- l'éthanol diminue la croissance des juvéniles,
- l'acétone diminue la durée du développement embryonnaire.

Les solvants induisent aussi des modifications sur la physiologie de la reproduction :

- augmentation des niveaux d'E2-like,
- modification des niveaux d'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisations des œstrogènes (Figure 31).


A
Total number of embryos per adult snail
16
14
12
10
8
6
4
2
0
D14
D28
D42
Control
Acetone
Ethanol
Methanol
DMSO
B
Cumulative number of juveniles per adult
CONTROL
ACETONE
ETHANOL
METHANOL
DMSO
D28
D35
D42
C
E2-like levels (pg/mg)
0,160
0,140
0,120
0,100
0,080
0,060
0,040
0,020
0,000
Control
Acetone
Ethanol
Methanol
DMSO
D42

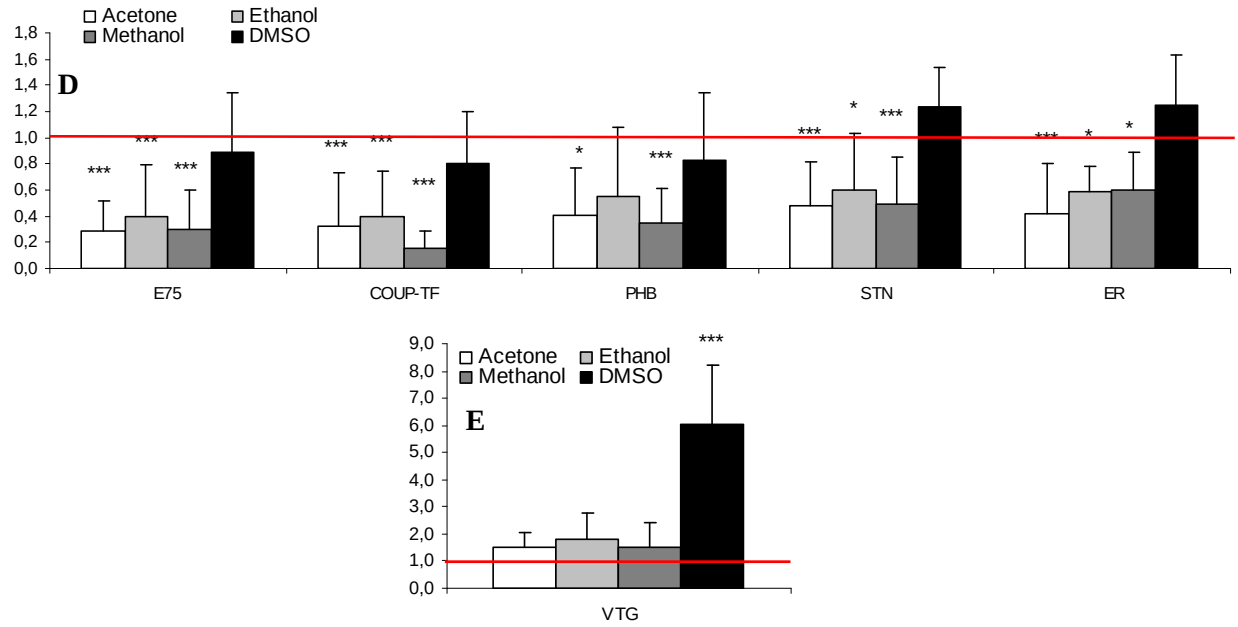


Figure 31: Effets des solvants sur différents traits de vie et marqueurs chez *P. antipodarum* (moyenne et écart-types, * indique une différence significative par rapport au témoin p<0.05). A : nombre d'embryons dans la poche embryonnaire, B : nombre cumulé de juvéniles, C : niveaux d'E2, D et E : expression de gènes. Issu de Publi 5**

Cette étude met en évidence les effets des solvants usuellement utilisés en écotoxicologie à de très faibles concentrations. Il faut autant que faire se peut limiter leur utilisation. Lorsque ce n'est pas possible, il faut alors choisir celui qui impacte le moins les marqueurs mesurés et choisir une concentration la plus faible possible. Bien que des effets soient notés, les mécanismes sous-jacents sont encore très mal compris.

Ces résultats sont à mettre en relation avec les très hauts niveaux de bioaccumulation de tNP chez *P. antipodarum* mesurés dans la publi 3. Bien que la contamination des solvants utilisés pour les expositions ne soit pas mesurable, elle est tout de même à l'origine de la contamination des organismes. Tous les effets observés lors de cette expérimentation ne sont pas forcément dus aux alkylphénols, d'autres polluants étant potentiellement présents. Quoiqu'il en soit, ces données de chimie confirment que l'utilisation de solvants est à proscrire au maximum.

C / CONCLUSION

En conclusion, les gastéropodes et plus particulièrement *P. antipodarum* sont des organismes très intéressants pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques d'eau douce. La majorité des études d'encagements ont été réalisées sur *P. antipodarum* et par notre laboratoire d'IRSTEA. J'ai soulevé les grandes limites posées par la variabilité des réponses, mais ces inconvénients pourraient certainement être compensés par des schémas expérimentaux adaptés. Un énorme travail sera à fournir pour étudier correctement la variabilité et définir des valeurs seuils. J'ai commencé au cours de ces dernières années, mais beaucoup reste à faire. Cet organisme étant proposé à l'OCDE, il y a de fortes chances pour que plusieurs laboratoires participent l'effort nécessaire à cela. Cela semble d'autant plus indispensable que cet organisme est très sensible à certains types de polluants. Il convient donc que les schémas expérimentaux ne soient pas critiquables, afin que les résultats obtenus ne le soient pas non plus.

Quoiqu'il en soit, c'est un organisme très adapté aux expositions de terrain du fait de sa grande résistance. Sa petite taille peut paraitre un inconvénient au premier abord, mais avec la miniaturisation des méthodes d'analyses (chimiques, moléculaires, biochimiques…), ce désavantage reste au final, limité. Ce n'est pas forcément l'organisme de premier choix pour l'évaluation de l'exposition, mais il reste très convenable. Il bioaccumule aussi bien les métaux que les composés organiques. Dans la mesure où c'est un organisme sensible, d'autres espèces seraient certainement à favoriser si l'objectif est uniquement l'évaluation de l'exposition. L'intérêt de *P. antipodarum* est la possibilité d'évaluer conjointement l'exposition et l'effet.

En terme de sensibilité aux polluants, les gastéropodes sont des organismes extrêmement intéressants. Comme nous l'avons souligné dans cette partie, ils sont très sensibles aux polluants reprotoxiques, mais également aux immunotoxiques. Toutes les réponses observées ne sont pas encore bien comprises, mais les concentrations les induisant sont très faibles. Leurs modes de reproductions variés en font des organismes très sensibles aux composés de type perturbateurs endocriniens. Leur vaste gamme de physiologie et de taille permet également d'évaluer les effets immunotoxiques sans traumatisme associé.

Il n'y a certainement pas un modèle de gastéropode qui permet de répondre à toutes les problématiques. En revanche, deux d'entre eux, *P. antipodarum* et *L. stagnalis* sont proposés à l'OCDE comme biotests pour évaluer les effets reprotoxiques, ce qui illustre bien l'effort de recherche engagé ces dernières années, et l'intérêt qu'ils peuvent revêtir. Pour avoir travaillé sur les deux modèles, mon sentiment personnel est qu'ils ne répondent pas exactement aux mêmes questions et qu'ils sont certainement très complémentaires. Je ne pense pas qu'il existe un modèle parfait en écotoxicologie, qui permette de tout évaluer (l'exposition, les effets, les mécanismes impliqués…). L'intérêt de travailler sur les invertébrés, et plus particulièrement les mollusques, et encore plus étroitement les gastéropodes, est leur grande diversité. A ma connaissance, il n'y a jamais eu d'expositions conjointes de limnée et de *P. antipodarum*, comme ce que nous avons pu faire avec *V. piscinalis*. Enormément d'études sont en cours de réalisation dans le cadre du groupe de travail OCDE sur le sujet pour évaluer la robustesse des modèles. Il serait intéressant de les comparer en conditions parfaitement identiques.

Je n'ai personnellement aucun recul sur le biotest limnée tel que préconisé par l'OCDE, puisque je ne l'ai utilisé que comme modèle d'immunotoxicologie. De ce que j'ai pu observer, l'élevage de la limnée est bien plus aisé que celui de *P. antipodarum*. C'est certainement dû à une bien meilleure connaissance du modèle biologique. Au sein den notre laboratoire, la personne en charge de l'élevage (Alexandre Sapin), qui est extrêmement compétente dans son domaine semble trouver de nombreuses améliorations aux méthodes d'élevage des gastéropodes. Il est actuellement capable d'assurer un élevage total de *P. antipodarum*, sans recours à une population de terrain. En revanche, l'élevage n'est pas encore en mesure de fournir des adultes tout au long de l'année. Il semble donc clair que des avancés dans ce domaine sont à espérer dans un avenir proche.

Pour ce qui est de la manipulation des organismes, comme cela a déjà été souligné, *P. antipodarum* est extrêmement robuste et donc la mortalité des témoins très faible. Mon retour d'expérience me laisse penser que la limnée est un peu plus fragile, supporte moins bien les changements de facteurs abiotiques, et que cela peut être problématique. L'utilisation de cet organisme sur le terrain paraît notamment assez difficile à envisager. Cette plus grande sensibilité aux variations de facteurs abiotiques peut engendrer des effets n'ayant rien à voir avec un stress chimique. De plus, cet organisme est pulmoné, et donc les systèmes d'encagement devraient obligatoirement permettre un accès à l'air de surface. C'est tout à fait réalisable, mais demande des adaptations techniques pas forcément évidentes.

LES GASTEROPODES : ORGANISMES MODELES POUR L'OCDE ?

Des avancées dans la réglementation des produits chimiques sont en cours dans le monde entier. Un objectif commun est la volonté de détecter, évaluer le danger et le risque environnemental des PE. Cependant, il y a très peu de tests standardisés d'écotoxicité aquatiques, qui soient sensibles à ce type de composés (OECD, 2009a; OECD, 2009b; OECD, 2009c). De plus, ces tests ne sont réalisés que sur des organismes vertébrés (poissons et batraciens). Des tests standardisés sont en cours de développement chez les invertébrés, mais uniquement chez les arthropodes. Dans la mesure où l'ensemble de l'écosystème doit être protégé, l'élargissement à d'autres phyla semble nécessaire. Les mollusques ont été proposés dans ce cadre pour les raisons évoquées en introduction : leur importance dans les écosystèmes et leur sensibilité avérée aux PE (OECD, 2010).

En milieu d'eau douce, deux espèces ont été proposées : *Lymnaea stagnalis* et *Potamopyrgus antipodarum*. J'ai déjà beaucoup développé dans ce manuscrit les avantages et inconvénients des gastéropodes et principalement de *P. antipodarum* en écotoxicologie d'eau douce. Cette dernière partie a donc pour objectif de mettre tout cela en perspective.

A / GASTEROPODES ET EXPOSITION

1. Durée et période d'exposition

Chez *P. antipodarum*, les expérimentations sont généralement réalisées chez des adultes, ce qui permet de mesurer la reproduction. Des conséquences sur cette dernière sont ensuite facilement extrapolables au niveau populationnel. Les protocoles proposés à l'OCDE se concentrent sur les adultes reproducteurs, avec comme marqueur principal le suivi de la reproduction. Pour les deux gastéropodes ce suivi est aisé, mais leur reproduction est saisonnière, même au laboratoire. Il faudra donc garder cette caractéristique en mémoire lors de l'analyse des données.

Le cycle de vie des gastéropodes proposés est relativement long. Il faut plusieurs mois à 21°C pour obtenir un cycle de vie complet (de la ponte par des adultes, jusqu'à à la ponte de la génération suivante). Cela nécessite un support expérimental lourd, aussi bien d'un point de vue matériel que personnel. Il est généralement admis que l'allongement de la durée d'exposition permet l'apparition d'effets à de moindres concentrations. Il est difficile de savoir si les expérimentations sur tout le cycle de vie des gastéropodes engendrent une sensibilité supérieure à celles effectuées uniquement sur une partie du cycle de vie. En effet, à

ma connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la différence de sensibilité à un toxique donné, entre les deux types d'expositions.
Des expositions sur tout le cycle de vie ont été réalisées chez la limnée (Czech et al., 2001; Leung et al., 2007), et n'ont pas montré une sensibilité plus importante que lors de tests moins longs aux polluants testés. Des expositions test sur des parties seulement du cycle de vie ont également été réalisées, montrant une sensibilité à des concentrations environnementalement réalistes (Ducrot et al., 2010).

Le choix entre exposition sur tout le cycle ou sur une partie seulement est difficile, et finalement commun à toutes les espèces ayant un cycle de développement long. Il est gênant de ne pas exposer toutes les phases d'un cycle de vie du fait de l'existence potentielle de périodes critiques (ce que nous avons mis en évidence chez *P. antipodarum*), ou d'effets trans-générationnels ou multi-générationnels. Néanmoins, les gastéropodes ne sont pas très adaptés à des études sur tout leur cycle de vie, du fait de sa durée. D'autres espèces (*D. magna* par exemple) présentent des cycles plus courts et permettent cela. C'est un inconvénient de taille, mais la sensibilité des gastéropodes et leur représentativité biologique sont des éléments à ne pas négliger.
D'autre part, des expositions de phases de cycle données (embryons, larve, juvéniles, adultes…), peuvent être réalisées, ce qui peut permettre de palier à la difficulté d'exposer sur tout le cycle de vie. Les études réalisées sur la fluoxétine (Publi 16) ou le mélange de PE (Publi 3) ont en effet montré que les effets sur la reproduction pouvaient apparaître lors d'exposition d'autres stades de vie que les adultes.
Ainsi, ce dernier type d'exposition serait à favoriser à mon sens.

2. Voies d'exposition

a. Eau

Les gastéropodes sont épi-benthiques. La voie d'exposition la plus fréquente se fait par l'eau. Comme les concentrations de toxiques sont plus facilement mesurables dans le milieu d'exposition, cela permet une évaluation de risque plus aisée. Du fait des durées d'exposition longues, des systèmes en renouvellement continu sont à favoriser. D'expérience, ces systèmes sont plus faciles à gérer dans le long terme, mais présentent des inconvénients logistiques importants (panne de pompes…). Ils nécessitent énormément de tubulures, sur lesquelles les toxiques s'adsorbent. Nos expérimentations montrent bien une différence notable entre les

concentrations nominales et mesurées pour les polluants organiques. Il faut normaliser l'eau, ce qui n'est pas forcément évident étant donnée la quantité d'eau nécessaire pour ce genre de tests, dans la durée. Cependant ces limites sont finalement communes à toutes les espèces utilisées en écotoxicologie aquatique.

Lors d'expositions via l'eau, le problème se pose des polluants non miscibles dans l'eau. L'étude sur les effets des solvants sur la reproduction de *P. antipodarum*, démontre bien que cela doit être évité au maximum. Par ailleurs, un gastéropode pulmoné comme la limnée, peut certainement limiter son contact avec les toxiques présents dans l'eau si ces derniers provoquent une gêne, en remontant fréquemment à la surface. Des dispositifs expérimentaux adaptés sont à prévoir.

b. Sédiment

Le mode de vie des gastéropodes autorise également des expositions sédimentaires. Ces derniers sont à la fois un réservoir d'accumulation des polluants via les matières particulaires, et une source de toxiques via la remise en suspension. Le risque engendré par les sédiments n'est donc pas directement dérivable des concentrations de polluants dans l'eau. Des tests normalisés existent pour les oligichètes, insectes, amphipodes et nématodes.

Des expositions via le sédiment ont été réalisées avec *P. antipodarum*. Il se pose les mêmes questions de standardisation du sédiment utilisé que pour l'eau. De plus, cette espèce n'est pas strictement inféodée au sédiment. Les gastéropodes peuvent donc s'affranchir du contact sédimentaire si celui-ci induit un « inconfort ». L'exposition est donc mal maitrisée. Les mêmes problèmes se posent aussi pour les polluants non miscibles dans l'eau, qui sont ceux qui risquent le plus de se retrouver dans les sédiments. Quoiqu'il en soit, il me semble que les gastéropodes sont plus indiqués pour des expositions par l'eau que par les sédiments.

c. Alimentation

Une autre solution pourrait être l'exposition par l'alimentation. J'avais réalisé des essais en contaminant directement la nourriture (Tetramin® pour *P. antipodarum*). Le problème est l'évaluation de l'exposition et le lien qui peut être fait avec les concentrations présentes dans l'environnement. C'est certainement une piste à évaluer plus en avant, mais non applicable en l'état.

3. Schéma expérimental

Du fait de la variabilité des réponses, un nombre suffisant de réplicats doit être prévu dans les expérimentations, avec un nombre suffisant d'individus par réplicats. La sensibilité d'un test est inversement corrélée à la variabilité de la réponse. Dans la mesure où les réponses des gastéropodes sont hautement variables, il faut donc limiter au maximum la variabilité générée par les dispositifs expérimentaux (vérifier notamment que la concentration de polluant est bien constante au cours de l'expérimentation, pas de différences de conditions d'expositions entre réplicats…). Les schémas expérimentaux doivent être aléatoires, assurer une indépendance entre réplicats, et reproductibles. Ici encore, ce sont des éléments communs à tous les tests écotoxicologiques et pas seulement aux gastéropodes.
Dans tous les cas, il faut réussir à trouver un équilibre entre les nécessités statistiques et la réalisation pratique. Les études menées sur *M. cornuarietis* ont montré qu'il était possible de définir un schéma expérimental type, permettant de connaître la robustesse des analyses statistiques ultérieures. A ma connaissance rien d'équivalent n'a été réalisé sur la limnée et *P. antipodarum*. Les expérimentations en cours dans différents laboratoires européens devraient permettre d'améliorer la caractérisation de la variabilité chez ces deux espèces.

Un des intérêts de *P. antipodarum* est la possibilité de mesure individuelle en ce qui concerne le nombre d'embryons dans la poche embryonnaire. Cela permet, malgré une variabilité de réponse forte, d'avoir des effets statistiques. Cela sous-entend tout de même qu'il n'y a pas de différences entre réplicats. Cela n'est pas toujours le cas, et doit être vérifié systématiquement. Néanmoins, cette espèce présente cet intérêt, associé à la possibilité de compter le nombre de juvéniles nés par réplicats (mesure par groupe d'individus et non pas par individu isolé).

Pour cette partie de définition du schéma expérimental optimal, il faut bien noter que les données disponibles ne sont pas suffisantes pour avoir des schémas très robustes. Au cours de ces dernières années, nous avons essayé de construire des plans d'expérimentations les plus fiables possibles, en allant jusque 12 réplicats témoins (de 10 à 20 individus) et 8 par concentrations. C'est possible chez *P. antipodarum* du fait de sa petite taille, mais peu envisageable sur la limnée. C'est réalisable dans un laboratoire de recherche, mais certainement moins en routine.

B / CHOIX DES ESPECES MODELES

1. Elevage

Le premier critère pour une espèce modèle sur laquelle un biotest pourrait être réalisable est la possibilité d'élevage. En effet, l'utilisation d'individus issus de population terrain introduit énormément de biais (variabilité génétique, contamination antérieure au test, infection parasitaire ou autre…).

Le retour d'expérience acquis au laboratoire est que l'élevage de la limnée est aisé et maitrisé. Il est possible d'avoir des organismes à l'année et en quantité importante (pour peu que l'anticipation soit suffisante !). La ponte est en effet inductible, donc des individus adultes sont faciles à obtenir après 3 mois. L'élevage de *P. antipodarum* est plus complexe, bien qu'en amélioration. La ponte n'est pas inductible (à ma connaissance), donc les expérimentations sont tributaires du nombre d'individus disponibles, ce qui peut parfois être gênant. En revanche, cette espèce est nettement plus robuste que la limnée, ce qui lui garantit une meilleure résistance aux accidents d'élevage… Sa petite taille permet également des densités supérieures et un nombre plus important d'individus sur une place équivalente. Cet avantage se retrouve également lors de la mise en place du plan d'expérimentation, puisqu'un nombre plus élevé d'individus est utilisé et donc la robustesse des résultats supérieure.

2. Facilité d'expérimentation

Pour ces deux espèces, des expérimentations sur l'ensemble du cycle de vie peuvent être réalisées. Dans les deux cas, la même limite est à noter : longueur du test. En revanche, les types de tests sur des phases de vie ne sont pas les mêmes. En effet, la limnée est ovipare, et donc l'exposition des phases embryonnaires, des juvéniles et des adultes est réalisable. Comme la ponte est inductible, des tests embryonnaires sont assez facilement envisageables (Bandow and Weltje, 2012). Si ces tests sont prédictifs des stades suivants, alors un gain de temps important pourrait être réalisé. La logistique de ce type d'exposition est beaucoup moins lourde et cela pourrait permettre un screening de contaminants. Néanmoins, ici encore, seule la sensibilité du stade exposé est évaluée.

Au contraire, *P. antipodarum* est ovovivipare, et donc le développement embryonnaire a lieu dans la poche embryonnaire. Des juvéniles sont directement pondus. L'exposition des phases embryonnaires, hors de l'organisme, semble donc complexe (il faudrait trouver un milieu

d'exposition dans lequel les embryons pourraient se développer normalement). Les juvéniles et adultes peuvent être exposés sans difficultés notables.

3. Endocrinologie

Une limite pour la réalisation d'un test d'évaluation des effets des PE sur des organismes dont l'endocrinologie est méconnue, est la compréhension des effets observés. Une perturbation de la reproduction n'est pas obligatoirement due à une modification de la signalisation hormonale. Ce manque de connaissance est un frein majeur. Des biomarqueurs (tissulaires, biochimiques, moléculaires et pourquoi pas protéomiques à l'avenir) sont développés, mais sans la connaissance de base, l'interprétation de leurs variations est difficile. Un gros effort se devrait d'être fait pour améliorer cette connaissance et donc les marqueurs disponibles.

C / CONCLUSIONS

Les gastéropodes aquatiques présentent de très nombreux avantages (Tableau 13) : (i) ils sont généralement très sensibles aux PE ; (ii) ils sont faciles de manipulation au laboratoire et globalement robustes ; (iii) sur les prosobranches au moins il y a possibilité d'encagement directement dans le milieu, ce qui permet une meilleure évaluation de la qualité des écosystèmes ; (iv) il existe également une grande diversité des marqueurs développables (tissulaires, biochimiques, moléculaires, cytométriques, protéomiques…) ; (v) ils présentent une grande variété de propriété biologiques et notamment de modes de reproduction, d'habitats ou d'alimentation ; et finalement (vi) ils sont pertinents d'un point de vue écologique.

Pour autant, trois limites majeures sont à noter chez les gastéropodes pour pouvoir développer des biotests robustes : (i) la variabilité de leur réponse, qui nécessite un contrôle strict des conditions expérimentales (température, luminosité, saison, densité de population, alimentation…), de l'origine des organismes (issus de souches de laboratoire connues et contrôlées) ; (ii) le manque de connaissance de leur endocrinologie, qui limite la compréhension des effets et les marqueurs disponibles ; et (iii) la longueur de leur cycle de vie, qui rend peu réalisable les expérimentation sur un cycle de vie complet.

Tableau 13: Résumé des avantages et inconvénients des Gastéropodes comme modèles en écotoxicologie d'eau douce

	Potamopyrgus antipodarum	***Lymnaea stagnalis***
Avantages	Manipulation facile	
	Robuste	
	Exposition directe dans le milieu possible (prosobranche)	
		Contrôle de la reproduction relativement bien décrit
	Pertinence écologique et variété de physiologie (mode de reproduction, alimentation…)	
	Petite taille (place pour les expérimentations)	Grande taille (facilité de développement de marqueurs)
	Mesure de la reproduction individuelle	
		Collecte d'hémolymphe aisée permettant la cytométrie de flux et la mesure de marqueurs immunitaires
	Exposition de tous les stades de vie (embryons, juvéniles et adultes)	
	Evaluation des compartiments eau et sédiment	Evaluation des compartiments eau
	Elevage relativement simple (en cours de validation)	Elevage très aisé
	Très sensible aux PE	
Inconvénients	Variabilité des réponses	
	Petite taille (développement de marqueurs plus complexe)	Grande taille (place pour les expérimentations)
	Cycle de vie de plusieurs mois	
	Très peu de connaissances sur l'endocrinologie	Connaissances sur l'endocrinologie partielle
	Niveau « physiologiques » des marqueurs (reproduction, biomarqueurs…) peu connus	
	Exposition des embryons seuls complexe	
		Encagement non développé et possiblement difficile (pulmoné)

Concernant *P. antipodarum*, une attention particulière doit être portée au niveau de reproduction des témoins (nombre d'embryons ou de juvéniles par adultes). Comme déjà soulevé dans le manuscrit, des inductions de reproduction sont souvent notées chez cette espèce. Afin de s'assurer de leur pertinence biologique, il est indispensable que ces inductions soient relatives à un niveau de reproduction de « bonne santé ». D'après notre retour d'expérience, un nombre d'embryons inférieur à 10 par individus chez les témoins, a de fortes chances d'être associé à un état de santé délétère de l'organisme. Ce nombre n'est basé que sur les expériences auxquelles j'ai participé. Il faudrait s'assurer qu'il est compatible avec ce qui est observé chez les autres laboratoires. Une carte de contrôle des élevages et des témoins semble nécessaire.

N'ayant jamais réalisé de test de reproduction chez la limnée, je ne possède pas le même recul. Il semble cependant que les conditions d'élevage soient mieux maitrisées et qu'il n'y ait pas de problèmes similaires avec les témoins. Cet élément serait tout de même à vérifier. Du fait de sa plus grande taille, les biomarqueurs sont plus facilement développable sur cette espèce. En contrepartie, la densité de la population doit rester très faible, aussi bien pour les expérimentations que pour les élevages. Cela nécessite donc une place supérieure à celle utilisée pour *P. antipodarum*. L'intérêt de cette espèce est sa petite taille, certes plus problématique en ce qui concerne le développement de biomarqueurs, mais qui permet un gain de place non négligeable. La mesure individuelle du nombre d'embryons dans la pche embryonnaire est aussi un élément permettant une grande puissance statistique (avec les limites précédemment citées).

Des tests inter-laboratoires sont actuellement en cours avec des substances modèles. Les résultats de ces tests devraient aider à répondre, au moins en partie, aux questions de variabilité de réponse. De nombreux facteurs confondants existent et ces études permettront également une meilleure maîtrise de ces derniers. Les conditions de test doivent être définies précisément, en accord avec la biologie de l'espèce, afin d'être à la fois reproductibles et pertinentes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

J’ai tenté d’être le plus critique (aussi bien positive que négative) possible dans ce manuscrit, quant à l’utilisation des gastéropodes en écotoxicologie aquatique. Lorsque l’on travaille sur un modèle pendant plusieurs années, on vient à l’apprécier, et à en connaître ses limites. Cependant, il est parfois difficile d’accepter de prendre du recul, dans la mesure où on investit tant dessus !

La démarche intégrée est applicable à absolument toutes les espèces. J’ai travaillé, par hasard, sur les gastéropodes, qui sont devenus des compagnons accaparants pour quelques années. Mais finalement, qu’importe le modèle !

Les gastéropodes en écotoxicologie aquatiques sont d’excellents modèles. Ils ont énormément d’avantages, que j’ai soulevé tout au long de ce travail (sensibilité, facilité de manipulation, possibilité d’encagement, diversité des marqueurs développables, modes de reproduction variés…), mais également des défauts majeurs (manque de connaissance de la biologie, variabilité de la réponse, taille et cycle de vie…).
Nul modèle n’est parfait, et tout dépend de la question posée… Dans la mesure où aucun biotest standardisé n’existe chez ces espèces en écotoxicologie, et étant donnée leur importance écologique, il est évident qu’il faut favoriser leur utilisation. Cependant, les manques de connaissance très sérieux sur leur physiologie limitent leur utilisation, aussi bien en ce qui concerne l’élevage et les expositions, que la compréhension des effets. Des avancés importantes ont été réalisée ces dernières années par différentes équipes. Les résultats encourageants doivent pousser à continuer dans ce sens. Donc une conclusion simpliste à la question de Jeanne serait : Oui, il faut continuer avec les gastéropodes. Il faut mettre les moyens financiers et humains nécessaires à une meilleure compréhension de leur biologie. Il faut pousser leur utilisation terrain. Et finalement, il ne faut pas se limiter à un modèle (gastéropode ou autre), mais favoriser la diversité des phyla, de manière à intégrer au mieux la diversité des espèces dans « la vraie vie ».

Les pistes de travail à favoriser pour poursuivre et améliorer l’utilisation des gastéropodes d’eau douce en écotoxicologie seraient les suivantes :

1. Caractérisation fine du contrôle endocrinien de la reproduction chez les gastéropodes

Les schémas de contrôle de la reproduction actuellement proposés sont basés sur nos connaissances chez d'autres espèces (vertébrés et arthropodes principalement). Cependant, ils pâtissent du peu de données disponibles. Il faudrait utiliser des approches moléculaires ou protéomiques sans à priori de manière à présenter un schéma théorique.

Cela permettrait de répondre aux questions soulevées concernant l'importance des stéroïdes sexuels de type vertébrés, le rôle des ecdystéroïdes (ou absence de rôle), l'articulation avec les neuropeptides…

L'objectif serait ensuite de pouvoir proposer des marqueurs d'intérêt pour évaluer et comprendre les effets reprotoxiques. Les différences suivant les modes de reproduction pourraient également être mises en évidence. Les gastéropodes ont alors un intérêt tout particulier du fait des divers modes de reproduction.

2. Approfondir les connaissances et l'utilisation de la réponses immunitaire

Il faudra caractériser la réponse immune chez *L. stagnalis* sur plusieurs plans. Une publication récente fait état de la description génomique complète de la réponse immunitaire chez *Mytilus edulis* (Philipp et al., 2012), mais rien n'est disponible chez les gastéropodes. Même si le principe de la réponse innée est identique chez toutes les espèces, vertébrées, comme invertébrées, des variations existent entre les espèces, et il est nécessaire d'avoir la description la plus complète possible, afin de mieux comprendre les réponses d'un organisme donné. Des ressources génomiques commencent à être accessibles chez *Lymnaea stagnalis*, avec le séquençage et l'annotation de son génome en cours (http://genotoul-contigbrowser.toulouse.inra.fr:9095/Lymnaea_stagnalis/index.htm) réalisé par l'INRA (Bouétard et al., 2012). Ainsi, il serait possible de faire un travail équivalent à ce qui a été fait chez d'autres espèces, et de décrire les composantes de la réponse immunitaire de manière complète. Cela permettra d'une part, de comparer la diversité des éléments de l'immunocompétence chez des espèces proches, et d'autre part, de définir des marqueurs adaptés et pertinents (chercher les récepteurs ou les cytokines ou molécules de défense potentiellement plus « spécifiques » des toxiques ou d'un stress particulier). Cette caractérisation se fera par une approche génomique, en utilisant des techniques innovantes

(RNA-Seq pour faire une étude qualitative et quantitative des différents transcrits d'un échantillon).
Suite à cette caractérisation il conviendra de développer des mesures d'expression de gènes pertinents de la réponse immune en RT-qPCR. Ils seront sélectionnés soit pour leur précocité de réaction, leur sensibilité ou leur spécificité. Les premiers résultats obtenus sur cette espèce (Publis 7) suggèrent en effet, que l'expression du TLR4, par exemple, pourrait être spécifique d'un type de contaminant donné.
En parallèle de cette approche génomique, une approche cellulaire devrait être développée. En effet, des marqueurs en cytométrie en flux (comptage, viabilité, ROS, thiols, phagocytose) ont d'ores et déjà été développés chez cette espèce. D'autres marqueurs seraient à développer (présence de lysosomes, apoptose, marqueurs de cycle cellulaire, cellules natural killer…), et leur pertinence à évaluer.

L'intérêt du modèle limnée réside dans la possibilité de collecter l'hémolymphe de manière non invasive (aucun traumatisme n'est infligé à l'organisme) à plusieurs reprises en cours d'expérimentation (et donc de suivre l'évolution d'un même organisme). Les marqueurs moléculaires et cytométriques pourraient donc être réalisés sur le même individu à différentes échéances de temps au cours des expérimentations.

Suite à la caractérisation de la réponse immune chez la limnée, des expositions à des contaminants « types » seront à réaliser. Plusieurs candidats pourraient être envisagés : le cadmium qui est un immunomodulateur reconnu chez les gastéropodes (Latire et al., 2012), des médicaments (notamment des anti-cancéreux), des PE potentiels (reconnus également pour leur impact sur la réponse immunitaire chez les bivalves) (Canesi et al., 2007; Gauthier-Clerc et al., 2006), Les types/profils de réponse obtenus seront comparés, afin de déterminer si les différents éléments du système immunitaire sont affectés de manière différentielle suivant les contaminants en cause.
En parallèle, les réponses individuelles (croissance, reproduction) seront à évaluer, afin de déterminer l'interrelation entre les différentes fonctions physiologiques, et l'éventuel « coût » de la réponse immune sur d'autres processus.

Les expositions de laboratoire présentent l'intérêt, et la limite, de n'introduire qu'un nombre limité de stresseurs (contaminant), en conditions contrôlées. La réponse immunitaire est cependant dépendante de nombreux facteurs, et son suivi semble particulièrement indiqué en

situation de stress multiples, c'est-à-dire lors d'expositions sur le terrain. Une autre étape consiste donc à valider les marqueurs lors d'expositions *in situ* à des typologies de contamination variées (urbaine, agricole, hospitalière, métallique…).
Il conviendra, notamment, de tester un effluent de STEP pour valider l'exposition à une multicontamination associée à une contamination bactérienne. Enfin, il sera intéressant d'évaluer l'influence de l'état de santé des organismes sur leur réponse au stress, et donc d'évaluer leur variation de sensibilité lorsqu'ils sont confrontés à une infection.

Dans tous les cas, il est clair que pour avoir une démarche la plus intégrée possible concernant l'utilisation des marqueurs immunologiques en écotoxicologie, beaucoup reste à faire. D'un point de vue pratique (et à court ou moyen terme), deux choix sont possibles :

- soit la réponse est caractérisée dans son ensemble de manière à comprendre le fonctionnement global ;
- soit les marqueurs déjà disponibles sont validés (facteurs confondants, sensibilité, spécificité…) et appliqués.

Les objectifs et les moyens mis en œuvre ne sont pas les mêmes. La caractérisation moléculaire nécessite des moyens techniques élaborés. Cette approche est plus mécanistique, et pourrait permettre de développer des marqueurs novateurs.
L'approche de validation des marqueurs déjà disponibles permettrait de tester leur robustesse et leur applicabilité. Pour autant, elle est limitée concernant la compréhension du fonctionnement de la réponse immunitaire.

3. Développer des méthodes d'exposition adaptées pour toutes les espèces

Il faut préciser qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode d'exposition terrain chez la limnée. C'est un organisme aquatique, mais avec un mode respiratoire pulmoné. Cela nécessite donc un accès à l'air atmosphérique, et donc le développement de systèmes d'encagement adaptés.

Outre les expositions terrain, des progrès seraient également à réaliser au laboratoire pour permettre l'exposition des différentes phases de développement et également les expositions sur plusieurs générations.

4. Variabilité des réponses

Un des gros inconvénients des gastéropodes est la grande variabilité des réponses. Un travail conséquent sera donc nécessaire pour caractériser cette variabilité et définir des réponses « types ».

Actuellement il est difficile de comparer les réponses obtenues entre différentes expositions, car nous ne sommes pas capables de les replacer dans une gamme connue. Cet exercice sera à réaliser afin d'augmenter la pertinence des modèles et des réponses utilisées.

5. Mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et de métabolisation des polluants organiques

Les études présentées dans ce manuscrit sont novatrices en ce qui concerne l'accumulation des composés organiques. Elles sont à poursuivre, pour comprendre l'origine de la bioaccumulation de l'oxazepam ou des alkylphénols. Les différences de sensibilité observées entre les organismes lors des expérimentations, peuvent s'expliquer par des différences dans les expositions. Ces phénomènes sont à approfondir et à comprendre plus en avant.

6. Développer une démarche calquée sur l'AOP (Adverse Outcome Pathways)

L'objectif final du développement de tous ces marqueurs et de leur compréhension est d'essayer de mettre en relation les différentes composantes de la réponse. C'est une démarche basée sur l'Adverse Outcome Pathways (AOP). C'est une construction analytique qui décrit une chaine d'événements de causalité séquentielle, à différents niveaux d'organisation biologique, qui mène à un effet écotoxicologique délétère (Figure 32).

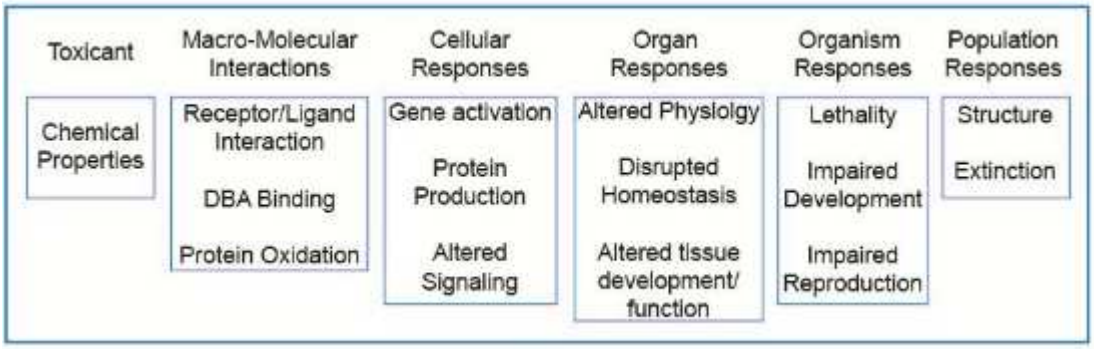


Figure 32: Schéma théorique des AOP (issu http://www.oecd.org/env/ehs/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm)

REFERENCES

Aarab N, Lemaire-Gony S, Unruh E, Hansen PD, Larsen BK, Andersen OK, et al. Preliminary study of responses in mussel (Mytilus edilus) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. Aquatic Toxicology 2006; 78: S86-S92.

Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabitto IdS, Ribeiro CADO. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (Mytilus edulis) exposed to treated and untreated municipal wastewater. Aquatic Toxicology 2007; 82: 1-14.

Alonso A, Camargo JA. Long-Term Effects of Ammonia on the Behavioral Activity of the Aquatic Snail Potamopyrgus antipodarum (Hydrobiidae, Mollusca). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2009; 56: 796-802.

Aufderheide J, Warbritton R, Pounds N, File-Emperador S, Staples C, Caspers N, et al. Effects of husbandry parameters on the life-history traits of the apple snail, Marisa cornuarietis: effects of temperature, photoperiod, and population density. Invertebrate Biology 2006; 125: 9-20.

Bandow C, Weltje L. Development of an embryo toxicity test with the pond snail Lymnaea stagnalis using the model substance tributyltin and common solvents. Science of the Total Environment 2012; 435: 90-95.

Besse JP, Kausch-Barreto C, Garric J. Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: application to the French situation and preliminary prioritization. Human and Ecological Risk Assessment 2008; 14: 665-695.

Blaber SJM. The occurence of penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). Proc. malac. Soc. Lond. 1970; 39: 132-233.

Bouchard B, Gagne F, Fortier M, Fournier M. 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 2009; 150: 132-140.

Bouétard A, Noirot C, Besnard AL, Choisne D, Robe E, Klopp C, et al. Pyrosequencing-based transcriptomic resources in the pond snail Lymnaea stagnalis, with a focus on

genes involved in molecular response to diquat-induced stress. Ecotoxicology 2012; 21: 2222-2234.

Bringolf RB, Heltsley RM, Newton TJ, Eads CB, Fraley SJ, Shea D, et al. Environmental occurence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. Environmental Toxicology and Chemistry 2010; 29: 1311-1318.

Brion F, Tyler CR, Palazzi X, Laillet B, Porcher JM, Garric J, et al. 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 2004; 68: 193-217.

Brown L. The use of Hydrobia jenkinsi to detect intermittent toxic discharges to a river. Water Research 1980; 14: 941-947.

Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR. The decline of the gastropod Nucella lapillus around south-west England: evidence for the effect of tributylin from antifouling paints. Journal - Marine Biological Association 1986; 66: 611-640.

Calisto V, Domingues MRM, Esteves VI. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments - Kinetics and photodegradation products. Water Research 2011; 45: 6097-6106.

Canesi L, Borghi C, Fabbri R, Ciacci C, Lorusso LC, Gallo G, et al. Effects of 17[beta]-estradiol on mussel digestive gland. General and Comparative Endocrinology 2007; 153: 40-46.

Canesi L, Ciacci C, Betti M, Lorusso LC, Marchi B, Burattini S, et al. Rapid effects of 17 beta-estradiol on cell signaling and function of Mytilus hemocytes. General and Comparative Endocrinology 2004a; 136: 58-71.

Canesi L, Lorusso LC, Ciacci C, Betti M, Zampini M, Gallo G. Environmental estrogens can affect the function of mussel hemocytes through rapid modulation of kinase pathways. General and Comparative Endocrinology 2004b; 138: 58-69.

Constantine LA, Huggett DB. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, Daphnia magna and Ceriodaphnia dubia. Chemosphere 2010; 80: 1069-1074.

Czech P, Weber K, Dietrich DR. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail Lymnaea stagnalis L. Aquatic Toxicology 2001; 53: 103-114.

Dabrin A, Durand CL, Garric J, Geffard O, Ferrari BJD, Coquery M. Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. Science of the Total Environment 2012; 424: 308-315.

Daka ER, Hawkins SJ. Interactive effects of copper, cadmium and lead on zinc accumulation in the gastropod mollusc Littorina saxatilis. Water Air and Soil Pollution 2006; 171: 19-28.

Das DK, Maulik N, Moraru, II. Gene expression in acute myocardial stress-induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 1995; 27: 181-193.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Kim Y, Oh C, Kang DH, Whang I, et al. Allograft inflammatory factor-1 in disk abalone (Haliotis discus discus): Molecular cloning, transcriptional regulation against immune challenge and tissue injury. Fish & Shellfish Immunology 2010a; 29: 319-326.

De Zoysa M, Nikapitiya C, Oh C, Whang I, Lee JS, Jung SJ, et al. Molecular evidence for the existence of lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF) and Rel/NF-kB pathways in disk abalone (Haliotis discus discus). Fish & Shellfish Immunology 2010b; 28: 754-763.

De Zoysa M, Pushpamali WA, Oh C, Whang I, Kim SJ, Lee J. Transcriptional up-regulation of disk abalone selenium dependent glutathione peroxidase by H2O2 oxidative stress and Vibrio alginolyticus bacterial infection. Fish & Shellfish Immunology 2008; 25: 446-457.

De Zoysa M, Whang I, Lee Y, Lee S, Lee JS, Lee J. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (Haliotis discus discus) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology 2009; 154: 387-395.

De Zoysa M, Whang I, Lee Y, Lee S, Lee JS, Lee J. Defensin from disk abalone Haliotis discus discus: Molecular cloning, sequence characterization and immune response against bacterial infection. Fish & Shellfish Immunology 2010c; 28: 261-266.

Demas GE, Zysling DA, Beechler BR, Muehlenbein MP, French SS. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. Journal of Animal Ecology 2011; 80: 710-730.

Dimitriadis VK, Hondros D. Effect of Starvation and Hibernation on the Fine-Structural Morphology of Digestive Gland-Cells of the Snail Helix-Lucorum. Malacologia 1992; 34: 63-73.

Donaghy L, Kim BK, Hong HK, Park HS, Choi KS. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, Crassostrea ariakensis. Fish & Shellfish Immunology 2009; 27: 296-301.

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

Ducrot V, Teixeira-Alves M, Lopes C, Delignette-Muller ML, Charles S, Lagadic L. Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod Lymnaea stagnalis: a case-study with vinclozolin. Ecotoxicology 2010; 19: 1312-1321.

Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik C, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J. 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 2007; 16: 169-182.

Duft M, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J. Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail Potamopyrgus antipodarum in a new sediment biotest. Environmental Toxicology and Chemistry 2003a; 22: 145-152.

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

Farcy E, Gagne F, Martel L, Fortier M, Trepanier S, Brousseau P, et al. Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel Elliptio complanata exposed to municipal effluents. Environmental Research 2011; 111: 1096-1106.

Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. Journal of Environmental Management 2012; 104: 19-34.

Forbes VE, Aufderheide J, Warbritton R, van der Hoevene N, Caspers N. Does bisphenol A induce superfeminization in Marisa cornuarietis? Part II: Toxicity test results and requirements for statistical power analyses. Ecotoxicology and Environmental Safety 2007a; 66: 319-325.

Forbes VE, Moller V, Depledge MH. Intrapopulation Variability in Sublethal Response to Heavy-Metal Stress in Sexual and Asexual Gastropod Populations. Functional Ecology 1995; 9: 477-484.

Forbes VE, Selck H, Palmqvist A, Aufderheide J, Warbritton R, Pounds N, et al. Does bisphenol a induce superfeminization in Marisa cornuarietis? Part I: Intra- and inter-laboratory variability in test endpoints. Ecotoxicology and Environmental Safety 2007b; 66: 309-318.

Forbes VE, Warbritton R, Aufderheide J, Van Der Hoeven N, Caspers N. Effects of Bisphenol A on fecundity, egg hatchability, and juvenile growth of *Marisa cornuarietis*. Environmental Toxicology and Chemistry 2008; 27: 2332-2340.

Gagnaire B, Gagné F, André C, Blaise C, Abbaci K, Budzinski H, et al. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. Aquatic Toxicology 2009a; 92: 155-167.

Gagnaire B, Geffard O, Noury P, Garric J. *In vivo* indirect measurement of cytochrome P450-associated activities in freshwater gastropod molluscs. Environmental Toxicology 2009b; DOI 10.1002/tox.

Gagnaire B, Geffard O, Xuereb B, Margoum C, Garric J. Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, Potamopyrgus antipodarum (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and Valvata piscinalis (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774). Chemosphere 2008; 71: 553-560.

Gagne F, Andre C, Cejka P, Hausler R, Fournier M. Evidence of neuroendocrine disruption in freshwater mussels exposed to municipal wastewaters. Science of the Total Environment 2011; 409: 3711-3718.

Gagné F, Andre C, Cejka P, Hausler R, Fournier M. Immunotoxicity of municipal effluents to freshwater mussels. Journal of Environmental and Analytical Toxicology 2011; 1: doi:10.4172/2161-0525.1000104.

Gagne F, Andre C, Cejka P, Hausler R, Fournier M, Blaise C. Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: A pilot plant study. Ecotoxicology and Environmental Safety 2008; 69: 366-373.

Gagné F, Andre C, Fortier M, Fournier M. Immunotoxic potential of aeration lagoon effluents for the treatment of domestic wastewaters in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Journal of environmental Science 2012; 24: DOI: 10.1016/S1001-0724(11)60862-0.

Galloway TS, Depledge MH. Immunotoxicity in invertebrates: Measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology 2001; 10: 5-23.

Gatidou G, Vassalou E, Thomaidis NS. Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis. Marine Pollution Bulletin 2010; 60: 2111-2116.

Gauthier-Clerc S, Boily I, Fournier M, Lemarchand K. In vivo exposure of Mytilus edulis to living enteric bacteria: a threat for immune competency? Environmental Science and Pollution Research 2013; 20: 612-620.

Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Fournier M, Amiard JC. Immunological and biochemical responses in Mya arenaria (Mollusca Bivalvia) exposed in vivo to estradiol-17[beta]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 2006; 144: 228-234.

Gerard C, Poullain V. Variation in the response of the invasive species Potamopyrgus antipodarum (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. Environmental Pollution 2005; 138: 28-33.

Gerard C, Poullain V, Lance E, Acou A, Brient L, Carpentier A. Influence of toxic cyanobacteria on community structure and microcystin accumulation of freshwater molluscs. Environmental Pollution 2009; 157: 609-617.

Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL. Tbt-Induced Imposex in the Dogwhelk, Nucella-Lapillus - Geographical Uniformity of the Response and Effects. Marine Environmental Research 1991; 32: 79-87.

Goldberg JI, Kater SB. Expression and Function of the Neurotransmitter Serotonin During Development of the Helisoma Nervous-System. Developmental Biology 1989; 131: 483-495.

Golding LA, Timperley MH, Evans CW. Non-lethal responses of the freshwater snail Potamopyrgus antipodarum to dissolved arsenic. Environmental Monitoring and Assessment 1997; 47: 239-254.

Gourdon I, Guerin MC, Torreilles J, Roch P. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel Mytilus galloprovincialis. Nitric Oxide-Biology and Chemistry 2001; 5: 1-6.

Gust M, Buronfosse T, Geffard O, Mons R, Queau H, Mouthon J, et al. 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 2010a; 44: 4517-28.

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

Gust M, Buronfosse T, Mons R, Andre C, Gagne F, Garric J. Is exposure temperature a confounding factor for assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*? Aquatic Toxicology 2011a; 101: 396-404.

Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagné F. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail Lymnaea stagnalis. Aquatic Toxicology 2013; 126: 393-403.

Gust M, Garric J, Giamberini L, Mons R, Abbaci K, Garnier F, et al. Sensitivity of gastropod Potamopyrgus antipodarum to a specific aromatase inhibitor. Chemosphere 2010b; 79: 47-53.

Gust M, Mouthon J, Quéau H, Buronfosse T, Garric J. Natural variability and interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroids levels and energetic status in a natural population of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). General and Comparative Endocrinology 2011b; 172: 243-250.

Hagger JA, Fisher AS, Hill SJ, Depledge MH, Jha AN. Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-n-butyltin on the marine worm, Platynereis dumerilii (Polychaeta : Nereidae). Aquatic Toxicology 2002; 57: 243-255.

Harris CA, Santos EM, Janbakhsh A, Pottinger TG, Tyler CR, Sumpter JP. Nonylphenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of female rainbow trout. Environmental Science & Technology 2001; 35: 2909-2916.

Hayashi O, Kameshiro M, Masuda M, Satoh K. Bioaccumulation and Metabolism of C-14 Bisphenol A in the Brackish Water Bivalve Corbicula japonica. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 2008; 72: 3219-3224.

Heinonen J, Honkanen J, Kukkonen JVK, Holopainen IJ. Bisphenol A accumulation in the freshwater clam Pisidium amnicum at low temperatures. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2002; 43: 50-55.

Hoek RM, Smit AB, Frings H, Vink JM, deJongBrink M, Geraerts WPM. A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from Lymnaea stagnalis, is down-regulated during parasitosis. European Journal of Immunology 1996; 26: 939-944.

Hooper C, Day R, Slocombe R, Handlinger J, Benkendorff K. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. Fish & Shellfish Immunology 2007; 22: 363-379.

Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shridhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, et al. Evidence that tricyclic small molecules may possess Toll-Like Receptor and myeloid-differenciation-protein-2 activity. Neuroscience 2010a; 168: 551-563.

Hutchinson MR, Zhang Y, Shridhar M, Evans JH, Buchanan MM, Zhao TX, et al. Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. Brain Behavior and Immunity 2010b; 24: 83-95.

Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Aquatic Toxicology 2006; 76: 69-92.

Ingersol CG, Hutchinson T, Crane M, Dodson S, DeWitt T, Gies A, et al. Laboratory toxicity tests foe evaluating potential effects of endocrine-disrupting compounds. In: al. DFe, editor. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment. SETAC editions, Pensacola, The Netherlands, 1999, pp. 107-198.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nature Immunol. 2004; 5: 987-995.

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

Jemec A, Drobne D, Tisler T, Sepcic K. Biochemical biomarkers in environmental studies-lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. Environmental Science and Pollution Research 2010; 17: 571-581.

Jensen A, Forbes VE. Interclonal variation in the acute and delayed toxicity of cadmium to the European prosobranch gastropod Potamopyrgus antipodarum (Gray). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2001; 40: 230-235.

Jensen A, Forbes VE, Parker ED. 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 2001; 20: 2503-2513.

Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, et al. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. Aquatic Toxicology 2003; 65: 205-220.

Kaiser D, Sieratowicz A, Zielke H, Oetken M, Hollert H, Oehlmann J. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. Environmental Pollution 2012; 163: 84-90.

Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. International Immunology 2009; 21: 317-337.

Keay J, Bridgham JT, Thornton JW. The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: Evolutionary and functional implications. Endocrinology 2006; 147: 3861-3869.

Ketata I, Denier X, Hamza-Chaffai A, Minier C. Endocrine-related reproductive effects in molluscs. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 2008; 147: 261-270.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 2002; 36: 1202-1211.

Lacaze E, Devaux A, Mons R, Bony S, Garric J, Geffard A, et al. DNA damage in caged Gammarus fossarum amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environmental Pollution 2011; 159: 1682-1691.

Lacchini AH, Davies AJ, Mackintosh D, Walker AJ. beta-1,3-glucan modulates PKC signalling in Lymnaea stagnalis defence cells: a role for PKC in H2O2 production and downstream ERK activation. Journal of Experimental Biology 2006; 209: 4829-4840.

Lagadic L, Coutellec MA, Caquet T. Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. Ecotoxicology 2007; 16: 45-59.

Laguerre M, Veenstra JA. Ecdysone receptor homologs from mollusks, leeches and a polychaete worm. Febs Letters 2010; 584: 4458-4462.

Landrum PF. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environmental Science & Technology 1989; 23: 588-595.

Latire T, Le Pabic C, Mottin E, Mottier A, Costil K, Koueta N, et al. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod Haliotis tuberculata under 10-day exposure to cadmium chloride. Aquatic Toxicology 2012; 109: 213-221.

Leung KMY, Grist EPM, Morley NJ, Morritt D, Crane M. Chronic toxicity of tributyltin to development and reproduction of the European freshwater snail Lymnaea stagnalis (L.). Chemosphere 2007; 66: 1358-1366.

Liu JL, Wang RM, Huang B, Lin C, Wang Y, Pan XJ. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. Environmental Pollution 2011; 159: 2815-2822.

Loi EIH, Yeung LWY, Taniyasu S, Lam PKS, Kannan K, Yamashita N. Trophic Magnification of Poly- and Perfluorinated Compounds in a Subtropical Food Web. Environmental Science & Technology 2011; 45: 5506-5513.

Lozano N, Rice CP, Pagano J, Zintek L, Barber LB, Murphy EW, et al. Concentration of organic contaminants in fish and their biological effects in a wastewater-dominated urban stream. Science of the Total Environment 2012; 420: 191-201.

Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microscopy Research and Technique 2002; 56: 358-392.

Matozzo V, Gagne F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. Environment International 2008; 34: 531-545.

Matthiessen P. An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines. Integrated Environmental Assessment and Management 2008; 4: 1551-3777.

Matthiessen P, Gibbs PE. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Environmental Toxicology and Chemistry 1998; 17: 37-43.

Matthiessen P, Reynoldson T, Billinghurst Z, Brassard DW, Cameron P, Chandler GT, et al. Field assessment for endocrine disruption in invertebrates. In: Fur PLd, editor. Endocrine disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment. SETAC Presse, Pensacola, The Netherlands, 1999, pp. 199-270.

Matthiessen P, Waldock R, Thain JE, Waite ME, Scropehowe S. Changes in Periwinkle (Littorina-Littorea) Populations Following the Ban on Tbt-Based Antifoulings on Small Boats in the United-Kingdom. Ecotoxicology and Environmental Safety 1995; 30: 180-194.

Mazurova E, Hilscherova K, Jalova V, Kohler HR, Triebskorn R, Giesy JP, et al. Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail Potamopyrgus antipodarum in vivo and in the cell bioassays in vitro. Aquat Toxicol 2008; 89: 172-9.

Michel P, Averty B. Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 update. Marine Pollution Bulletin 1999; 38: 268-275.

Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The prohibitins: emerging roles in diverse functions. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2006; 10: 353-363.

Moller V, Forbes VE, Depledge MH. Influence of Acclimation and Exposure Temperature on the Acute Toxicity of Cadmium to the Fresh-Water Snail Potamopyrgus-Antipodarum (Hydrobiidae). Environmental Toxicology and Chemistry 1994; 13: 1519-1524.

Moller V, Forbes VE, Depledge MH. Population responses to acute and chronic cadmium exposure in sexual and asexual estuarine gastropods. Ecotoxicology 1996; 5: 313-326.

Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (Oryzias latipes): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. Chemosphere 2008; 70: 865-873.

Nentwig G. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2007; 52: 163-170.

OECD. OECD Guidelines for testing Chemicals. Amphibian Metamorphosis Assay. TG 231. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2009a.

OECD. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. 21 days fish endocrne screening assay. TG 230. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2009b.

OECD. OECD Guidelines for testing of Chemicals. Fish short term reproduction assay. TG 229. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2009c.

OECD. 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, 2010, pp. 182.

Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. Ecotoxicology 2007; 16: 29-43.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. Endocrine disruption in invertebrates. Pure and Applied Chemistry 2003; 75: 2207-2218.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Oetken M, Bachmann J, Lutz I, Kloas W, et al. Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gasteropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. Environmental Health Perspectives 2006; 114: 127-133.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. Ecotoxicology 2000; 9: 383-397.

Oehlmann J, Stroben E, SchulteOehlmann U, Bauer B, Fioroni P, Markert B. Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 1996; 354: 540-545.

Oetken M, Nentwig G, Loffler D, Ternes T, Oehlmann J. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2005; 49: 353-361.

Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2006; 50: 361-369.

Pang CF, Selck H, Banta GT, Misra SK, Berhanu D, Dybowska A, et al. Bioaccumulation, toxicokinetics, and effects of copper from sediment spiked with aqueous Cu, nano-CuO, or micro-CuO in the deposit-feeding snail, Potamopyrgus antipodarum. Environmental Toxicology and Chemistry 2013; 32: 1561-1573.

Pang CF, Selck H, Misra SK, Berhanu D, Dybowska A, Valsami-Jones E, et al. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, Potamopyrgus antipodarum: A comparison of Cu added in aqueous form or as nano- and micro-CuO particles. Aquatic Toxicology 2012; 106: 114-122.

Paterson G, Metcalfe CD. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (Oryzias latipes). Chemosphere 2008; 74: 125-130.

Pedersen S, Selck H, Salvito D, Forbes V. Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in Potamopyrgus antipodarum. Ecotoxicology and Environmental Safety 2009; 72: 1190-1199.

Pery ARR, Gust M, Vollat B, Mons R, Ramil M, Fink G, et al. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. Chemosphere 2008; 73: 300-304.

Philipp EER, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, Findeisen U, et al. Massively Parallel RNA Sequencing Identifies a Complex Immune Gene Repertoire in the lophotrochozoan Mytilus edulis. Plos One 2012; 7.

Planello R, Martinez-Guitarte JL, Morcillo G. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of Chironomus riparius. Chemosphere 2008; 71: 1870-1876.

Plows LD, Cook RT, Davies AJ, Walker AJ. Phagocytosis by Lymnaea stagnalis haemocytes: A potential role for phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase A. Journal of Invertebrate Pathology 2006; 91: 74-77.

Porcel D, Bueno JD, Almendros A. Alterations in the digestive gland and shell of the snail Helix aspersa Müller (gastropoda, pulmonata) after prolonged starvation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 1996; 115: 11-17.

Qing L, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 101: 17126-17131.

Roepke TA, Snyder MJ, Cherr GN. Estradiol and endocrine disrupting compounds adversely affect development of sea urchin embryos at environmentally relevant concentrations. Aquatic Toxicology 2005; 71: 155-173.

Russo J, Lagadic L. Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail Lymnaea palustris (Gastropoda, Pulmonata). Cell Biology and Toxicology 2000; 16: 15-30.

Russo J, Lagadic L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail Lymnaea stagnalis (Gastropoda, Pulmonata). Environmental Pollution 2004; 127: 303-311.

Russo J, Lefeuvre-Orfila L, Lagadic L. Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail Lymnaea stagnalis (Gastropoda, Pulmonata). Environmental Pollution 2007; 146: 420-427.

Russo J, Madec L. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, Lymnaea stagnalis, to a toxicant. Cell and Tissue Research 2007; 328: 431-441.

Russo J, Madec L, Brehelin M. Effect of a toxicant on phagocytosis pathways in the freshwater snail Lymnaea stagnalis. Cell and Tissue Research 2008; 333: 147-158.

Saco-Alvarez L, Duran I, Lorenzo JI, Beiras R. Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. Ecotoxicology and Environmental Safety 2010; 73: 491-499.

Schmitt C, Balaam J, Leonards P, Brix R, Streck G, Tuikka A, et al. Characterizing field sediments from three European river basins with special emphasis on endocrine effects - A recommendation for Potamopyrgus antipodarum as test organism. Chemosphere 2010; 80: 13-19.

Schmitt C, Oetken M, Dittberner O, Wagner M, Oehlmann J. Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates Potamopyrgus antipodarum and Lumbriculus variegatus. Environmental Pollution 2008; 152: 322-329.

Schmitt C, Streck G, Lamoree M, Leonards P, Brack W, de Deckere E. Effect directed analysis of riverine sediments--The usefulness of Potamopyrgus antipodarum for in vivo effect confirmation of endocrine disruption. Aquatic Toxicology 2011a; 101: 237-243.

Schmitt C, Vogt C, Machala M, de Deckere E. Sediment contact test with Potamopyrgus antipodarum in effect-directed analyses-challenges and opportunities. Environmental Science and Pollution Research 2011b; 18: 1398-1404.

Schulte-Oehlmann U, Bettin C, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E. Marisa Cornuarietis (Gastropoda, Prosobranchia) - a Potential Tbt Bioindicator for Fresh-Water Environments. Ecotoxicology 1995; 4: 372-384.

Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J, Watermann B, Scherf S. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. Ecotoxicology 2000; 9: 399-412.

Scott AP. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I: Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. Steroids 2012; 77: 1450-1468.

Scott AP. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical review of the evidence that steroids have biological effects. Steroids 2013; 78: 268-281.

Segner H, Caroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, et al. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. Ecotoxicology and Environmental Safety 2003; 54: 302-314.

Sieratowicz A, Stange D, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J. Reproductive toxicity of bisphenol A and cadmium in Potamopyrgus antipodarum and modulation of bisphenol A effects by different test temperature. Environmental Pollution 2011; 159: 2766-2774.

Sminia T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate Lymnaea stagnalis studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948) 1972; 130: 497-526.

Smith BS. Sexuality in the american mud snail, *Nassarius obsoletus* say. Proc. malac. Soc. Lond. 1971; 39: 377-378.

Soares J, Coimbra AM, Reis-Henriques MA, Monteiro NM, Vieira MN, Oliveira JMA, et al. Disruption of zebrafish (Danio rerio) embryonic development after full life-cycle

parental exposure to low levels of ethinylestradiol. Aquatic Toxicology 2009; 95: 330-338.

Stalter D, Magdeburg A, Oehlmann J. Comparative toxicity assessment of ozone and activated carbon treated sewage effluents using an in vivo test battery. Water Research 2010; 44: 2610-2620.

Stalter D, Magdeburg A, Wagner M, Oehlmann J. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. Water Research 2011; 45: 1015-1024.

Stange D, Oehlmann J. Identification of oestrogen-responsive transcripts in Potamopyrgus antipodarum. Journal of Molluscan Studies 2012; 78: 337-342.

Stange D, Sieratowicz A, Horres R, Oehlmann J. Freshwater mudsnail (Potamopyrgus antipodarum) estrogen receptor: Identification and expression analysis under exposure to (xeno-)hormones. Ecotoxicology and Environmental Safety 2012; 75: 94-101.

Stefano GB, Cadet P, Breton C, Goumon Y, Prevot V, Dessaint JP, et al. Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. Blood 2000; 95: 3951-3958.

Tair-Abbaci K, Garric J. Histological Study of Gonadogenesis in P*otamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. Cytology and Histology 2010; 3.

Tillmann M, Schulte-Oehlmann U, Duft M, Markert B, Oehlmann J. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca : Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. Ecotoxicology 2001; 10: 373-388.

Travers MA, da Silva PM, Le Goic N, Marie D, Donval A, Huchette S, et al. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (Haliotis tuberculata) haemocytes. Fish & Shellfish Immunology 2008; 24: 400-411.

Tsai SY, Tsai MJ. Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): Coming of age. Endocrine Reviews 1997; 18: 229-240.

van der Knaap WPW, Adema CM, Sminia T. Invertebrate blood cells: morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Comp. Haematol. Int 1993; 3 20-26.

Villeneuve DL, Villalobos SA, Keith TL, Snyder EM, Fitzgerald SD, Giesy JP. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (Cyprinus carpio). Chemosphere 2002; 47: 15-28.

Wagner M, Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. Environmental Science and Pollution Research 2009; 16: 278-286.

Watton AJ, Hawkes HA. The acute toxicity of ammonia and copper to the gastropod *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith). Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological 1984; 36: 17-29.

Weltje L, Schulte-Oehlmann U. The seven year itch - progress in research on endocrine disruption in aquatic invertebrates since 1999. Ecotoxicology 2007; 16: 1-3.

Yang LH, Lin L, Weng SP, Feng ZQ, Luan TG. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (Carassius auratus) in aquatic microcosms. Ecotoxicology and Environmental Safety 2008; 71: 400-411.

Zhang L, Li YY, Chen T, Xia W, Zhou Y, Wan YJ, et al. Abnormal development of motor neurons in perfluorooctane sulphonate exposed zebrafish embryos. Ecotoxicology 2011a; 20: 643-652.

Zhang SC, Wang SH, Li HY, Li L. Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2011b; 43: 303-305.

Zhang X, Oakes KD, Cui S, Bragg L, Servos MR, Pawliszyn J. Tissue-Specific In Vivo Bioconcentration of Pharmaceuticals in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Using Space-Resolved Solid-Phase Microextraction. Environmental Science & Technology 2010; 44: 3417-3422.

Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Soto M, Cajaraville MP. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquatic Toxicology 2006; 78: S109-S116.

ANNEXES

CURRICULUM VITAE

Marion GUST
8 Octobre 1983, à Echirolles (38, France)
2 enfants (2008, 2010)

56 cours Damidot
69100 Villeurbanne, FRANCE
Tel : +33 6 45 04 38 27
mel. : gustmarion@yahoo.fr

Domaines d'expertise:

Ingénierie de l'environnement, pollution aquatique, évaluation de risque environnementale, toxicologie environnementale, biodiversité, sciences environnementales et vétérinaires, santé publique.

Expérience professionnelle

Depuis 2010 : Ingénieur environnemental-Chercheur, **IRSTEA**, Lyon, France
Coordinateur ou partenaire de projets nationaux (ANR, PNRPE, ONEMA, INSU), européens (FP7) et internationaux (PHC). Expertise en gestion environnementale (ANDRA : Agence Nationale pour la gestion des Déchets Radioactifs). Mise en place et entretien de collaborations nationales (INRA, CNRS, ENTPE, Université de Lyon, CLB) et internationales (Portugal, Canada). Recrutement et encadrement de personnel. Dissémination des connaissances (congrès, publications, enseignements, vulgarisation).

2011-2012 : Mission à la Direction de la Recherche pour la Protection des Écosystèmes Aquatiques, Science et Technologie de l'Eau, **Environnement Canada**, Montréal, Canada.
Elaboration, gestion et coordination de projet bilatéral, mise en place d'une collaboration internationale durable, encadrement de personnel, participation à des congrès internationaux.

Depuis 2011 : Consultante occasionnelle pour GREN (bureau d'étude gestion de rivière)

2005-2010 : Ingénieur environnemental, **AgroParisTech**, Paris, France
Expertise en toxicologie environnementale. Elaboration et gestion d'un programme de recherche en pollutions environnementales. Coordination d'un part des activités techniques et scientifiques. Encadrement et formation de stagiaires. Mise en place de collaborations (ENVL, CNRS, Environnement Canada).

Depuis 2008 : Enseignements à l'Université de Lyon en Licence et Master

2006 : Mission chez **BayerCropScience** (100j), Lyon, France
Etude sur la mise en place de marqueurs de perturbations agricoles, basés sur la faune sauvage.

2002-2004 : **Technicienne animalier** en CDI intermittent à MDS Pharma Services, St Germain sur L'Arbresle, France

Compétences principales:

Elaboration, coordination et gestion de projet, compétence analytique pour gérer des plannings complexes, capacité organisationnelle et humaine, adaptabilité, communication orale et écrite (français et anglais), développement de partenariat, expertise environnementale, travail en équipe, encadrement de personnel.

Formation

2010 : **Thèse de doctorat mention Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes**, Université de Metz : *Développement et faisabilité de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez des gastéropodes d'eau douce. Application au laboratoire et au terrain.*

2007 : **Ingénieur du Génie Rural, des Eaux et des Forêts**, Agroparistech, Paris.

2007 : **Master II « Ecotoxicologie et Biodiversité »**, Université de Metz.

2006 : **Thèse de Doctorat Vétérinaire**, Université de Lyon : *Enterobacter sakazakii* un pathogène émergent en santé publique ?

2005 : **Diplôme d'Etude Fondamentales Vétérinaires** (DEFV), Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Langues **Français**: langue maternelle

Anglais : courant

Allemand : connaissances de base

Projets scientifiques

· Projet européen ERAPHARM (Environmental Risk Assessment of Pharmaceuticals) : participation dans le cadre du groupe de travail « effets des médicaments sur les invertébrés »

· ONEMA fiche 25 : Développements et mise en œuvre de biomarqueurs de perturbation de la reproduction chez des invertébrés benthiques crustacés (*G. pulex)* et gastéropodes *(P. antipodarum*). Partenaire

· PNRPE : Développement d'outils analytiques et biologiques pour l'étude de l'exposition, des effets et du devenir de perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique (eau, sédiment, organisme). Partenaire

· Projet national EC2CO-INSU : Impacts moléculaires, cellulaires et physiologiques de pharmaceutiques anti-cancéreux sur un organisme aquatique d'au douce : IMOPHAK. Coordinateur

· Projet ExploraPro France-Québec : Caractérisation et modulation de la réponse immune de gastéropodes et application en tant que marqueurs de stress lors d'exposition à des rejets urbains. Coordinateur

· PHC Pessoa France-Portugal : Mode of action understanding of two pharmaceuticals (tamoxifen and venlafaxine) in aquatic organisms. Coordinateur

· ANR Blanche bilatérale France-Portugal: Développement de test embryonnaire pour le screening et l'évaluation du danger des molécules émergentes chez des organismes aquatiques. Coordinateur de la partie française

· CPCFQ : Évaluation des risques pour les espèces aquatiques exposées aux effluents urbains; impact sur le maintien de la biodiversité. Partenaire

Expertise :

· Participation au groupe de travail APPRIOS (Approche pluraliste pour la recherche des priorités pour la santé et l'environnement) pour l'ANDRA.

· Relecture d'articles pour Aquatic Toxicology, Chemosphere, Ecotoxicology, Science of the Total Environment, Environmental Pollution, Ecotoxicology and Environmental Safety…

· Evaluation de projets scientifiques pour la Fondation Scientifique Tchèque

Liste des masters encadrés et thèses codirigées

Masters :

· Vivien Lecomte 2011 (80%) : Etude de la bioaccumulation et des effets de perturbateurs endocriniens chez une espèce cible *Potamopyrgus antipodarum*.

· Marie Dupré 2012 (60%) : Étude des effets d'un mélange de trois perturbateurs endocriniens (Bisphénol-, Octylphénol et Nonylphénol) chez deux espèces de mollusques gastéropodes : *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis*

· Laurent Perez 2012 (40%) : Toxicité aigue des anticancéreux seuls et en mélange sur *Daphnia magna* et *Cerodaphnia dubia*

· Amandine Hubert-Louis 2013 (100%) : Développement et utilisation de biomarqueurs moléculaires pour la compréhension des effets de polluants aquatiques chez *Potamopyrgus antipodarum*.

Thèses

· Cyrielle Durand, 2008-2012 (10%) : Développement d'une batterie de biotests pour l'évaluation du risque associé aux sédiments contaminés.

· Alexandra Berlioz-Barbier, 2012-2015 (25%) : Développement de méthodologies innovantes sur la nanochromatographie pour l'étude de l'accumulation et du métabolisme de contaminants organiques et leurs produits de dégradation chez des invertébrés aquatiques d'eau douce

· Paul Boisseaux, 2013-2016 (80%) : Développement et faisabilités de marqueurs d'immunotoxicologie pour l'évaluation des effets des contaminants chez *Lymnaea stagnalis*.

Post-Doc

· Juliette Faburé, 2011-2013 (20%) : Effets d'un rejet de station d'épuration sur des invertébrés d'eau douce

· Malorie Gélinas, 2011-2012 (25%) : Etude des effets immunotoxiques des toxines de cyanobactéries sur les invertébrés non cible.

Participation à des jurys

Jurys de Masters
Marie Dupré 2012
Laurent Perez 2012
Amandine Hubert-Louis 2013

Publications

Les noms des étudiants encadrés sont en italique.

Journaux à comité de lecture :

1. Gust M., Gagné F., *Berlioz-Barbier A.*, Buronfosse T., Tournier M., Garric J., Cren-Olivé C. Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as field biomonitoring tool of water column contamination: exposure assessment and reprotoxic effects. Submitted *Water Research*.
2. *Fabure J.*, Gagné F., *Hubert-Louis A.*, Gust M., Immuno-genotoxic effects of wastewater effluent in *Lymnaea stagnalis*. Submitted *Chemosphere*
3. Gust M., *Berlioz-Barbier A.*, Bertin D., Buronfosse T., *Dupre M.*, *Lecomte V.*, Tair-Abbaci K., Garric J., Cren-Olivé C. Endocrine-disruptive compounds mixture bioaccumulate and have persistent reprotoxic effects on gastropods snails at environmentally relevant concentrations. Submitted *Environmental Science and Technology*.
4. Gust M., Cren–Olive C., Bulete A., Buronfosse T., Garric J. Fluoxetine accumulation and metabolization as exposure biomarker to better understand biological effects in aquatic gastropods. *Xenobiotics*. **2013**. 3 (s1), 8-10
5. *Lecomte V.*, Noury P., Tutundjian R., Buronfosse T., Garric J., Gust M. Organic solvents impair life-traits and biomarkers in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) at concentrations below OECD recommendations. *Aquatic Toxicology*. **2013**. 140-141, 196-203

6. Gust M., Fortier M., Fournier M., Garric J., Gagné F. Immunotoxicity of municipal effluent to *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*. **2013**. 126, 393-403
7. Gust M., Fortier M., Fournier M., Garric J., Gagné F. Short-term immunotoxicity of pharmaceuticals to *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*. **2013**. 445-446, 210-218
8. Gust M., *Gélinas M.*, Fortier M., Fournier M., Gagné F. *In vitro* immunotoxicity of selected antibiotics on freshwater mussel. *Environmental Pollution*. **2012**. 169, 50-58
9. Gust M., Mouthon J., Quéau H., Buronfosse T., Garric J. Natural variability and interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroids levels and energetic status in a natural population of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *General and Comparative Endocrinology*. **2011**. 172, 243-250
10. Gust M., Buronfosse T., André C., Mons R., Gagné F., Garric J. Is exposure temperature a confounding factor for the assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)? *Aquatic Toxicology*. **2011**. 101, 396-404
11. Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Coquery M., Mons R., Abbaci K., Giamberini L., Garric J. Comprehensive effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the physiology of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology*. **2011**. 101, 100-108
12. Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Quéau H., Mouthon J., Garric J. *In situ* biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray): example of WWTP effluent discharges. *Water Research*. **2010**. 44, 4517-4528.
13. Gust M., Vuillet E., Garnier F., Giroud S., Couturier S., Garric J., Buronfosse T. 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.* **2010**. 878, 1487-1492.
14. Gust M., Garric J., Giamberini L., Mons R., Abbaci K., Garnier F., Buronfosse T. Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* to specific aromatase inhibitor. *Chemosphere*. **2010**. 79, 1, 47-53.
15. 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. 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*. **2010**. 6, 524-539.
16. Gust M., Buronfosse T., Giamberini L., Ramil M., Mons R., Garric J. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch molluscs, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environmental Pollution*. **2009**. 157, 2, 423-429.
17. Pery AAA., Gust M., Vollat B., Mons R., Ramil M., Fink G., Ternes T., Garric J. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. 2008. *Chemosphere*. **2008**. 73, 300-304.

En préparation

18. Gust M., *Berlioz-Barbier A.*, Cren-Olivé C., Labanowski J., Garric J., Bouchez A. *In situ* reprotoxic effects of urban and hospital effluent on the mudsnail *P. antipodarum*: role of biofilm and water column. In prep.
19. *Fabure J.*, Ferrari B., Geffard O., Garric J., Gust M. Comprehension of reprotoxic effects of urban effluent in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray): toxicant bioaccumulation, ex situ and in situ exposures and seasonal variations. In prep.

20. Gust M., *Fabure J.*, François A., Garric J. Usefulness of reprotoxic effects in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) for field point source pollution assessment. In prep.
21. Sapin A., *Faburé J.*, *Boisseaux* P., Chapin *M.*, Gust M., Effect of global warming on embryonic development, growth, reproduction and immune function of *Lymnaea stagnalis*. In prep.

Communications orales

2013

Gust M., Laurent E., Bouchez A., Labanowski J., Cren C., and Garric J. In situ reprotoxic effects of effluents containing pharmaceuticals compounds on caged mudsnails. Pharmas, Nimes, France

Gust M., Bulete A., Buronfosse T., Garric J., Cren C. Fluoxetine accumulation and metabolization as exposure biomarker to better understand biological effects in aquatic gastropods. Ecobim, Montreal, Canada.

Gust M., Berlioz-Barbier A., Bouchez A., Labanowski J., Cren C., and Garric J. In situ reprotoxic effects of urban and hospital effluent on the mudsnail *P. antipodarum:* role of biofilm and water column. SETAC Europe (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Glasgow, United Kingdom

2012

Gust M., Dupuis M., Lecomte V., Buronfosse T., Cren-Olivé C., Garric J. Endocrine-disruptive compounds mixture have persistent reprotoxic effects on gastropods snails at environmentally relevant concentrations. PNRPE International Conference, Paris, France

Gust M., Gagné F. Effects of environmental relevant concentration of pharmaceuticals on the immune system of *Lymnaea stagnalis* SETAC World, Berlin, Germany

Gélinas M., Gust M., Fortier M., Fournier M., Gagné F. Seasonal variation of immune parameters in mussels (*Elliptio complanata*) exposed to natural bloom of cyanobacteria. SETAC World, Berlin, Germany

2011:

Gust M., Buronfosse T., Mons R., Geffard O., Garric J. Intérêt du biotest *in situ* pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux. Ecobim, Mont-Joli, Canada.

Gust M., Lacaze E., Buronfosse T., Chaumot A., Coquery M., Devaux A., Geffard A., Geffard O., Giamberini L., Garric J. Approche multispécifique *in situ* pour l'évaluation de l'impact toxique: exemple du basin versant du Riou-Mort. Chapitre Saint Laurent, Montréal, Canada

Cren-Olivé C., Bulete A., Baudot R., Wiest L. Gust M., Garric J. Study of bioaccumulation and metabolization of fluoxetine in benthic invertebrates by Micro-QuEChERS-NanoLC-Nano-ESI-MS/MS. SETAC Europe, Milan, Italy.

2010:

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

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

2009:

Gust M., Buronfosse T., Garric J. Potential use of *Potamopyrgus antipodarum* to assess endocrine disruption in laboratory and field studies. ISTA 14 (International Symposium on Toxicity Assessment), Metz, France.

Conférences invitées

Gust M., Gagné F. Effects of environmental relevant concentration of pharmaceuticals on the immune system of *Lymnaea stagnalis.* Cytothreat workshop, Naples, Italy

Affiches

2012

Gust M., Gagné F. *In vitro* effects of environmental relevant concentration of antibiotics on immune parameters of *Elliptio complanata*. **Corner Poster**. SETAC World, Berlin, Germany

2010

Gust M., Buronfosse T., Mons R., Quéau H., Geffard O., Garric J. *Potamopyrgus antipodarum* : un outil de bioévaluation de la qualité des eaux de rivière ?. SEFA (Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Versailles, France.

2009

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

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. EMEC10, 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. Adebiotech, Romainville, France.

Gust M, Buronfosse T., Mons R., Quéau H., Geffard O., Garric J. Impact of WWTP effluents using field exposure of gastropod *P. antipodarum*. Adebiotech, Romainville, 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. ISTA 14, Metz, France.

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

2007 :

Gust M., Buronfosse T., Giamberini L., Ramil M., Mons R., 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, York, UK

SELECTION D'ARTICLES

1. *Lecomte V.*, Noury P., Tutundjian R., Buronfosse T., Garric J., Gust M. Organic solvents impair life-traits and biomarkers in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) at concentrations below OECD recommendations. *Aquatic Toxicology*. **2013**. 140-141, 196-203

2. Gust M., Fortier M., Fournier M., Garric J., Gagné F. Immunotoxicity of municipal effluent to *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*. **2013**. 126, 393-403

3. Gust M., Fortier M., Fournier M., Garric J., Gagné F. Short-term immunotoxicity of pharmaceuticals to *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*. **2013**. 445-446, 210-218

4. Gust M., *Gélinas M.*, Fortier M., Fournier M., Gagné F. *In vitro* immunotoxicity of selected antibiotics on freshwater mussel. *Environmental Pollution*. **2012**. 169, 50-58

5. Gust M., Cren–Olive C., Bulete A., Buronfosse T., Garric J. Fluoxetine accumulation and metabolization as exposure biomarker to better understand biological effects in aquatic gastropods. *Xenobiotics*. **2013**. 3 (s1), 8-10

6. Gust M., Gagné F., *Berlioz-Barbier A.*, Buronfosse T., Tournier M., Garric J., Cren-Olivé C. Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as field biomonitoring tool of water column contamination: exposure assessment and reprotoxic effects. Submitted *Water Research*.

7. Gust M., *Berlioz-Barbier A.*, Bertin D., Buronfosse T., *Dupre M.*, *Lecomte V.*, Tair-Abbaci K., Garric J., Cren-Olivé C. Endocrine-disruptive compounds mixture bioaccumulate and have persistent reprotoxic effects on gastropods snails at environmentally relevant concentrations. Submitted *Environmental Science and Technology*.