THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 341
E2M2 : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation
Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Écotoxicologie

Soutenue publiquement le 14/02/2017, par :

Paul Boisseaux

Développement de marqueurs d'immunocompétence chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* et applications en écotoxicologie

---

Devant le jury composé de :

Lebel, Jean-Marc	Professeur d'Université	UMR BOREA, Caen	Président, Examinateur
Auffret, Michel	Professeur d'Université, HDR	UMR LEMAR, Brest	Rapporteur
De Vaufleury, Annette	Maître de Conférence, HDR	UMR 6249 Chrono-Environnement, Besançon	Rapporteure
Gagnaire, Béatrice	Chargée de Recherche	IRSN (Leco), Cadarache	Examinatrice
Mondy, Nathalie	Maître de Conférence, HDR	LEHNA, Université de Lyon 1	Examinatrice
Geffard, Olivier	Directeur de Recherche, HDR	Irstea (MAEP), Lyon-Villeurbanne	Examinateur

Invitées :

Garric, Jeanne	Directrice de Recherche, HDR	Irstea (MAEP), Lyon-Villeurbanne	Directrice de thèse
Thomas, Hélène	Maître de Conférence, HDR	UMR LIENSs, La Rochelle	Co-directrice

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Nous nous éveillons au monde et aux autres, entre étonnement et compréhension, émerveillement et terreur, apprentissage et invention, découvrant la réalité et explorant l'imaginaire.

Jean-Claude Ameisen

Remerciements

Je remercie la région **Rhône-Alpes** de m'avoir accordé une allocation doctorale de recherche, sans laquelle ce projet n'aurait pu voir le jour. Merci à **Irstea** de m'avoir fourni la structure d'accueil nécessaire à la réalisation de ce projet. Merci à l'école doctorale **E2M2** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse.

Je remercie très chaleureusement tous les membres du jury de thèse.

Monsieur **Auffret**, nationalement et internationalement reconnu comme spécialiste de l'Immunotoxicologie environnementale chez les mollusques en milieu marin. En commençant l'état de l'art en début de thèse, votre nom s'est rapidement imposé parmi les experts les plus reconnus dans le domaine. J'en ai eu la confirmation tout au long de la thèse. Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse, c'est pour moi un immense honneur. Madame **De Vaufleury**, je vous remercie également d'avoir accepté d'être rapporteure de cette thèse. C'est un très grand honneur pour moi. En faisant la bibliographie sur les gastéropodes aquatiques d'abord, et gastéropodes terrestres pour élargir, j'ai tout de suite constaté que vous étiez incontournable dans le paysage scientifique des gastéropodes continentaux en écotoxicologie. Madame **Gagnaire**, je vous remercie vivement d'avoir accepté d'être examinatrice de la thèse. Ayant réalisé vos travaux de thèse en immunotoxicologie environnementale sur l'huître creuse et ayant continué la recherche autour des approches immunonologiques en écotoxicologie, vous correspondiez exactement à l'expertise nécessaire pour examiner cette thèse. Monsieur **Lebel**, un grand merci d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Vous aviez déjà pris connaissance du sujet auparavant car vous faisiez parti de mon comité de pilotage de thèse. Je dois donc vous remercier doublement. Votre transdisciplinarité largement reconnue en immunologie et stress environnementaux sur les mollusques aquatiques m'impose une immense admiration et c'est un honneur que vous puissiez examiner ce travail de thèse. Je tiens aussi à remercier Madame Nathalie **Mondy**, experte en écophysiologie évolutive et stress anthropiques, pour avoir accepté d'être examinatrice du travail effectué. Enfin, je remercie vivement Monsieur Olivier **Geffard**, écotoxicologue avec des approches en écophysiologie et biologie moléculaire sur les gammaridés dans les milieux, pour avoir accepté de faire parti du jury en tant qu'examinateur et de partager ce moment important.

Merci aussi à tous les membres de mon comité de pilotage. Dr Emmanuelle **Gillot-Fromont**, qui aussi était ma tutrice à l'école doctorale. Merci également pour vos cours de biostatistiques en analyses multivariées à l'école VetAgro. Un grand merci au Dr Laurent **Lagadic** pour vos conseils perspicaces et votre soutien nécessaire. Dr Jean-Marc **Lebel**, merci pour votre écoute et vos conseils sur l'orientation des expérimentations. Dr Emilie **Farcy**, merci pour votre suivi attentif et vos conseils scientifiques avisés.

Merci au Dr Marie-Agnès **Coutellec**, pour vos conseils autour du modèle limnée et autour de possibles approches transcriptomiques.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, **Dr. Jeanne Garric**, non seulement pour m'avoir permis de mener la thèse à son terme mais aussi pour avoir été présente tout au long de cette aventure. Merci pour son ouverture d'esprit et sa gentillesse. Un grand Merci ! Et bien sûr pour m'avoir beaucoup apporté sur le plan scientifique, pour le partage de la grande transdisciplinarité de ses connaissances, pour avoir répondu à mes questionnements et conseillé dans les marches à suivre. L'organisation des articles (parfois agaçante !) et ses corrections lui doivent beaucoup. J'ai beaucoup appris à tes cotés... il y a beaucoup, beaucoup de choses à faire en écotoxicologie pour les années futures !

Je remercie aussi Marion **Gust** sans qui ce projet n'aurait jamais existé. Je me souviens lorsque je cherchais un sujet de thèse et que j'ai vu le concours de recrutement — à Madrid à l'époque — j'ai lu le sujet du projet et j'ai tout de suite eu la conviction profonde qu'il était en parfaite cohérence avec mon engouement professionnel pour la Recherche ! Un grand Merci d'avoir cru en moi pour mener à bien ce projet et merci pour tes conseils en début de parcours. Je remercie tout particulièrement le Pr. Stéphane **Betoulle** pour avoir gentiment accepté de reprendre la co-direction en début de parcours. Les vicissitudes ont fait que l'encadrement n'a pas abouti mais j'ai quand même pu interagir avec toi en milieu de parcours. J'espère avoir l'opportunité de collaborer avec toi sur un projet environnemental à l'avenir. Merci pour tous tes conseils. Je remercie également Hélène **Thomas** pour avoir accepté de reprendre la co-direction en fin de parcours. Merci pour ta gentillesse et l'introduction en milieu universitaire. J'espère pouvoir mener un projet avec ta collaboration dans un certain avenir.

Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Laure **Delignette-Muller** pour son aide dans l'analyse statistique des jeux de données et les compétences qu'elle m'a fait acquérir dans ce domaine. Tu m'as fait apprécier les statistiques ! Merci beaucoup.

Et bien sûr... je remercie toutes les personnes de l'équipe d'écotoxicologie d'Irstea du centre de Lyon-Villeurbanne pour ces trois années passées à vos côtés. Merci pour votre apport transdisciplinaire et votre présence bien sympathique. Merci à tous ceux qui m'ont aidé pour collecter l'hémolymphe des limnées lors des jours de mesure. Je voudrais remercier tout particulièrement Patrice **Noury** qui m'a beaucoup apporté scientifiquement et aussi sur le plan de la motivation. Et merci pour les conversations toujours très intéressantes et éclairées. J'en garderai l'excellent souvenir d'un collègue en or. Merci aussi aux autres permanents de l'équipe, Khédidja **Abbaci** pour sa bienveillance et ses gâteaux succulents. Hervé **Quéau** pour ses imitations ubuesques et ses sources de conversations inépuisables. Adeline **François** pour sa bonne humeur. Hélène **Arambourou** pour sa sympathie. Merci à Alexandre **Ciliberti** et Alexandre **Decamps** pour leur bonne humeur et les quelques apéros. Merci à Alexandre **Sapin** pour sa sympathie et pour avoir lancé des élevages de limnées en début de thèse. Merci à Lucile **Perrier** qui a repris les élevages de limnées sur la fin de ma thèse et pour tous les achats de laitues au supermarché que cela implique. Merci à Quentin **Chabanne** pour sa bonne humeur, mais j'ai un doute sur son humour. Merci à Renaud **Tutundj(i)an** pour m'avoir soutenu pendant cette aventure et pour l'ouverture d'esprit qu'il propage dans son engagement politico-syndical. Merci à Nicolas **Delorme** pour son aide sur l'expérimentation à la station d'épuration de la Feyssine. Merci à Marc **Babut** pour ses discussions éclairées et notamment sur les évaluations du risque écologique. Un grand Merci à Arnaud **Chaumot** pour sa sympathie, ses conseils en analyses statistiques, et sa sagacité d'esprit pour alimenter les conversations au coin café ! Et bien sûr un grand merci à Olivier **Geffard** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son humanisme, son humour et sa vision de l'écotoxicologie.

Thank you to the *Biomonitoring Aquatic Environment company* (BIOMAE), struggling for a better world. Thanks to Guillaume **Jubeaux** and Rémy **Recourat-Massaquant** fellows for providing cheerful coffee breaks.

Un grand merci à tous les thésards ! Delphine **Bertin** merci beaucoup pour ta sympathie, tes conseils et la symbiose naturelle du Poitou qui s'est imposée ! Judith **Trapp** merci pour ta bienveillance et tes discussions passionnées sur le monde de la Recherche. Amandine **Vigneron** pour le partage constructif de ton expérience ! *Monsieur Duarte Domingos* **Gouveia** *merci pour les apéros à répétitions, les raclées que je t'ai mises au tennis, prises à la pétanque, ton sang-froid quand on a réussi à te faire appeler un dénommé Monsieur « Allotente » (« covoiturage » en portugais) pour raisons administratives et que le numéro menait à l'accueil du « parc aux oiseaux ». Je retiendrai ton engouement pour* Merci Duarte pour ton aide dans la compréhension de l'intérêt des analyses protéomiques à large échelle et de ses applications en écotoxicologie. Alice **Vidal** un grand merci à toi, tu étais une collègue de bureau en or et ta bonne humeur était communicative !

Merci aussi à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire, je pense notamment à Yassine, Alisson, Julien, Hayette, Laurent, Clara et les autres. Je remercie particulièrement Dante **Chazarin** pour sa sympathie et son aide autour de la réflexion du modèle limnée nouvellement introduit au laboratoire et des expérimentations associées. Merci pour sa persévérance face à de fortes mortalités inexpliquées, et répétées, des cohortes ramenées au laboratoire. Et merci pour son aide concernant les longues prospections de limnées en milieu naturel et les développements des techniques de pêche/plongée en palme-masque-tuba dans le Rhône ! Merci aussi à Raphaël **Mons** de l'équipe DYNAM pour s'être proposé pour aller collecter des limnées. Et merci de m'avoir fait découvrir la pêche électrique sportive sur deux jours.

Merci à Marlène **Fortier** de l'INRS à Montréal de m'avoir enseigné les fondamentaux de la cytométrie en flux. Merci à Didier **Coupet** pour son assistance technique sur la plate-forme de la station d'épuration de la Feyssine. Merci à Christine **Berthier** et Jimmy **Perrot** du Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire de l'université de Lyon pour m'avoir permis d'utiliser leur salle de culture cellulaire, d'apporter le cytomètre et d'essayer le test NK-cytotoxique avec les hémocytes de *L. stagnalis*.

Merci aussi à mes anciens collègues de Madrid, en particulier Dr José-Maria **Navas** et Dr Tobias **Lammel** qui m'ont beaucoup apporté sur le plan scientifique et culturel et qui m'ont donné envie de faire une thèse. Merci aussi à mon ancienne responsable de Master, Dr Elena **Gomez**, et à ma tutrice au Canada, Dr Marilyne **Stuart**, auprès de qui j'ai fait mon premier stage dans le domaine.

Bien sûr je remercie ma famille, ma mère et mes deux soeurs chéries, mon papa dans le ciel et aussi dans mon coeur, mes neveux Lucas, Noah et ma nièce Mia même si leur contribution était essentiellement symbolique, mes beaux-frères, les fréros du Cameroun, mes amis de Poitiers (sauf Marco), de Lyon ou d'ailleurs. Merci aussi à toi Sidonie.

Et enfin, au lecteur téméraire qui aura lu ces quelques lignes.

Lymnaea stagnalis

http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T155475A4782225.en

Use and Trade [top]

Use and Trade:	This species is known to be used as food in Russia (Ponomareva and Petson 2005).

Ponomareva, E. and Petson, E. (2005). Vasopressin Enhances Sensitization of Defensive Reflex in the Edible Snail Lymnaea stagnalis. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 41(3) :368–370.

Puisque beaucoup de personnes se posent la question... *the pond snail is « edible »*, on peut donc le manger mais attention à bien le cuire avant car il peut être vecteur de parasites... Je vous fais également part de la découverte fortuite du message amusant ci-dessous, à un moment où je recherchais activement des limnées dans le Rhône pour mener des expérimentations...

problème de limnées en surnombre: au secours!!

Sujet du message: problème de limnées en surnombre: au secours!! **Posté:** Dim 10 Avr 2011 18:59

J'avais posté dans les bébètes du bassin, mais pas de réponse, plus de connaisseurs ici??

Bonjour!!
J'ai un soucis avec des limnées. J'ai installé dans mon jardin une petite mare, afin d'avoir une biodiversité aquatique. Seulement voilà, malgré mes précautions de mise en quarantaine de plantes (avant de les introduire), ben j'ai dû passer à travers une ponte de limnées. Le soucis maintenant, c'est que n'ayant pas de prédateurs, elles se multiplient très rapidement, et du coup elles bouffent absolument toutes les plantes que j'essaie de mettre. J'ai dégoté un nymphéa pigmé que j'ai mis hier, il a déjà des trous dans ses jeunes feuilles... et là, je dois dire que je suis un peu verte... D'autre part, ça c'est une bonne nouvelle, une grenouille (agile, je crois) a élu domicile dans la mare, et m'a fait l'honneur d'y pondre ses oeufs!! Seulement, j'ai lu dans un article sur internet, que les limnées pouvaient les bouffer aussi, et effectivement, j'en vois souvent sur les oeufs...
Alors matenent question qui tue (je vais passer pour une dingue mais tant pis). Que faire des limnées que je vire?? Je n'arrive pas à me résoudre à les laisser crever (dans la souffrance...) en plein cagnard...
Merci de me répondre... En attendant je vais isoler mon nymphéa dans un seau sinon, demain je n'aurai plus une seule feuille...
Pour info, j'ai attaqué à enlever les escargots aujourd'hui, j'en ai déjà plus d'une centaine dans un seau. J'en fait quoi???

@ +
Linou

" Manges un crapaud vivant en te levant le matin et rien de pire ne pourra t'arriver dans la journée!"
http://www.aujardin.info/membres/liste- ... ouseth.php

linouseth

offline

Fleur de pipelette

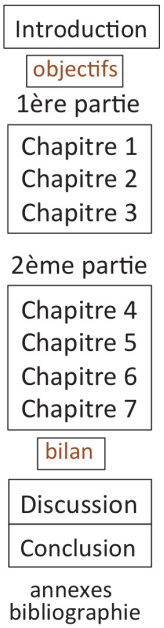


Enregistré le: Jeu 16 Avr 2009 10:15
Messages: 758
Localisation: Village aux portes de la Maurienne (73) Plaine (300m alt)
Région: Rhone Alpes

Préface

Ce travail de thèse et l'ensemble des expérimentations s'y rapportant ont été mené au sein du **Laboratoire d'Écotoxicologie** d'**Irstea**, groupement de Lyon-Villeurbanne. Ce laboratoire s'inscrit dans l'unité MAEP (Milieux Aquatiques, Écologie et Pollution) de l'établissement Irstea et dans le TR BELCA (Thème de Recherche « Réponses biologiques et écologiques aux contaminants du milieu aquatique »). J'ai bénéficié d'une allocation doctorale de recherche —pour une durée de 3 ans— allouée par la **région Rhône-Alpes** (ARC 3 Environnement 2013—2016). L'**école doctorale E2M2** m'a permis de réaliser et de soutenir la présente thèse. Mes travaux se sont déroulés sous la supervision du **Dr. Jeanne Garric**, directrice de la thèse. Le **Dr. Marion Gust** a été encadrante scientifique les trois premiers mois. Une intéraction a été mise en place avec le **Dr. Stéphane Betoulle** de l'Université de Reims, puis avec le **Dr. Hélène Thomas** de l'Université de La Rochelle, prenant le statut de co-directrice.

Le modèle animal *Lymnaea stagnalis* a été introduit au laboratoire peu avant mon arrivée, grâce au Dr Gust qui venait de terminer un post-doctorat au Canada sur ce modèle et qui a été l'instigateur de ce projet de thèse. Les approches immunotoxicologiques ont été introduites au laboratoire au cours de ce projet de thèse. Un cytomètre en flux venait également tout juste d'être acquis à mon arrivée, ce qui m'a permis de l'utiliser dès le début. Des élevages au laboratoire de *Lymnaea stagnalis* ont été développés avec l'appui d'un personnel technique au début et à la fin du projet. Les élevages ont périclité à plusieurs reprises et des essais d'acclimatation d'une autre population de laboratoire se sont révélés infructueux (mortalités importantes). Cela m'a poussé à aller prospecter sur le terrain. Je suis enchanté d'avoir été introduit à la thématique d'Immunotoxicologie Environnementale et son corollaire, l'Écotoxicologie. J'ai pu intéragir avec de nombreux chercheurs dans ces domaines. Ces années ont été un apprentissage à plusieurs niveaux, scientifiques et humains. Cette thèse vise à fournir des éléments de réponse aux questions intrinsèques à la réflexion sur la pertinence d'utilisation de marqueurs d'immunocompétence chez *Lymnaea stagnalis* dans un contexte écotoxicologique.



Le manuscrit est divisé en deux grandes parties. Une introduction générale fixe au préalable les objectifs de ces travaux de thèse, un bilan et une discussion générale les clôturent. Chaque grande partie du manuscrit est composée de plusieurs chapitres. Un sommaire intermédiaire est placé au début de chaque chapitre pour faciliter la lecture. Chaque chapitre contient un article publié, soumis ou à soumettre (en anglais). Les chapitres sont tout d'abord remis en contexte avec les problématiques traitées et un résumé étendu de l'article est écrit en français. Un chapitre « Matériels et méthodes » a été inclus afin d'expliciter les méthodes communes à l'ensemble des autres chapitres (*e.g.,* pour les marqueurs d'immunocompétence) et c'est le seul chapitre qui ne contient pas d'article. Les méthodes propres à un seul chapitre (*e.g.,* exposition d'un xénobiotique) sont incluses dans le chapitre correspondant. Un encadré récapitulatif est placé à la fin du chapitre pour permettre de faire le lien avec le suivant afin d'avoir une lecture linéaire cohérente. Le document a été écrit avec le logiciel LaTeX. Notez que la version électronique contient des **hyperliens** pour faciliter la navigation (table des matières, figures, tableaux, indication de pages, liens internets).
Bonne lecture.

Cours suivis dans le cadre de la formation doctorale

- La cytométrie en flux (CNRS)
- Biostatistiques avec le logiciel R (VetAgroSup)
- Analyses multivariées et modèles linéaires (VetAgroSup)
- Alignements de séquences génomiques et phylogénie moléculaire (CNRS)

Animation scientifique

- encadrement d'un stagiaire de Master 2
- animation de travaux dirigés (Université de La Rochelle)
- organisation d'une journée table ronde « L'immunotoxicologie en écotoxicologie » au laboratoire
- une communication orale à l'INSA (institut national des sciences appliquées) de Lyon (équipe Symbiosis & Immune Signaling)
- une communication orale lors du séminaire TR BELCA à Bordeaux (15-17/04/2015)
- présentations de laboratoire

Communications lors de congrès nationaux ou internationaux

- un poster au colloque « Immuninv » (Immunité des invertébrés) à Dijon (12-14/05/2014)
- un poster *spotlight* lors du colloque annuel « ECOBIM 2014 » à Brest (20-23/05/2014)
- un poster au colloque de la SEFA (Société d'écotoxicologie fondamentale et appliquée) à Besançon (1-2/07/2014)
- un poster lors du 25eme colloque annuel de la SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) Europe à Barcelone (3-7/05/2015)

- une communication orale lors du 25eme colloque annuel de la SETAC Europe à Barcelone (3-7/05/2015)
- une communication orale lors du colloque de la SEFA à Bordeaux (30/06 et 01/07/2015)
- une communication orale lors du 26eme colloque annuel de la SETAC Europe à Nantes (22-26/05/2016)
- une communication orale lors du colloque « ECOBIM 2016 » au Havre (29/05 au 01/06/2016)

Contributions scientifiques (articles)

[1] **Paul Boisseaux**, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. An overview of immunormakers in *Lymnaea stagnalis* and potential applications in ecotoxicology. ***(à soumettre)***.

[2] **Paul Boisseaux**, Marie-Laure Delignette-Muller, Khédidja Abbaci, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis* : Characterization and effects of repeated hemolymph collections. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016.

[3] **Paul Boisseaux**, Patrice Noury, Marie-Laure Delignette-Muller, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. Recomendations for the analysis of hemocyte-related oxidative activities in the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Xenobiotics****(accepté)***, 2016.

[4] **Paul Boisseaux**, Marion Gust, Stéphane Betoulle, and Jeanne Garric. Short-term immunotoxic effects of an anti-cancer drug (Etoposide) on the freshwater pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Xenobiotics*, 4(2), 2014.

[5] **Paul Boisseaux**, Marie-Laure Delignette-Muller, Patrice Noury, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. Immune responses of the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* following short-term exposures of pharmaceuticals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* ***(accepté)***, 2017.

[6] **Paul Boisseaux**, Dante Chazarin, Patrice Noury, Marie-Laure Delignette-Muller, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. Is the insecticide deltamethrin likely to exert immunotoxicity to natural populations of *Lymnaea stagnalis* ? ***(à soumettre)***.

[7] **Paul Boisseaux**, Marie-Laure Delignette-Muller, Patric Noury, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. Exploring the immunotoxicity of cadmium to the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. ***(à soumettre)***.

[8] **Paul Boisseaux**, Marie-Laure Delignette-Muller, Patrice Noury, Hélène Thomas, and Jeanne Garric. Immune responses of the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* facing treated urban wastewaters. ***(à soumettre)***.

Table des matières

Préface **I**

Table des figures **VIII**

Liste des tableaux **XII**

Acronymes et abbréviations **XIII**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **2**
Éléments historiques 2
Écotoxicologie et gestion environnementale 7
Pourquoi étudier *Lymnaea stagnalis* en écotoxicologie ? 14
Pourquoi étudier le système immunitaire en écotoxicologie ? 16

Objectifs et questions de la thèse **18**

I CARACTÉRISATIONS FONDAMENTALES ET MISE AU POINT DE L'APPROCHE MULTIBIOMARQUEURS **24**

1 État de l'art **25**
1.1 Écologie et répartition de *Lymnaea stagnalis* 26
1.1.1 Succès évolutif 26
1.1.2 Classification et appellations 27
1.1.3 Alimentation 30
1.1.4 Prédation 30
1.1.5 Répartition 31
1.2 Biologie de *L. stagnalis* 33
1.2.1 Système nerveux 33
1.2.2 Croissance 34
1.2.3 Reproduction 36
1.2.4 Système circulatoire 39
1.2.5 Hémolymphe 39
1.2.6 Respiration 41
1.2.7 Hémocyanine 41
1.3 Système de défense interne chez *L. stagnalis* 42
1.3.1 Réponse immunitaire humorale 42
1.3.2 Réponse immunitaire cellulaire 44
1.3.3 Parasites 53
1.4 **Article 1** : Vue d'ensemble des immunomarqueurs en immunotoxicologie environnementale avec un regard particulier sur *L. stagnalis* 58

2 Matériels, méthodes et validations de protocoles 93
2.1 Approvisionnement de *Lymnaea stagnalis* . . . 94
2.1.1 Reconnaissance de l'espèce . . . 94
2.1.2 Populations étudiées . . . 96
2.1.3 Paramètres biométriques et calibration des organismes . . . 100
2.1.4 Individualisation des organismes . . . 106
2.2 Marqueurs d'immunocompétence . . . 107
2.2.1 Cytométrie en flux . . . 107
2.2.2 Collecte de l'hémolymphe . . . 111
2.2.3 Densités hémocytaires et distributions hémocytaires . . . 113
2.2.4 Viabilités hémocytaires . . . 125
2.2.5 Phagocytose . . . 129
2.2.6 Activité oxydative immunocompétente . . . 139
2.2.7 Phénol oxydase . . . 140
2.3 Analyses statistiques . . . 143
2.3.1 Choix des représentations graphiques . . . 143
2.3.2 Modèles linéaires mixtes . . . 144

3 Les hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* 148
3.1 Contexte et objectifs . . . 149
3.2 **Article 2** : Analyse des hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* : Caractérisation et effets de prélèvements répétés . . . 152
3.3 **Article 3** : Recommandations pour l'analyse de l'activité oxydative immunocompétente liée aux hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* . . . 176
3.4 Résultats complémentaires sur les caractérisations hémocytaires . . . 184
3.4.1 Distributions hémocytaires . . . 184
3.4.2 Images complémentaires . . . 185

II IMMUNOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE 192

4 Immunotoxicité aiguë de xénobiotiques pharmaceutiques 193
4.1 Contexte et objectifs . . . 194
4.2 **Article 4** : Effets immunotoxiques à court terme de l'anti-cancéreux Etoposide sur l'escargot des étangs *Lymnaea stagnalis* . . . 196
4.3 **Article 5** : Réponses immunitaires chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* après une courte exposition à des produits pharmaceutiques préoccupants pour les systèmes immunitaires : Diclofenac, Cyclophosphamide et Cyclosporine A . . . 200

5 Exposition de longue durée à la Deltaméthrine - concentrations environnementales 227
5.1 Contexte et objectifs . . . 228
5.2 **Article 6** : La Deltaméthrine exerce-t-elle des effets immunotoxiques sur une population naturelle de *Lymnaea stagnalis* ? . . . 230

6 Exposition de longue durée au Cadmium - fortes concentrations 264
6.1 Contexte et objectifs . . . 265
6.2 **Article 7** : Exploration de l'immunotoxicité du cadmium sur une population urbaine de *Lymnaea stagnalis* . . . 267

7 Multicontamination réaliste - effluents bruts de station d'épuration 302
7.1 Contexte et objectifs . . . 303
7.2 **Article 8** : Réponses immunitaires de l'escargot *Lymnaea stagnalis* face à des effluents urbains traités de station d'épuration . . . 304

Bilan — Objectifs et questions de la thèse 328

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 339
8.1 *Lymnaea stagnalis* comme modèle écotoxicologique . . . 340
8.1.1 Approvisionnement . . . 340
8.1.2 Biométrie et calibration . . . 341
8.1.3 Bioaccumulation, sensibilité générale et connaissances transversales . 346
8.2 Caractérisation hémocytaire . . . 348
8.3 Collectes répétées d'hémolymphe . . . 351
8.4 Variabilités naturelles des hémocytes . . . 357
8.4.1 Variabilités inter-individuelles et intra-individuelles . . . 357
8.4.2 Variabilités inter-populations ou inter-expériences . . . 359
8.4.3 Propositions de valeurs de référence . . . 372
8.5 Facteurs confondants . . . 375
8.5.1 Dans les études de ce manuscrit . . . 375
8.5.2 Perspectives sur la compréhension des facteurs confondants . . . 377
8.6 *Challenges*/inductions immunitaires et évaluation de l'immunocompétence des organismes . . . 382
8.6.1 Expositions réalisées . . . 382
8.6.2 Perspectives . . . 383
8.7 Effets de xénobiotiques sur les marqueurs d'immunocompétence étudiés . . 384
8.7.1 Sensibilité (effet des concentrations) . . . 386
8.7.2 Rapidité de réponse . . . 389
8.7.3 Précocité physiologique . . . 392
8.7.4 Spécificité immunotoxique trans-phylum . . . 398
8.8 Perspectives sur d'autres immunomarqueurs et méthodes . . . 400

CONCLUSION 403

Annexes 411

A Catastrophes toxicologiques, écologiques, écotoxicologiques d'origine accidentelle (ou conflictuelle) 412

B Relation entre la taille des masses et le nombre d'oeufs 415

C Extras 416

D Courbes d'étalonnage (dichlorofluorescein) 421

E Tri cellulaire 423

F Informations sur les classifications (éco)toxicologiques des substances étudiées selon la réglementation REACH 426

G Expositions au diclofenac 429

H Diagramme d'analyse d'un biomarqueur immunitaire en écotoxicologie 433

Bibliographie 436

Résumé / *Abstract* **467**

Table des figures

1 Genèse de l'écotoxicologie et idéal holistique selon Newman & Unger [2003] 5
2 Principales structures et personnes qui influencent directement ou indirectement l'impact écotoxique des substances chimiques dans les milieux, en France . . . 9
3 Écotoxicologie, évaluation du risque environnemental prospectif et rétrospectif et gestion du risque (une partie du schéma est inspirée et modifiée de [US-EPA, 1995]) . . . 12
4 Utilisation de biomarqueurs et changement d'échelle (évènements) écotoxicologique (schéma modifié de Lagadic *et al.* [1998]) . . . 13
5 Approximations des proportions globales des différents embranchements de la biodiversité animale des eaux douces selon [Balian *et al.* , 2008] . . . 15

1.1 Classification de *Lymnaea stagnalis* . . . 28
1.2 Représentation schématique du cycle de vie de *Lymnaea stagnalis* en milieu naturel . . . 30
1.3 Distribution géographique de *Lymnaea stagnalis* . . . 32
1.4 Séquences d'accouplement et d'oviposition chez *Lymnaea stagnalis* [Koene, 2010] . . . 38
1.5 Masses de *Lymnaea stagnalis* . . . 38
1.6 Système circulatoire chez *Lymnaea stagnalis* (copie de Sminia [1981]) . . . 40
1.7 Modèle de reconnaissance et phagocytose d'un pathogène via les opsonines-agglutinines chez *L. stagnalis* selon Sminia & Van der Knaap [1986] . . . 43
1.8 Représentation schématique des effecteurs cellulaires du système de défense interne chez *L. stagnalis* selon Van der Knaap & Loker [1990] . . . 45
1.9 Les hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* (selon [Sminia *et al.* , 1983]) : formation, prolifération et maturation . . . 48
1.10 Représentation schématique de la classification des hémocytes selon leur cytogramme en cytométrie de flux chez les mollusques : existence d'un « continuum » de taille et de granulation (image de de Freitas Rebelo *et al.* [2013]) 50
1.11 Représentation schématique de la production de ROS non-mitochondriales et immunostimulée — à l'extérieur de l'hémocyte (à gauche) et dans le phagosome (à droite) — chez les hémocytes de bivalves selon Donaghy *et al.* [2012] . . . 52
1.12 Vue d'ensemble du cycle de vie de trématodes digénétiques de la famille schistosoma (1) et echinostoma (2) selon Van der Knaap & Loker [1990] . . 54
1.13 Cercaire du *Trichobilharzia szidati* (=*Trichobilharzia ocellata*, environ 400 μm) et son cycle selon [Soldánová *et al.* , 2016] . . . 56

2.1 Critères morphologiques de reconnaissance de l'espèce *Lymnaea stagnalis* [Tachet, 2008] . . . 94
2.2 Critères morphologiques de reconnaissance de l'espèce *Lymnaea stagnalis* [Tachet, 2008] . . . 95
2.3 Photographies de *Lymnaea stagnalis* adulte (32±2 mm) . . . 96

2.4 Collecte de *Lymnaea stagnalis* en milieu naturel dans un contre-canal du rhône (Briord, France) . . . 98
2.5 Collecte de *Lymnaea stagnalis* en milieu urbain (étang de Broye, Renens, Suisse) . . . 99
2.6 mesure de la longueur de coquille pour calibrer les organismes . . . 100
2.7 Relation longueur de coquille - poids frais des organismes . . . 101
2.8 Relation longueur de coquille - poids sec des organismes . . . 102
2.9 Relation poids frais - poids sec des organismes . . . 103
2.10 Relation longueur de coquille — âge des organismes . . . 104
2.11 Relation biométrie — densité hémocytaire . . . 105
2.12 Méthodes d'identification individuelle des organismes pour un suivi dans le temps . . . 106
2.13 Représentation générale et schématique du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux . . . 109
2.14 Cytomètre en flux *Guava EasyCyte 6-HT multicolors (Merck Millipore)* . . . 110
2.15 Filtres et lasers du cytomètre en flux Guava-6HT . . . 110
2.16 Collecte de l'hémolymphe . . . 111
2.17 Compatibilité d'utilisation des fluorochromes avec le cytomètre Guava 6-HT 113
2.18 Live-gate d'acquisition pour le comptage hémocytaire (cytogramme) . . . 118
2.19 Vérification de la précision de comptage des hémocytes . . . 119
2.20 Vérification de la précision de comptage et limites si une augmentation de la densité hémocytaire (par rapport au niveau basal ≈ 530 $cellules.\mu l^{-1}$) survient au cours d'une expérimentation . . . 121
2.21 Mesure de la viabilité hémocytaire : régions d'acquisition et visualisation des populations . . . 126
2.22 Viabilité hémocytaire de *L. stagnalis* après 24h d'exposition *in vitro* au cadmium . . . 128
2.23 *Dot-plots* d'un échantillon hémocytaire de *L. stagnalis* présentant une importante cytotoxicité induite par une exposition *in vitro* au cadmium . . . 128
2.24 Fenêtre d'acquisition des évènements d'un échantillon sans hémocytes mais avec des billes (témoins négatif) . . . 130
2.25 Fenêtre d'acquisition des évènements d'un échantillon avec hémocytes et billes 131
2.26 Détermination des billes phagocytées . . . 133
2.27 Capacité de phagocytose . . . 135
2.28 Représentation de la phagocytose non-spécifique envers une bactérie ou bille en latex . . . 137
2.29 billes en latex co-incubées avec des hémocytes et coloration de May-Grünwald-Giemsa . . . 138
2.30 Hémocytes, bactéries et coloration de May-Grunwald-Giemsa . . . 138
2.31 Cinétique d'activité PO de 50 μl d'hémolymphe d'une limnée adulte . . . 142
2.32 Activité PO pour des organismes témoins . . . 142

3.1 Schéma du dispositif expérimental mis en place pour les expériences en renouvellement continu présentées dans ce chapitre n ° 3 . . . 151
3.2 Sous-populations hémocytaires : exemple de l'expérience avec une fréquence de prélèvement de 24h . . . 184
3.3 Représentation des plans de coupes aléatoires des cellules pour leur observation en MET . . . 185
3.4 Aspect général des hémocytes . . . 186
3.5 Signes d'activité cellulaire intense . . . 187
3.6 Première ultrastructure abondante d'intérêt . . . 188
3.7 Deuxième ultrastructure abondante d'intérêt . . . 189

3.8 Structure tridimentionnelle des hémocytes circulants chez *L. stagnalis* . . . 190

4.1 Immunotoxicité d'un xénobiotique 195

5.1 Schéma du dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'immunotoxicité de la deltaméthrine chez *L. stagnalis* présentée ci-après 229
5.2 Parasites saprophytes (nématodes non identifiés) observés dans les feces des organismes pendant l'expérience 262

6.1 Schéma du dispositif expérimental mis en place pour l'expérience d'exposition au Cadmium présentée ci-après 266

7.1 Photographie de l'installation mise en place dans le hall expérimental, à côté de la STEP, où les expositions ont eu lieu 303
8.2 Représentation schématique du renouvellement/épuisement hémocytaire chez *L. stagnalis* selon le laps de temps entre les expulsions répétées d'hémolymphe 355
8.3 Pressions de type « spéciation » et variabilité des phénotypes immunitaires 360
8.4 tendances d'évolution des densités hémocytaires au cours des expériences . 367
8.5 Vue d'ensemble des modalités d'utilisation de *L. stagnalis* dans les *designs* expérimentaux 370
8.6 Vue d'ensemble des expériences de ce manuscrit selon une représentation schématique des degrés de pertinence environnementales 385
8.7 Représentation schématique des modulations de marqueurs d'immunocompétence dans un contexte de contamination environnementale réaliste : subtilités, compensations et *trade-offs* 392
8.8 Polluants, système immunitaire, traits de vie et spéciations (schéma modifié de Caquet et Lagadic, 1998) 393
8.9 Résistance à un pathogène selon Brousseau *et al.* [2012] 395
8.10 Vue d'ensemble des paramètres immunitaires à évaluer/développer chez *L. stagnalis* 402
8.11 Vue d'ensemble des perspectives directes d'utilisation de *L. stagnalis* en immunotoxicologie environnementale selon les objectifs des études 410

B.1 Relation entre la taille des masses et le nombre d'oeufs 415

C.1 *Lymnaea stagnalis* 416
C.2 *Lymnaea stagnalis* (32 ±2 mm, élevages, Irstea) 417
C.3 *Lymnaea stagnalis* (39±3 mm, étang de Broye, Renens, Suisse) 418
C.4 *Lymnaea stagnalis* adulte avec une hypertorsion de la coquille (anomalie) . 419
C.5 Au coeur des hémocytes... 420

D.1 Etalonnage du DCF selon la fluorescence et le gain (spectrofluorimétrie) . . 421

E.1 Hémocytes (non-triés) de *Lymnaea stagnalis* observés après une double coloration de May-Grunwald-Giemsa 424
E.2 Cytogramme des hémocytes de *L. stagnalis* avec le cytomètre FACSDiva (version 6.2) et régions utilisées pour le tri cellulaire des sous-populations . 424
E.3 Hémocytes de *L. stagnalis* triés selon les régions de la figure E.2, puis colorés au May-Grünwald-Giemsa 425

F.1 Exemples de quelques pictogrammes de produits commerciaux qui peuvent résulter de tests (éco)toxicologiques prospectifs 426
F.2 Informations (éco)toxicologiques des xénobiotiques étudiés selon la classification GHS de la réglementation REACH 427

G.1 Photo du dispositif exprérimental 430
G.2 Courbes de survie des organismes lors du premier essai d'expérimentation de longue durée avec le diclofenac 430
G.3 Courbes de survie des organismes lors du deuxième essai d'expérimentation de longue durée avec le diclofenac 431
G.4 Densité hémocytaire 431
G.5 Viabilité hémocytaire 432

H.1 Diagramme d'analyse d'un biomarqueur immunitaire en écotoxicologie . . . 433

Liste des tableaux

1 Place de l'écotoxicologie dans la gestion environnementale selon Calow [1993] 9

2.1 Paramètres des élevages 97
2.2 Réglages du cytomètre en flux 114
2.3 Réglages du cytomètre en flux 130
2.4 Post-traitement des acquisitions concernant l'analyse phagocytaire des hémocytes 134
2.5 Réglages du spectrofluorimètre pour mesurer l'activité *phenol-oxidase-like* ou activité phénol-oxydase non-spécifique 141

8.1 Récapitulatif des valeurs de marqueurs d'immunocompétence 364
8.2 Proposition de valeurs de référence pour les marqueurs d'immunocompétence étudiés 374
8.3 Récapitulatif des tendances de marqueurs d'immunocompétence lors d'expositions à des contaminants environnementaux 388
8.4 Quelques exemples de tests OCDE 389

A.1 Quelques catastrophes toxicologiques, écologiques, écotoxicologiques d'origine accidentelle (source wikipedia) 413
A.2 (suite) Quelques catastrophes toxicologiques, écologiques, écotoxicologiques d'origine accidentelle 414

D.1 équation des courbes d'étalonnage 422

Acronymes et abbréviations

AIF *Allograft-inflammatory factor*

ALIS *Aggresome-like-induced structure*

AO Activité oxydative

AOS *Anti-oxidant system*

APO *Amebocyte producing organ*

AMP *Anti-microbial peptide*

AMM Autorisation de Mise sur le Marché

BCF *Bioconcentration factor*

CAS number *Chemical Abstracts Services number*

CAT Catalase

Cd Cadmium

CD-3 *Cluster of differentiation number 3*

CI *Confidence interval*

CL50 concentration létale pour 50% des organismes

CP Cyclophosphamide

CSA Cyclosporine A

CSH Cellule souche hématopoïétique

CYP450 Cytochrome P450

DALIS *Dendritic cell aggresome-like-induced structure*

DC Diclofenac

DCE *Directive Cadre sur l'Eau*

DCF Dichlorofluorescein

DMSO Dimethylsulfoxide

DTM Deltaméthrine

E. Coli *Escherichia coli*

EC50 *half maximal effective concentration*

EC10 *effect concentration on 10% of the tested population*

e.g., du latin *exempli gracia* (« par exemple »)

ÉRÉ Evaluation du Risque Écologique

EVR Evaluation du Risque

et al. du latin *et alii* (« et autres »)

FACS *Fluorescence-activated cell sorting*

FAK *Focal-adhesion kinase*

FREP *Fibrinogen-related proteins*

FSC *Forward scattering*

GR Glutathione reductase

GST Glutathione-S-transferase

HAP Hydrocarbure aromatique polyciclique

Hc Hémocyanine

HSP *Heat shock protein*

H2DCFDA Diacétate de dichlorodihydrofluorescein

IC Intervalle de confiance

ICP-MS *Inductively-coupled Plasma Mass Spectrometry*

IDC *Immune disrupting chemical*

IDS *Internal defense system*

i.e., du latin *id est* (« c'est-à-dire »)

IgSF *Immunoglobuline superfamily*

IL *interleukine*

INRS Institut National de Recherche et de Sécurité

INTER variabilité inter-individuelle (densité hémocytaire)

INTRA variabilité intra-individuelle (densité hémocytaire)

Irstea Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

IUCN *International Union for Conservation of Nature*

LC50 *Lethal concentration for half of the population*

L-DOPA Isomère optique levrogyre 3,4-dihydroxyphénylalanine
LMEM *Linear mixed-effects model*
LOEC *Lowest observed effect concentration*
LPS Lipopolysaccharide
LTA Acide lipotéichoïque
L. stagnalis *Lymnaea stagnalis*
MAPK *Mitogen-activated protein kinases*
MDM *Molluscan defense molecule*
MET Microscopie électronique à transmission
MTT test *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test (colorimetric assay of cell metabolism)*
MRM *Multiple Reaction Monitoring)*
MXR *Multixenobiotic Resistance Protein)*
MW *Molecular weight*
NADPH Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCAM *Neural cell adhesion molecule*
NK *Natural killer*
NO *Nitric oxide*
NOEC *No Observed Effect Concentration*
NOS *Nitric oxide synthase*
NQE Norme de Qualité Environnementale
OCDE Organisation de coopération et de développement économiques
OECD *Organisation for Economic Co-operation and Development*
ONEMA Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
PAH *Polycyclic aromatic hydrocarbon*
PAMP *Pathogen-associated molecular pattern*
PCA *Protocatechuic acid*
PCR *Polymerase chain reaction*
PDGF *Platelet-derived growth factor*
PEC *Predicted Environmental concentration*
PFOS *Acide perfluorooctanesulfonique*
PI *Propidium iodide*
PKC Protéine kinase C
PMA Phorbol myristyl acetate
PMT Photomultiplicateur
PNEC *Predicted No Effect Concentration*
PNSE Plan National Santé-Environnement
PO Phénol-oxydase
ppm Partie par million
PNRPE *Programme National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens*
PRR *Pathogen-recognition receptor*
REACH *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals*
ROS *Reactive oxygen species*
RPM Rotation par minute
RNS *reactive nitrogen species*
RT-qPCR *Reverse Transcriptase quantitative Polymerase chain reaction*
SD *Standard deviation*
SDAGE Schéma directeur d'aménagements et de gestion des eaux
Se-GPx *Selenium-dependant Glutathione peroxidase*
SEM *Scanning Electron Microscopy*
SGH Système général harmonisé
SM *Supplementary data*
SNC Système nerveux central
SOCS *Suppressor of cytokine signaling*
SOD SuperOxyde dismutase
SSB *Snail Saline Buffer*
SSC *Side scattering*
STAT Signal transducer and activator of transcription
STEP Station d'épuration
SYBR dye *Synergy Brands dye*
TEM *Transmission Electron Microscopy*
TDG *Technical Guide Document*
TGF beta *Platelet-derived growth factor*
THC *Total hemocyte count*
TLR *Toll-like receptor*
TNF alpha *Tumor necrosis factor alpha*
VHSV *Viral hemorrhagic septicemia virus*
WWTP *Waste water treatment plants*

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Sommaire

Éléments historiques **2**
Écotoxicologie et gestion environnementale **7**
Pourquoi étudier *Lymnaea stagnalis* en écotoxicologie ? **14**
Pourquoi étudier le système immunitaire en écotoxicologie ? **16**

Éléments historiques et concepts

La préoccupation de l'effet des pollutions chimiques d'origine anthropique sur les écosystèmes aquatiques s'est amorcée avec des scandales sanitaires et écologiques majeurs. En 1949, la maladie de Minamata au Japon est décrite pour la première fois et elle sera réellement comprise en 1959. Cette maladie neurologique très grave fait des ravages chez les humains et dans les écosystèmes aquatiques. Elle a pour origine une intoxication au mercure via l'alimentation de poissons dans lesquels ce métal lourd s'est fortement accumulé. Le mercure provenait du déversement dans la mer de déchets d'une usine pétrochimique. Pendant cette période, une autre catastrophe sanitaire survient au Japon entre 1940 et 1960. De nombreux Japonais furent empoisonnés par du cadmium dans leur riz, avec le développement d'une maladie appelée Itai-Itai (« Aïe Aïe » en référence aux douleurs atroces provoquées). Des milliers de morts et malades sont à déplorer. Dans les années qui suivent, le livre de Rachel Carson intitulé « *Silent Spring* » [1] constitue un tournant dans la prise de conscience (éco)toxicologique de produits chimiques. Le titre fait référence au silence troublant d'un printemps où l'absence de chants d'oiseaux est attribuée la mort de ces derniers des suites d'exposition aux pesticides dans leur milieu [2]. Dans cet ouvrage, la biologiste américaine dénonce l'utilisation irraisonnée du pesticide DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et les conséquences sur la survie des oiseaux, sur la qualité des coquilles et sur les anomalies de reproduction. Les effets délétères sur les humains y sont aussi dénoncés. Ce livre contribua à interdire le pesticide aux Etats-Unis en 1972 et incita à la création de l'agence Américaine de protection de l'environnement (US EPA). Aujourd'hui le DDT est interdit partout dans le monde. En 1969, un déversement accidentel du pesticide organochloré Endosulfan contamine le Rhin sur 600 km. Des mortalités massives toucheront la

1. « Printemps silencieux »
2. « The sedge is wither'd from the lake, And no birds sing » ; « La laîche est fanée près du lac, et nul oiseau ne chante. »

faune aquatique. Une liste non exhaustive des catastrophes éco(toxico)logiques d'origine accidentelle ou conflictuelle pourrait être présentée : les pesticides du lac Erié (Canada, 1969), les dioxines de l'explosion de Seveso (Italie, 1976), la catastrophe de Love Canal (Etats-Unis, 1978), l'isocyanate de méthyle de la catastrophe de Bhopal (Inde, 1984), les marées noires des pétroliers Amoco Cadiz (1978), Exxon Valdez (1989), Erika (1999), le Naufrage du chimiquier Ievoli Sun (iles Casquets, 2000), les déversements de déchets pétrolifères à Abidjan (2006), la marée noire de la station offshore de Louisiane (2010), les dispersions radioactives des bombes Nagasaki (1945), Hiroshima (1945), « Castle Bravo » (Rongelap, 1954), les essais nucléaires en Algérie et Polynésie (1960-1996), l'accident de *Three Mile Island* (EU, 1979), Tchernobyl (URSS, 1986), les décharges de Plutonium en Oural (Russie, 1995), Fukushima (Japon, 2011), la pollution du Danube par une usine d'aluminium (2010), les boues rouges du Rio Doce à Mariana (Brésil, 2015), etc. Voir annexe A.1.

La discipline de l'Écotoxicologie prend son essor dans les années 1970 suite à la préoccupation sociétale majeure de l'impact des polluants chimiques sur l'environnement et la santé humaine. Les catastrophes ciblées précédemment questionnent — outre leur impact sanitaire/écologique immédiat — sur les possibles effets sur le long terme. En parallèle, les activités anthropiques sont également des sources de contaminations majeures dans l'environnement. Les avancées technologiques et changements sociétaux, les modes de productions et de consommations sont autant d'activités génératrices d'intrants chimiques dans les écosystèmes, en particulier aquatiques. Certains constats évidents sont amenés sur le devant de la scène internationale. Beaucoup d'avancées technico-industrielles sont incompatibles avec l'intégrité environnementale et le bien-être humain [Newman & Unger, 2003]. Peu à peu, le paradigme de la dilution (« la dilution est la solution ») est remplacé par le **paradigme du boomerang** (« ce que nous rejetons peut revenir et nous impacter »). Cela amorce une transition d'une vision anthropocentrique à une vision **écocentrique**. La santé des écosystèmes interagit avec la santé humaine [Newman & Unger, 2003]. Plusieurs Sommets de la Terre ont fortement contribué à dynamiser la nécessité des efforts à mettre en place et prioriser les enjeux environnementaux à l'échelle planétaire dans lesquels l'écotoxicologie a une place importante. Le premier fut à Stockholm en 1972. Pour la première fois, des pays du monde entier se réunissent pour établir un plan d'ac-

tion autour des questions écologiques, notamment à la suite de la maladie de Minamata fortement médiatisée. En 1982, le sommet de la Terre s'est tenu à Nairobi (Kenya) dans un contexte de guerre froide et a été un échec. Le sommet de la Terre de 1992 à Rio de Janeiro (Brésil) marque un tournant dans l'histoire internationale de l'Environnement. La participation d'une centaine de chefs d'états et de plus de 1500 ONG (organisations non gouvernementales) est le signe d'une réussite de l'évènement. En 2002, le sommet de la Terre s'est tenu à Johannesburg (Afrique du Sud) et était axé sur le développement durable. Des objectifs ont été établis et réaffirmés, notamment concernant la biodiversité, la dégradation des sols en agriculture et l'évolution de l'eau (qualité, assainissement, ressources, consommation raisonnée, etc). Le dernier sommet en date est celui de 2012, qui s'est tenu à Rio de Janeiro (Rio+20). Il est marqué par des divergences d'opinions sur « l'économie verte » et « le cadre institutionnel du développement durable ». Il a néanmoins permis d'établir certains objectifs de développement durable. Concernant spécifiquement la gestion des milieux aquatiques, un tournant apparait à l'échelle européenne en 2000 avec l'établissement de la directive cadre sur l'eau (DCE). Elle vise à reconquérir la qualité chimique, biologique et physique des rivières, des lacs, des eaux souterraines et du littoral ainsi que le bon fonctionnement écologique des milieux aquatiques associés. Un état membre qui ne respecte pas les objectifs peut alors devoir payer une amende [3].

L'Écotoxicologie peut être définie comme « l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine ainsi que de leurs mécanismes d'action et effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère » [Ramade, 2007]. Cette définition peut aujourd'hui être élargie comme une discipline « à l'interface entre l'écologie et la toxicologie, qui étudie le comportement et les effets d'agents polluants sur les écosystèmes, qu'il s'agisse d'agents d'origine artificielle ou d'agents naturels dont l'homme modifie la répartition et/ou les cycles dans les différents compartiments de la biosphère. Les objectifs de l'écotoxicologie sont la connaissance et la prévention, mais également la prévision des effets des pollutions et des risques associés » [Garric, 2009]. L'Écotoxicologie est aussi à l'interface de la biologie, la chimie, les sciences de la terre (*e.g.,* hydrologie) et la réglementation. Depuis ses débuts, l'Écotoxicologie essaie d'évaluer, comprendre et limiter les phénomènes qui induisent des perturbations écosystémiques liées aux xénobiotiques ou autres types de pressions chimiques d'origine anthropique et cela à plusieurs niveaux d'intégration biologique (molécule, cellule, orga-

3. En France, la loi sur l'eau de 2006 est issue de l'application au niveau national de la DCE

nisme, cohorte, population, métapopulation, écosystème, biosphère) et tend idéalement vers une approche spatio-temporelle de type holistique (voir fig. 1). Cela passe par l'étude du comportement chimique des polluants dans l'environnement et leurs effets sur les populations. Les outils et méthodes sont empruntés à de nombreux domaines tels que l'informatique (statistiques, modélisations, etc), la chimie (quantification de substances avec des matrices environnementales complexes), la microscopie (histologie), la biologie cellulaire (*e.g.,* cytométrie en flux) et moléculaire parmi d'autres. Les technologies dites des « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, exposomique) sont notamment en plein essor.

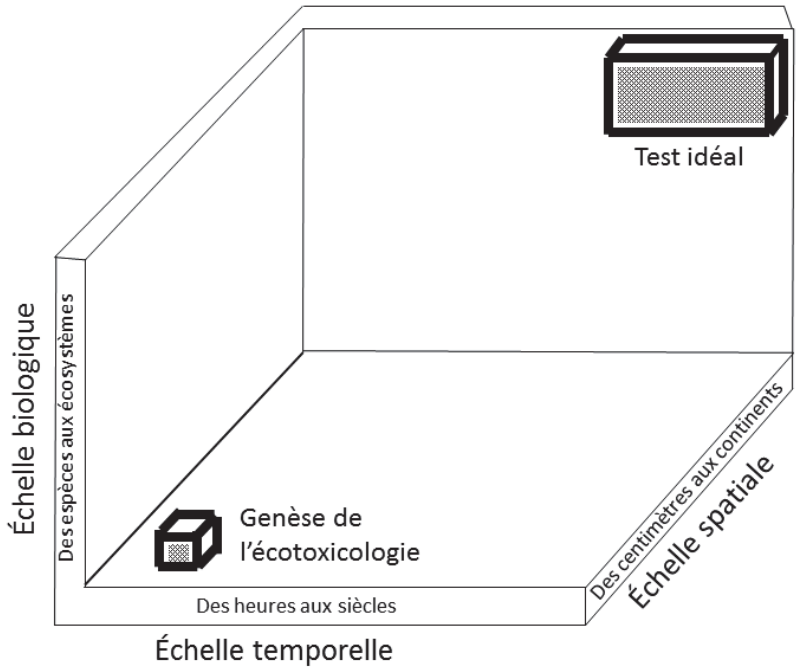


FIGURE 1 – Genèse de l'écotoxicologie et idéal holistique selon Newman & Unger [2003]

La liste de contaminants très étudiés et devenus « célèbres » en Écotoxicologie est longue : les métaux lourds ou éléments traces métalliques (*e.g.,* Mercure, Plomb, Cadmium, radionucléides), les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliquess) issus de la combustion de l'énergie fossile, les dioxines (PCDDs ou polychlorodibenzo-p-dioxines, dioxine de Seveso, etc) des incinérateurs de déchets, les PCDFs (Polychlorodibenzofurane) des activités industrielles, les CFCs (chlorofluorocarbures) de l'industrie du froid et des mousses, les PCBs (polychlorobiphéniles) de matières plastiques et transformateurs électriques, les PBBs (polybromo biphényles) des retardateurs de flammes, les PBDEs (polybromodiphényléthers) des matières plastiques ou d'extractions pétrolifères, les PFOAs (perfluorooctanoates) des poêles et imperméabilisants divers, les pesticides tels que le glyphosate, les pesticides carbamates (*e.g.,* le carbofuran), les pesticides pyréthroïdes de répulsifs pour moustiques (*e.g.,* Deltaméthrine), les pesticides organochlorés (*e.g.,* le lindane, la chlordécone, le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT), les organo-azotés (*e.g.,* l'atrazine), les phénylurées (*e.g.,* diuron), les produits de peinture antisalissure (*e.g.,* tributylétain ou TBT), les alkyl/nonylphénols des détergents, les plastiques et microplastiques, l'amiante et de possibles effets similaires avec l'arrivée de nanomatériaux de carbone en médecine ou dans des appareils composites (*e.g.,* graphène, fullerènes, nanotubes, etc) [Sanchez *et al.* , 2009; Shvedova *et al.* , 2014], les nanoparticules de produits cosmétiques (*e.g.,* TiO_2 et ZnO), les phtalates de matières plastiques, le bisphénol A des biberons et boites de conserves, les médicaments tels que le tamoxifen, la carbamazepine ou l'ethinilestradiol. De toute évidence, la liste est considérablement plus longue.

Les substances chimiques peuvent être classées selon leurs caractéristiques chimiques et propriétés de dégradation dans l'environnement (*e.g.,* substances POPs [4]), ainsi que leur devenir dans les tissus et les effets biologiques associés (*e.g.,* substances PBTs [5] ou vPvB [6]). Une grande variété d'effets toxiques résultant de l'impact de xénobiotiques a été décrite et certains de ces effets ont été médiatisés. C'est le cas, par exemple, pour de nombreuses reprotoxicités [7] qui ont été décrites, plusieurs types de neurotoxicités, d'hépatotoxicités, de perturbations endocrines (*e.g.,* hormones thyroïdiennes des oiseaux). Pour appréhender l'effet de produits chimiques sur le vivant en milieu naturel, plusieurs concepts sont empruntés de l'écologie et abordés sous un angle écotoxicologique. En particulier, les

4. polluant organique persistant
5. persistent, bioaccumulable et toxique
6. *very Persistent and very Bioaccumulative substances*
7. Stérilité, effets tératogènes, impacts sur la fécondité/fertilité, les gonades, perturbation des hormones sexuelles (*e.g.,* phénomènes d'imposex), embryotoxicité, etc.

xénobiotiques peuvent impacter la fitness des individus [8], les traits d'histoire de vie des organismes [9], les concepts de *trade-off* [10] entre certaines fonctions physiologiques, les troubles du comportement comme par exemple l'inhibition du taux d'alimentation des organismes, des preuves de génotoxicité, d'immunotoxicité ou encore des preuves de réduction de certaines populations (diminution des temps de survie) voire même extinctions d'espèces.

Écotoxicologie : Recherche, évaluation du risque et gestion environnementale

L'écotoxicologie s'inscrit dans deux démarches principales : les études **prospectives** et les études **rétrospectives** (tableau 1 p. 9). La première, aussi appelée démarche *a priori*, consiste à étudier et prédire l'impact théorique (par anticipation) de produits chimiques avant qu'ils ne soient dans l'environnement. La gestion environnementale de cette démarche peut prendre la forme d'obligations légales de réalisation de tests écotoxicologiques. C'est le cas par exemple de la réglementation Européenne REACH [11] qui concerne l'ensemble des structures au sein de l'union européenne (*e.g.,* industries, entreprises) qui produisent ou importent plus d'une tonne de substances chimiques par an. D'autres cas illustrant cette démarche d'évaluation toxicologique prospective sur l'environnement sont les réglementations d'AMM (autorisation de mise sur le marché) délivrés par l'EMA (pour les médicaments) [12] ou l'EFSA (pour les produits biocides) [13]. Ainsi, le *screening* de molécules et l'évaluation du danger/risque de substances rentrent dans cette catégorie prospec-

8. Fitness Darwinienne : Capacité d'un organisme de reproduire son génome indéfiniment dans la lignée descendante (progéniture) ce qui rend sa proportion de plus en plus représentée dans chaque génération subséquente [Kefford & Zalizniak, 2013]

9. Définition : « Un **trait d'histoire de vie** est généralement défini comme un set de stratégies évoluées, incluant les adaptations comportementales, physiologiques et anatomiques, qui influence plus ou moins directement la survie et le succès de reproduction »... « la réponse phénotypique à une variation environnementale est habituellement incluse dans la définition d'un trait d'histoire de vie ». Il existe un lien étroit entre physiologie et trait d'histoire de vie. La physiologie peut être envisagée comme le maillon entre les contraintes environnementales et les traits d'histoire de vie qui en résultent [Ricklefs & Wikelski, 2002].

10. Définition : « Un ***trade-off*** représente le coût payé en terme de ***fitness*** lorsqu'un changement bénéfique d'un trait est lié au changement délétère d'un autre » [Stearns, 1989]. Par exemple, en réponse à un toxique, des organismes peuvent mettre en place une stratégie d'augmentation de leur reproduction pour la pérennité de leur espèce mais cela aura un coût énergétique et affectera d'autres fonctions physiologiques car ils vont s'épuiser et des effets délétères pourront apparaitre à d'autres niveaux (*e.g.,* diminution de l'âge maximal ou temps de survie, diminution de la croissance, etc).

11. REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals). Il est géré par l'ECHA (*European chemical agency*).

12. EMA (European medecine agency). L'intermédiaire national en France est l'ANSM (Agence nationale de sécurité sanitaire des produits de santé)

13. EFSA (European food safety authority). L'intermédiaire national en France est l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).

tive. *In fine*, cela peut prendre la forme d'interdiction, autorisation ou restriction d'usage des substances et d'étiquetage (système CLP du GHS) [14] pour un meilleur affichage et une gestion environnementale intégrée (voir figure F.1, p. 426). Des règles de gestion de déchets de produits chimiques peuvent aussi être imposées. La deuxième démarche, dite « rétrospective » est aussi appelée une démarche « *a posteriori* ». Elle vise à étudier et comprendre les effets des produits chimiques déjà dans l'environnement. Ainsi, il s'agit plutôt de diagnostiquer et surveiller le (bon) état écologique des milieux naturels et anthropisés. Les analyses se font avec des échantillons de l'environnement (sédiments, sols, eaux, végétaux, organismes, effluents), au laboratoire ou directement *in situ* (*e.g., biomonitoring* actif et passif). En France, les Agences de l'Eau, la police de l'Eau, l'ONEMA [15] et les laboratoires de Recherche [16] font partie intégrante de cette gestion rétrospective de l'Environnement. Les démarches prospectives et rétrospectives sont complémentaires (voir figure 3, p. 12). Les mesures rétrospectives vont contribuer à la mise en place d'actions adaptées pour réduire le risque par anticipation sur l'avenir. Le fruit de ces démarches va permettre, par exemple, d'établir les valeurs réglementaires des normes de rejets d'effluents, mais aussi de la qualité des eaux de boisson ou encore la définition des NQE (normes de qualité environnementales). A l'échelle Européenne, la directive cadre sur l'Eau (DCE) est une mesure phare de la gestion des eaux. Celle-ci est ensuite traduite au niveau national par des lois correspondantes avec une obligation de respect *a minima* des exigences établies. Plusieurs lois en France régissent les gestion environnementales telles que les lois sur l'Eau (1964, 1992, 2006) et les lois Grenelles de l'environnement. Des SDAGE (schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux) sont mis en place. Des plans nationaux d'envergure sont régulièrement établis tels que le PNSE III (Plan National Santé-Environnement), le plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux de 2011, le programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens ou PNRPE depuis 2005, le plan sur les micropolluants de 2010—2013, le plan éco-phyto depuis 2008, etc.

Tous les acteurs directs et indirects de l'écotoxicologie concourent — à différents niveaux — à l'objectif commun de bonne qualité écologique des milieux (voir figure 2, p. 9).

14. Les mesures CLP (Classification, Labelling, Packaging) de gestion environnementales des produits chimiques suivent un processus d'harmonisation global GHS (Global Harmonisation System) au sein de l'union Européenne.

15. Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques

16. Par exemple, des « actions ONEMA » peuvent être confiées aux laboratoires et il existe donc une coopération intégrée.

Tableau 1 – Place de l'écotoxicologie dans la gestion environnementale selon Calow [1993]

		Législation
Anticipation	*Screening*	Classification et contrôle de produits chimiques nouveaux et existants
	Évaluation du danger/risque	
	Définition des standards de qualité environnementale	
	Consentements sur ce que définit la Toxicité	Obligations de contrôle des rejets environnementaux
Évaluation	Évaluations légales	
	Surveillance de la qualité d'effluents	Dispositions générales, réquisition gouvernementale ou ses représentants pour maintenir/améliorer la qualité de l'environnement
	Surveillance générale de l'état de l'Environnement	

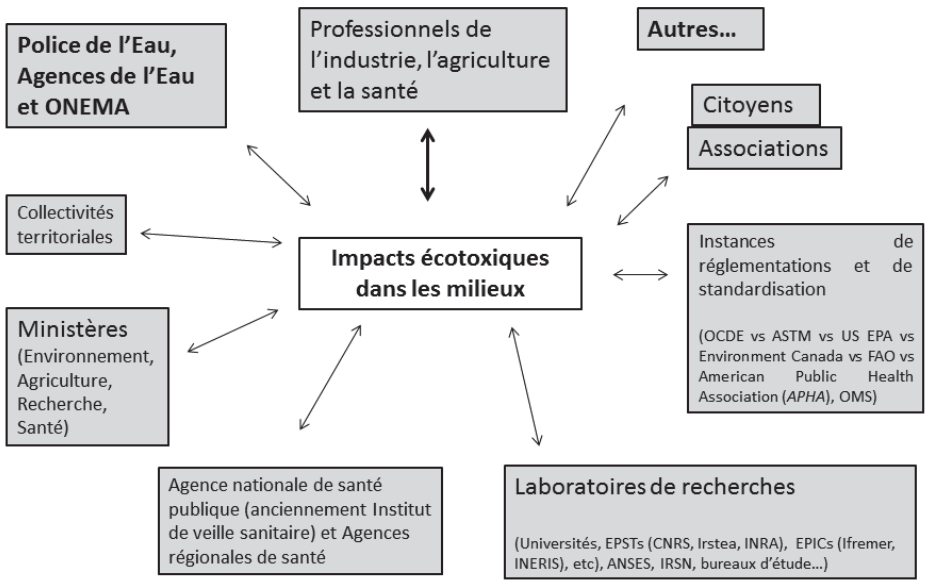


FIGURE 2 – Principales structures et personnes qui influencent directement ou indirectement l'impact écotoxique des substances chimiques dans les milieux, en France

L'évaluation du risque écologique (ÉRÉ) est un « outil d'aide à la décision dans de nombreux domaines (études d'impact des installations industrielles, gestion des sites pollués et des friches urbaines, conception des infrastructures de transport, gestion durable des aménagements urbains, ...) » [Perrodin, 2012]. Au sens strict, l'évaluation d'un risque est nécessairement prospective car elle étudie la probabilité de survenue d'une perturbation. Cela doit néanmoins être nuancé. Si l'évaluation se fait une fois que les produits chimiques sont déversés dans l'environnement, alors une évaluation du risque peut être faite pour anticiper les effets subséquents dans le temps mais celle-ci n'est pas 100 % prédictive car elle utilise des mesures dans l'environnement [17] (*e.g.,* mesures chimiques ou de biomarqueurs comme expliqué dans la figure 4, p. 13) et pour cela elle est qualifiée d'évaluation du risque rétrospective. Dans ce cas, la PEC « *predicted environmental concentration* » est affinée avec les mesures dans l'environnement et les prédictions de concentration dans le futur. Plusieurs représentations schématiques existent pour décrire la démarche et les étapes d'ÉRÉ selon le contexte (EVR [18] avant AMM avec des susbtances chimiques avec des procédures bien définies dans le TGD [19], EVR pour un site en particulier comme une usine ou un barrage avec une intégration dans une étude d'impact, etc).

17. Par exemple, des mesure chimiques ou la mesure de biomarqueurs peut être intégrée afin de déterminer l'état écologique du milieu à un instant donné
18. Evaluation du risque
19. technical guide document

Elles se basent très souvent sur trois composantes communes : (i) l'exposition prédite (PEC) [20], (ii) le danger (et les effets) (PNEC) [21] et (iii) les facteurs d'incertitudes (ou facteurs de sécurité) liées aux estimations précédentes (voir 3, 12). Plusieurs outils sont utilisés tels que des méthodes statistiques, des modélisations (*e.g.,* PBPK [22], QSARS [23]) ou l'utilisation de biomarqueurs (fig. 4, p. 13). Les ÉRÉ constituent un outil d'aide à la décision pour les gestionnaires.

Avant de proposer des batteries de tests écotoxicologiques pour les ÉRÉ ou des applications concrètes (*e.g.,* biomarqueurs) pour la surveillance et/ou l'évaluation de l'état des milieux, les laboratoires de Recherche interviennent an amont pour mieux comprendre les effets écotoxicologiques, apporter de la connaissance, développer et valider des outils (*e.g.,* biomarqueurs), définir les incertitudes et les limites, collecter des données (voir fig. 3, p. 12). C'est dans ce cadre très préliminaire que ce projet de thèse s'inscrit.

20. Predicted environmental concentration
21. Predicted No Effect Concentration
22. *physiologically-based pharmacokinetic*
23. *quantitative structure-activity relationship*

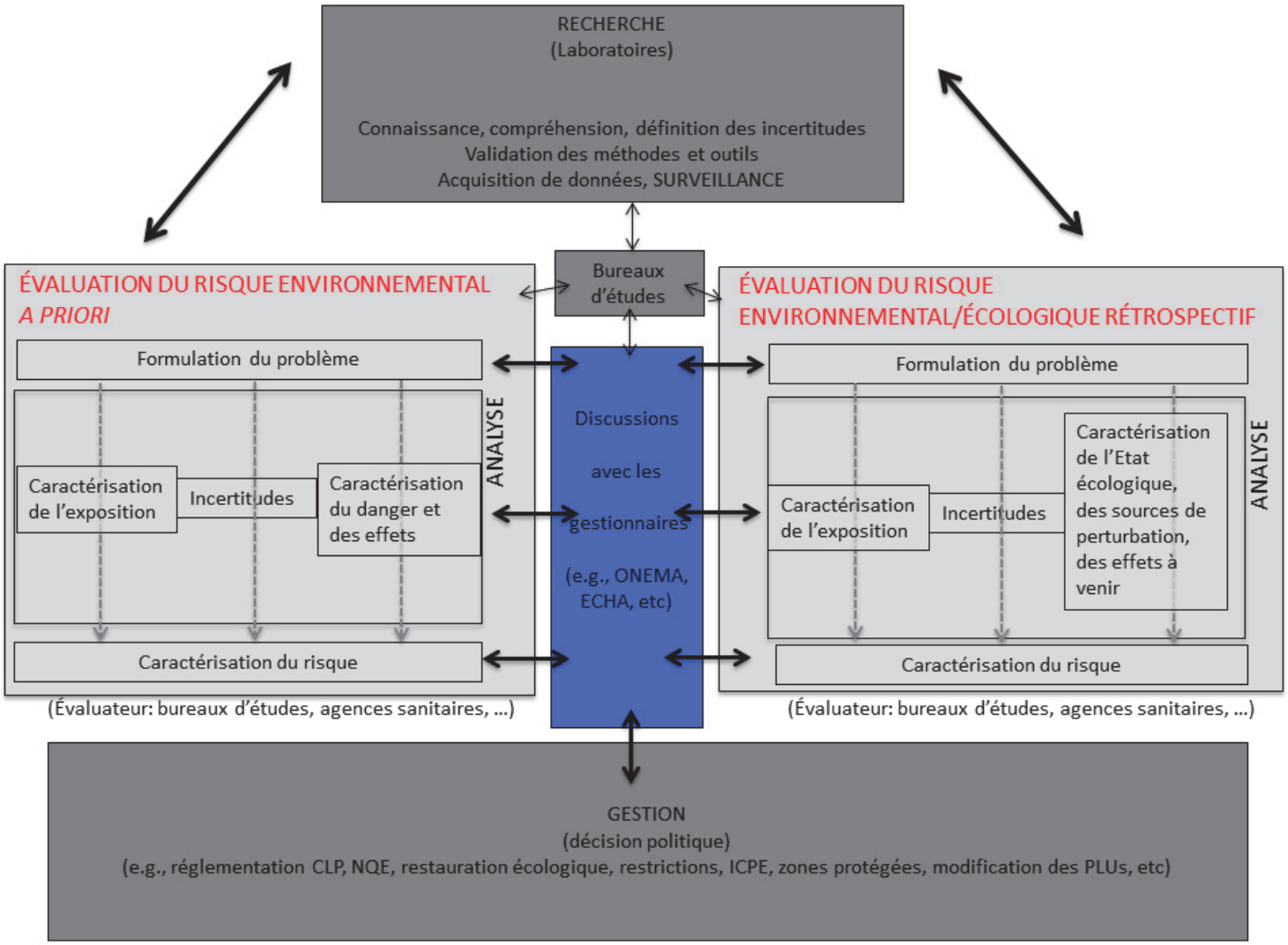


FIGURE 3 – Écotoxicologie, évaluation du risque environnemental prospectif et rétrospectif et gestion du risque (une partie du schéma est inspirée et modifiée de [US-EPA, 1995])
Acronymes : CLP (Classification, Labelling, Packaging), NQE (norme de Qualité Environnementale), ICPE (installation classée pour la protection de l'environnement), PLU (plan local d'urbanisme), ECHA (european chemical agency), ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques).

Comme le souligne Garric [2009], il est important de disposer d'outils de mesure à plusieurs niveaux d'intégration biologique et d'être capable — par exemple — de relier des effets subindividuels précoces à des effets sur l'organisme entier. A ce propos, « un point fondamental du développement et de la mise en oeuvre de biomarqueurs pour d'une part le diagnostic d'une exposition à la contamination chimique, d'autre part la prédiction d'un danger toxique pour l'individu, concerne la connaissance de ce qui est "normal" de ce qui ne l'est plus »... « et la description de la dynamique temporelle de la réponse biologique étudiée (induction, adaptation et récupération) et des conséquences qui en découleront » (voir fig. 4, p. 13).

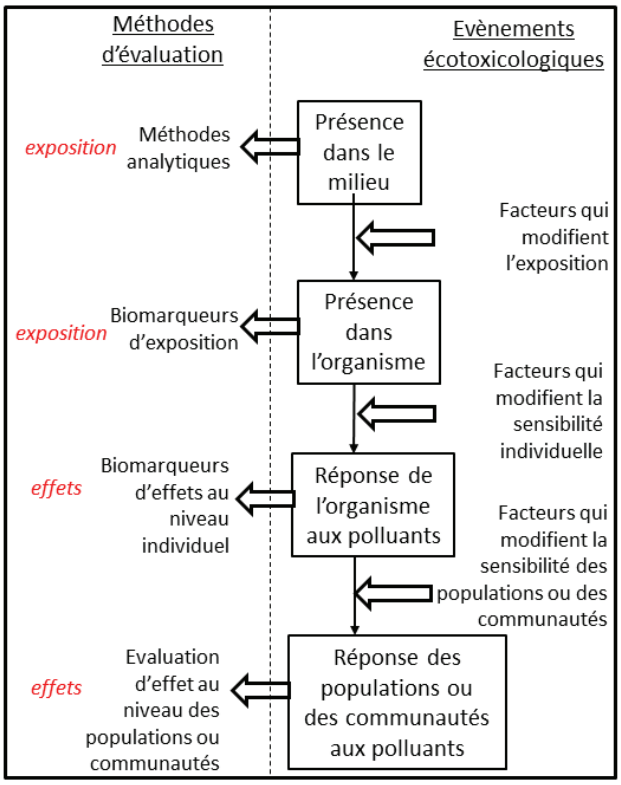


FIGURE 4 – Utilisation de biomarqueurs et changement d'échelle (évènements) écotoxicologique (schéma modifié de Lagadic *et al.* [1998])

Pourquoi étudier *Lymnaea stagnalis* en écotoxicologie ?

Plusieurs espèces sont modèles en écotoxicologie tels que *Danio rerio*, *Pimephela promelas*, *Daphnia magna* ou encore *Chironomus riparius*. Une bonne compréhension de l'impact des polluants sur le règne animal nécessite une approche multi-espèces (*e.g., species-sensitivity distribution*). En particulier, il semble écologiquement pertinent d'étudier plusieurs niveaux trophiques, plusieurs embranchements [24] du règne animal et végétal et plusieurs niveaux d'organisation biologique (cellule – tissu - organe – individu - population - métapopulation - écosystème). La figure 5 (p. 15) donne une idée approximative des proportions relatives des embranchements biologiques du règne animal repésentées dans les milieux d'eau douce (adaptées d'après Balian *et al.* [2008]). De toute évidence, cela dépendra largement des zones géographiques et types d'écosystèmes considérés. Les vertébrés (*chordata*) [25] représentent seulement 14% de l'ensemble de la biodiversité du règne animal dans ces milieux. Les invertébrés sont numériquement supérieurs (85%). L'embranchement le plus représenté est celui des arthropodes [26] avec environ 75% de la biodiversité animale. Le troisième embranchement le plus représenté est celui des mollusques qui occupe environ 4% de la biodiversité animale des milieux d'eau douce, prenant la deuxième position des invertébrés (métazoaires, non-unicellulaires). Par ailleurs, les mollusques — en particulier non-marins — font partie des animaux les plus menacés par l'extinction [27] .

24. *L. stagnalis* appartient à l'embranchement des mollusques. Les termes « **phylum** » et « **embranchement** » sont synonymes. Plus loin dans le manuscrit, le terme phylum est employé (*e.g.*, « immunotoxicité trans-phylum »).

25. Parmi les *Chordata* de ces milieux d'eau douce il y a environ 70% de poissons, 24% d'amphibiens et moins de 1% de mammifères

26. Parmi les arthropodes de ces milieux, il y a environ 80% d'insectes, 13% de crustacés et 7% d'arachnides

27. En 2002, les mollusques non marins avaient le plus grand nombre d'extinctions d'espèces documentées de tout groupe taxonomique d'animaux [Lydeard *et al.* , 2004]

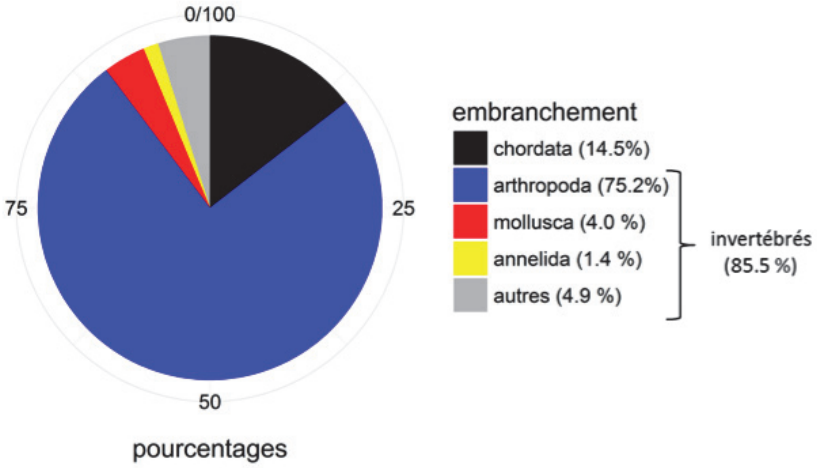


FIGURE 5 – Approximations des proportions globales des différents embranchements de la biodiversité animale des eaux douces selon [Balian *et al.* , 2008]

L. stagnalis est un mollusque d'eau douce. Il a une large distribution planétaire car il est holarctique (retrouvé dans la plupart des pays de l'hémipshère nord). Outre sa représentativité des écosystèmes aquatiques continentaux lentiques, son étude au cours de ce projet est justifiée par de nombreux autres arguments qui seront développés dans les chapitres suivants. Brièvement, cette espèce bénéficie déjà de plusieurs études scientifiques en écophysiologie, neurobiologie et parasitologie notamment. Par ailleurs, elle a déjà été étudiée en écotoxicologie avec des approches sur la survie des organismes, la reproduction (espèce modèle) et la bioaccumulation de contaminants. Enfin, le choix de cette espèce a été largement orienté en raison de certaines de ses caractéristiques immunologiques. *L. stagnalis* présente notamment l'avantage de permettre la collecte de son hémolymphe à l'échelle individuelle et de manière répétée.

Pourquoi étudier le système immunitaire en écotoxicologie ?

Les milieux naturels et anthropisés sont caractérisés par des pressions multiples (*e.g.,* chimiques et pathogènes). Le système immunitaire est le siège de la défense interne des animaux contre les menaces pathogènes. Ainsi, la compétence immunitaire, ou immunocompétence, va déterminer la vulnérabilité des organismes à contracter des maladies infectieuses. L'immunocompétence est un trait d'histoire de vie majeur pour les organismes [Wilson, 1999]. Les pressions chimiques peuvent altérer cette immunocompétence. Des effets peuvent apparaitre à l'échelle individuelle voire même au niveau des populations. Dans ce contexte, l'écotoxicologie a besoin d'outils biologiques fiables, simples et robustes afin de pouvoir diagnostiquer l'immunocompétence des organismes. La variabilité des marqueurs imputables aux méthodes, aux caractéristiques biométriques (taille, poids, stade de développement) et d'autres facteurs (*e.g.,* variabilités inter-populations, facteurs confondants, etc) rendent l'extrapolation d'effets immunotoxiques difficiles. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la variabilité des biomarqueurs qui constitue un frein important à leur utilisation à large échelle. Par ailleurs, il est bien connu qu'une altération profonde du système immunitaire (immunosuppression) se traduit souvent par une morbidité voire mortalité [Brousseau *et al.* , 1998a]. Ainsi, les marqueurs d'immunocompétence pourraient être utilisés comme biomarqueurs de santé, c'est-à-dire comme outils biologiques pour diagnostiquer l'état de santé global des organismes. En particulier chez *L. stagnalis*, les cellules immunitaires sont impliquées aussi dans d'autres fonctions physiologiques telles que le transport de nutriments et la réparation de blessures. Souvent, les altérations profondes du système immunitaire sont précédées de changements beaucoup plus subtiles de certains de ses paramètres. Ces changements peuvent être interprétés comme des signaux précoces de toxicité [Brousseau *et al.* , 1998a]. Leur subtilité peut résider dans le fait qu'ils n'impactent pas directement de manière négative l'immunocompétence des organismes (*e.g.,* hypersensibilisation, réponse inflammatoire) mais pourraient tout de même avoir *in fine* des conséquences délétères. En effet, ces pressions peuvent modifier — par exemple — l'allocation énergétique des organismes et modifier d'autres traits d'histoire de vie (survie, reproduction, alimentation) à moyen ou long terme (*trade-offs*). Il est envisageable que la réponse du système immunitaire à des contaminants soit précoce par rapport à d'autres processus physiologiques et cela que le composé ait un effet ciblé sur le système immunitaire ou une action plus globale sur l'organisme. En-

fin, certains biomarqueurs immunitaires peuvent être modulés à de faibles concentrations d'exposition de polluants, ce qui en fait potentiellement des biomarqueurs d'exposition. Toutes ces remarques justifient l'évaluation de paramètres immunitaires des organismes en écotoxicologie.

Objectifs de la thèse

L'objectif général de la thèse est de développer des marqueurs d'immunocompétence chez *Lymnaea stagnalis* et de déterminer la faisabilité de leur utilisation dans un contexte écotoxicologique. Cette thèse est divisée en deux grandes parties : (1) une première partie sans présence de toxiques qui consiste aux développements fondamentaux autour des connaissances, de l'utilisation de *L. stagnalis* et de marqueurs d'immunocompétence et (2) une deuxième partie qui consiste en l'utilisation des marqueurs d'immunocompétence dans plusieurs [28] contextes écotoxicologiques.

1. Cette thèse vise dans un premier temps à défricher tous les éléments connexes en terme d'utilisation du modèle animal (élevages, collectes sur le terrain, évaluations de reprotoxicités), de connaissances (sur l'espèce et sur l'immunotoxicologie environnementale) et de maitrise des outils (*e.g.,* cytométrie en flux). Afin de mieux déceler et décrire le danger immunotoxique des contaminants, plusieurs marqueurs d'immunocompétence devaient être développés afin de disposer d'une approche multibiomarqueurs, souvent préconisée en écotoxicologie. L'ensemble des marqueurs étant focalisé sur les hémocytes (cellules immunocompétentes de *L. stagnalis*), l'un des objectifs était de contribuer à la caractérisation de ces cellules pour deux raisons : (i) améliorer la connaissance du matériel biologique sur lequel tous les marqueurs sont développés (finalité en soi) et (ii) déterminer la faisabilité de quantifications de sous-populations hémocytaires chez *L. stagnalis* pour de futures expositions toxiques. Par ailleurs, avant de se lancer tous azimuts dans l'évaluation des marqueurs d'immunocompétence, un autre objectif préalable était de décrire les variabilités « naturelles » des marqueurs : variabilités intra-individuelles, inter-individuelles et la présence d'autres facteurs (*e.g.,* différents groupes expérimentaux) et d'utiliser des outils statistiques adaptés. Enfin, un avantage certain de l'utilisation de *L. stagnalis*

28. plusieurs populations, plusieurs contaminants, plusieurs concentrations, plusieurs temps d'exposition

est de permettre la collecte de l'hémolymphe à l'échelle individuelle et de manière répétée dans le temps. En revanche, ces prélèvements répétés peuvent affecter la survie des organismes et aussi des paramètres hémocytaires. Ainsi, un dernier objectif de cette première partie était de déterminer les modalités d'effets potentiels de cette méthode de collecte (sans toxique) en vue d'une application future dans un contexte écotoxicologique.

2. La pertinence d'utilisation de biomarqueurs sub-individuels en écotoxicologie dépend de plusieurs considérations. Un premier objectif était de déterminer la sensibilité de réponse des marqueurs d'immunocompétence développés au regard de la concentration du contaminant exposé. Un second objectif était de déterminer la rapidité de modulation/variation de ces marqueurs à l'échelle individuelle (en réponse à un contaminant), et de mettre en place les préconisations établies sur les collectes répétées de l'étude de la première partie du manuscrit. Un troisième objectif était de déterminer la précocité de modulation de ces marqueurs d'immunocompétence par rapport à des indicateurs basés sur d'autres fonctions physiologiques ou d'autres traits d'histoire de vie des organismes (*i.e.*, évaluer la précocité physiologique d'altération des marqueurs d'immunocompétence par les contaminants). Nous avons également souhaité voir s'il est possible de prévoir une immunotoxicité chez *L. stagnalis* — via cette approche multibiomarqueurs — selon le type de contaminant utilisé pour lequel des impacts immunitaires ont été décrits sur d'autres espèces, notamment des mammifères.

Les objectifs détaillés de ce travail de thèse sont listés ci-dessous, ainsi que les questions et les hypothèses associées à ces objectifs et les méthodes utilisées pour les traiter.

première partie : CARACTÉRISATIONS FONDAMENTALES ET MISE AU POINT DE L'APPROCHE MULTIBIOMARQUEUR

Objectif 1	Améliorer les connaissances générales sur *L. stagnalis* pour son utilisation au laboratoire.
Méthode	Compiler les connaissances, acquérir des données biométriques et prospecter en milieu naturel et anthropisé.

Objectif 2	Fournir (i) une vision d'ensemble des études immunitaires/immunotoxicologiques chez *L. stagnalis* et (ii) une approche multibiomarqueurs — simple et robuste — pour l'évaluation de l'immunocompétence chez *L. stagnalis*.
Méthode	Faire une revue bibliographique. Mettre au point les techniques de mesure de l'immunocompétence de marqueurs fonctionnels et non-fonctionnels. Utiliser la spectrofluorimétrie et cytométrie en flux. Utiliser un inducteur de la réponse immunitaire.

Objectif 3	Déterminer si le facteur « prélèvement de l'hémolymphe » est problématique pour utiliser le modèle *L. stagnalis* en immunotoxicologie environnementale lorsque plusieurs prélèvements sont réalisés par individu au cours du temps.
Question	Sommes-nous sûr que le **prélèvement répété** de l'hémolymphe par stimulation mécanique de son réflexe de rétraction n'est pas invasif ?
Hypothèse	Cela dépend de la « **fréquence de prélèvement** ». À une fréquence de prélèvement élevée, la survie et certaines caractéristiques des hémocytes peuvent être affectées.
Méthode	Étudier plusieurs fréquences de prélèvements et évaluer des paramètres fonctionnels et non fonctionnels hémocytaires (sans contamination chimique).

Objectif 4	Apporter des éléments de compréhension complémentaires concernant la variabilité des paramètres hémocytaires chez *L. stagnalis* : par individu (dans le temps, variabilité intra-individuelle), entre individus (variabilité inter-individuelle) et entre populations ou expériences.
Question	Quel facteur est prépondérant dans la variabilité hémocytaire des hémocytes ?
Hypothèse	La variabilité est fortement influencée par les individus et moins par le temps (*i.e.*, la variabilité inter-individuelle est plus élevée que la variabilité intra-individuelle). Par ailleurs, différentes populations ont des valeurs de paramètres hémocytaires assez différentes les unes des autres ce qui constitue une forte contrainte pour une approche de *biomonitoring in situ*.
Méthode	Réaliser une évaluation individuelle et répétée dans le temps de marqueurs d'immunocompétence sur plusieurs populations. Utiliser des outils statistiques adaptés (« non-classiques ») pour intégrer l'ensemble des facteurs qui peuvent influer sur la variabilité.

Objectif 5	Clarifier et apporter des éléments complémentaires de connaissance sur la structure des hémocytes chez *L. stagnalis*. Apporter des éléments de réflexion concernant la pertinence de l'utilisation d'approche structurelle des hémocytes chez *L. stagnalis* dans un contexte écotoxicologique.
Question	Les différences structurelles entre hémocytes sont-elles suffisantes chez *L. stagnalis* pour envisager une quantification des populations/sous-populations hémocytaires ?
Hypothèses	Certains auteurs parlent de hyalinocytes et de granulocytes. Cela révèle une grande différence structurelle qui peut être quantifiée en cytométrie de flux et semi-quantifiée en histologie. Par ailleurs, nous ne connaissons pas suffisamment l'ultrastructure des hémocytes chez *L. stagnalis*.
Méthode	Analyser les groupes (*i.e.*, *clusters*) en cytométrie de flux des aspects hémocytaires taille-structure. Réaliser des analyses histologiques des hémocytes : colorations classiques (éosinophiles-acidophiles-neutrophiles) et microscopie électronique à transmission et balayage.

deuxième partie : IMMUNOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

Objectif 6	Déterminer si l'approche multibiomarqueurs d'immunocompétence mise en place permet de rendre compte d'une perturbation d'origine chimique dans un contexte environnemental réaliste.
Question	Quelle **sensibilité** les marqueurs d'immunocompétence présentent-ils face à des contaminants ? (concentrations environnementales *vs* concentrations non réalistes)
Hypothèse	L'exposition à des contaminants à des concentrations réalistes de l'environnement impactent les marqueurs d'immunocompétence étudiés chez *L. stagnalis* mais cela est subtil [29]. Une multicontamination à des concentrations environnementales va perturber ces marqueurs d'immunocompétence de manière plus marquée. L'exposition d'un contaminant à de fortes concentrations (qui ne sont pas représentatives de la réalité environnementale) va impacter plus fortement ces marqueurs d'immunocompétence et mener à des immunosuppressions.
Méthode	Utiliser l'approche multibiomarqueurs mise en place lors d'expositions à court et moyen-long terme à des contaminants environnementaux et à des concentrations environnementales et beaucoup plus élevées. Réaliser une exposition à des effluents de station d'épuration (multicontamination réaliste de l'environnement).

Objectif 7	Déterminer l'importance du temps d'exposition à un contaminant pour observer des modulations de marqueurs d'immunocompétence chez *L. stagnalis*.
Question	Existe-t-il une **rapidité** [30]de réponse des marqueurs d'immunocompétence à une pollution chimique ?
Hypothèse	Des expositions courtes permettent d'observer des immunoréponses (faibles *vs* fortes concentrations). Sur le moyen-terme, ces immunoréponses sont plus fortement marquées (*e.g.,* immunosuppressions).
Méthode	Faire des expositions de courtes et moyennes durées avec plusieurs temps de mesure des paramètres immunitaires par individu.

29. Un effet est considéré subtil lorsque la statistique inférentielle ne permet pas de conclure à un effet significatif mais donne des résultats de significativité qui sont dans la zone « grise » de la limite du seuil de significativité. Dans ce manuscrit, cela correspond à des effets avec une valeur de t comprise entre |1.6—1.99| lors de l'utilisation des modèles linéaires à effets mixtes correspondants (explications plus loin dans le manuscrit).

30. Cette notion renvoie au temps de réponse de l'immunomarqueur à partir du début de l'exposition et présente des similitudes avec la « précocité physiologique » de la question (9) ci-après. En revanche, il peut exister une précocité physiologique d'altération des immunomarqueurs (*i.e.*, effets immunitaires avant effets sur d'autres fonctions physiologique) mais si ces effets surviennent tard, alors la rapidité de réponse sera faible. Inversement, il peut être envisagé un cas de figure avec une rapidité de réponse (*e.g.,* dans les 3 jours qui suivent une exposition) mais pas de précocité physiologique si dès le premier jour apparaissent des altérations à d'autres niveaux physiologiques (*e.g.,* motricité, contraction musculaire, respiration, alimentation, etc).

Objectif 8	Apporter des éléments de réflexion et de connaissance sur l'**immunotoxicité (spécifique)** entre phylums de contaminants environnementaux chez *L. stagnalis*.
Question	Est-il possible de prédire chez *L. stagnalis* une immunotoxicité spécifique d'un contaminant pour lequel de nombreuses preuves d'immunotoxicité existent chez d'autres espèces du phylum des *chordata* (*e.g.,* humains, rongeurs, poissons) ?
Méthode	Etudier des produits pharmaceutiques (*e.g.,* anticancéreux, anti-inflammatoire, anti-rejet de greffes) spécifiquement conçus pour provoquer des effets immunomodulateurs/immunotoxiques/immunosuppresseurs chez l'humain et/ou les rongeurs. Etudier un pesticide pour lequel des effets immunotoxiques ont été observés sur plusieurs vertébrés.

Objectif 9	Mieux comprendre l'occurrence précoce de perturbations immunitaires d'origine xénobiotique par rapport à celles d'autres fonctions physiologiques ou traits d'histoire de vie. En d'autres termes, vérifier s'il est fréquent de voir apparaitre une altération de traits immunitaires (par des contaminants) avant une altération sur d'autres traits d'histoire de vie.
Question	Existe-t-il une **précocité physiologique** [31] de perturbation des marqueurs d'immunocompétence dans un contexte de contamination chimique ?
Hypothèse	L'altération des marqueurs d'immunocompétence prend place avant que n'apparaissent des effets induits par la contamination chimique sur d'autres traits d'histoire de vie (reproduction, survie, alimentation).
Méthode	Faire des expositions de longue durée à des contaminants environnementaux, évaluer les marqueurs d'immunocompétence par individu dans le temps et mesurer d'autres traits d'histoire de vie. Etudier l'immunotoxicité d'un contaminant environnemental qui a un large spectre toxique et n'est pas spécifiquement toxique pour le système immunitaire (*e.g.,* le cadmium est aussi largement reprotoxique).

Première partie

CARACTÉRISATIONS FONDAMENTALES ET MISE AU POINT DE L'APPROCHE MULTIBIOMARQUEURS

Chapitre 1

État de l'art

Sommaire

1.1 Écologie et répartition de *Lymnaea stagnalis* 26

1.1.1 Succès évolutif 26

1.1.2 Classification et appellations 27

1.1.3 Alimentation 30

1.1.4 Prédation 30

1.1.5 Répartition 31

1.2 Biologie de *L. stagnalis* 33

1.2.1 Système nerveux 33

1.2.2 Croissance 34

1.2.3 Reproduction 36

1.2.4 Système circulatoire 39

1.2.5 Hémolymphe 39

1.2.6 Respiration 41

1.2.7 Hémocyanine 41

1.3 Système de défense interne chez *L. stagnalis* 42

1.3.1 Réponse immunitaire humorale 42

1.3.2 Réponse immunitaire cellulaire 44

1.3.3 Parasites 53

1.4 Article 1 : Vue d'ensemble des immunomarqueurs en immunotoxicologie environnementale avec un regard particulier sur *L. stagnalis* 58

1.1 Écologie et répartition de *Lymnaea stagnalis*

1.1.1 Succès évolutif

Les plus anciennes preuves de présence d'espèces ressemblant à des mollusques univalves correspondent aux fossiles *Kimberella* datés du Précambrien d'il y a environ 555 millions d'années [Fedonkin & Waggoner, 1997]. Ils seraient apparus dans les milieux marins. L'apparation des premiers gastéropodes est débattue. Les plus anciens specimens connnus sont les fossiles des groupes *Chippewaella* et *Strepsodiscus* (« *fossil snail-like molluscs* ») apparus dans les milieux marins à la fin de l'explosion Cambrienne (490 MA) [Wagner, 2002; Frỳda *et al.* , 2008]. Les radiations évolutives des gastéropodes se sont opérées dans les milieux marins, milieux d'eau douce et milieux terrestres. Les gastéropodes sont les seuls mollusques qui ont colonisé le milieu terrestre avec succès [Zapata *et al.* , 2014]. Des incertitudes existent quant à la transition macro-évolutive entre les milieux aquatiques et terrestres de l'ordre des *Pulmonata*, c'est-à-dire des gastéropodes qui possèdent des structures s'apparentant à des poumons. Les plus anciens fossiles de gastéropodes pulmonés sont datés du Carbonifère (300 MA) et correspondent au sous-ordre des *Stylommatophora* qui sont des organismes exclusivement terrestres. Cela suggère que les premiers gastéropodes pulmonés étaient terrestres et que certains d'entre eux auraient ensuite colonisé les milieux aquatiques. Cependant, la qualité des fossiles venant à l'appui de cette hypothèse reste un sujet de controverse [Dayrat *et al.* , 2011]. Aujourd'hui, les *Pulmonata* d'eau douce sont représentés par le sous-ordre des *Basommathophora* dont les trois familles principales sont : les *Physidae*, les *Planorbidae* et les *Lymnaeidae*.

1.1.2 Classification et appellations

L'espèce *Lymnaea stagnalis* appartient au phylum (ou embranchement) des **mollusques** et à la classe des **gastéropodes** car elle possède une coquille univalve caractéristique. Cependant, le fait de ne pas avoir de coquille n'est pas un critère rédhibitoire (*e.g.*, les limaces). Plus précisément, elle appartient à l'ordre des ***Pulmonata*** car elle possède des poumons et au sous-ordre ***Basommatophora*** car ses yeux se situent à la base de ses tentacules et c'est une espèce aquatique (voir la classification de la fig. 1.1 p. 28). Ces gastéropodes font partie de la super-famille des ***Lymnaeoidea*** car leur coquille est spiralée et ils vivent en milieu d'eau douce (*e.g.*, les planorbes font aussi partie de la super-famille *Lymnaeoidea*, mais pas de la famille *Lymnaeidea*). *Lymnaea stagnalis* appartient à la famille des ***Lymnaeidea*** car sa coquille est enroulée dans un plan non-horizontal (*i.e.*, torsion de la coquille) — contrairement aux planorbes qui ont un enroulement dans un plan horizontal — avec une ouverture dextre (voir détails sur la reconnaissance exacte de l'espèce avec les fig. 2.1 p. 94, fig. 2.2 p. 95 et fig. 2.3 p. 96). La classification binomiale *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) vient du fait que cette espèce se retrouve particulièrement dans les milieux stagnants (au sens large, les milieux lentiques). Dans le langage courant, les espèces de la famille *Lymnaeidea* sont appellées « **limnées** » et *Lymnaea stagnalis* en est l'espèce la plus connue. Familièrement, les gastéropodes peuvent être appelés « escargots ». En français cela vaut davantage pour les gastéropodes terrestres. En anglais, *Lymnaea stagnalis* est appelée « ***The great pond snail*** » ce qui rend plus légitime de parler d'escargot pour désigner *Lymnaea stagnalis*. En français, il est aussi courant de l'appeler « **La grande limnée** » ou la « Limnée des étangs ». Notons que la **limnologie** est la science des eaux continentales, la **conchyliologie**[1] est la science qui étudie les mollusques à coquilles et la **malacologie** est la science qui étudie les mollusques.

1. L'étymologie latine *conchæ* signifie « coquillage ».

Classification	
Règne	Animal
Classe	*Gastropoda*
Ordre	*Pulmonata*
Sous-ordre	*Basommatophora*
Super-famille	*Lymnaeoidea*
Famille	*Lymnaeidae*
Genre	*Lymnaea*

Nom binomial
Lymnaea stagnalis
(Linnaeus, 1758)



FIGURE 1.1 – Classification de *Lymnaea stagnalis*

Habitat et écologie de *L. stagnalis* De nos jours, les mollusques constituent le deuxième phylum le plus représenté numériquement parmi les invertébrés (≈ 8% des métazoaires, juste derrière les arthropodes qui à eux seuls en représentent environ 75%). Le rôle des mollusques dulcicoles peut être prépondérant dans certains écosystèmes stagnants (mares, étangs), lacustres (lacs) et potamiques (cours d'eau de plaine ou rivière large à courant lent). En effet, ils peuvent représenter plus de 80% de la biomasse totale des macroinvertébrés benthiques [Mouthon, 1982]. *L. stagnalis* est une espèce **dulçaquicole** ou **dulcicole** c'est-à-dire qui vit en eau douce. Plus précisément elle se trouve dans les **milieux lentiques** c'est-à-dire ayant un faible débit d'eau. Ainsi, cette espèce affectionne particulièrement les milieux stagnants, lacustres et potamiques. Elle peut vivre en rivière à des endroits où le débit est faible au bord des rives. *L. stagnalis* est omnivore et a une grande diversité de sources de nourriture. Elle contribue fortement aux réseaux trophiques [Doi *et al.* , 2010] de ces milieux (voir paragraphe prédateurs et alimentation). *L. stagnalis* constitue une part importante des ressources alimentaires d'organismes aquatiques (sangsues, écrevisses, poissons) et terrestres (oiseaux, mammifères). Par ailleurs, elle sert d'hôte intermédiaire pour de nombreux trématodes parasites [Doi *et al.* , 2010; Mouthon, 1982; Van der Knaap *et al.* , 1987]. Elle n'est pas strictement benthique ni strictement pélagique

car elle vit dans ces deux zones. Elle pourrait être considérée **hypobenthique** dans la mesure où elle peut vivre au fond de son biotope, sur les sédiments, pierres ou graviers, mais aussi dans les macrophytes aquatiques (surtout pendant l'estivation). Elle remonte régulièrement à la surface de l'eau pour respirer et habite des endroits peu profonds. *L. stagnalis* peut survivre à un assèchement temporaire de son milieu. Classiquement, elle s'enfonce dans la vase et sécrète un ou plusieurs épiphragmes (cloisons temporaires fermant l'ouverture de la coquille). En milieu naturel, *L. stagnalis* a généralement un **cycle de vie intermédiaire entre annuel et bisannuel**. En effet, son cycle de ponte est annuel mais son cycle de vie n'est pas exclusivement annuel car elle peut vivre jusqu'à 2 ans voire plus.

Ainsi, le plus souvent, elle peut pondre plusieurs fois au cours d'une vie et ne peut donc pas être classée comme strictement annuelle mais comme ayant un cycle intermédiaire [Mouthon, 1982] (voir figure 1.2, 30). Cependant, dans certains milieux particulièrement favorables à la croissance, *L. stagnalis* a une durée de vie d'une seule année et présente donc un cycle annuel classique. Elle a une forte **plasticité adaptative** selon les conditions environnementales, en particulier la température et les conditions trophiques. Elle adopte une stratégie selon les conditions afin de maximiser la pérennité de la population. Ainsi, une productivité importante pourra faire suite à un hiver rigoureux et un cycle annuel pourra permettre de ne pas rentrer en compétition avec la nouvelle génération. Elle passe l'hiver à l'état de vie ralentie.

Les limnées pondent à la belle saison (printemps ou été selon la population) et certaines meurent peu après. Les œufs se développent, éclosent et une nouvelle génération se développe jusqu'à l'automne pour l'**hibernation**. Ensuite, cette nouvelle génération va pondre, mourir ou vivre jusqu'à l'année suivante et le cycle continue avec les nouveaux œufs. Ainsi, il n'y a pas nécessairement un remplacement d'une génération par une autre. Par ailleurs, la période de ponte peut varier d'une population à une autre. Deux types de populations peuvent être distinguées selon que la période de ponte soit en été (juillet-août) ou au printemps (mai-juin). Ainsi, pour une même espèce, des populations vivant dans deux écosytèmes différents pourront avoir une période de ponte différente [Mouthon, 1982]. Les causes de ces variations sont multiples et mal connues (génétiques, températures, conditions trophiques). En milieu naturel, *L. stagnalis* atteint la maturité sexuelle à la fin de la première année. Notons qu'en laboratoire, celle-ci est atteinte au

bout d'environ trois mois. Par ailleurs, en laboratoire *L. stagnalis* se reproduit de manière continue lorsque la température est à 20 ° C, la photopériode a un cycle journalier de 16h/8h (luminosité/obscurité) et l'alimentation est *ad libitum*.

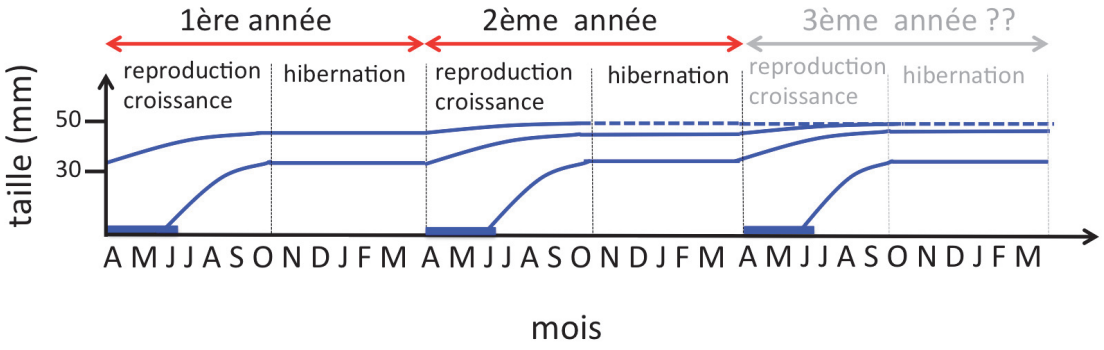


FIGURE 1.2 – Représentation schématique du cycle de vie de *Lymnaea stagnalis* en milieu naturel

1.1.3 Alimentation

Les limnées sont des organismes dits « râcleurs ». Elles possèdent une mâchoire et une radula qui est une sorte de langue munie de dents chitineuses. Les limnées sont des organismes à régime **omnivore**. Elles se nourrissent de tout ce qui flotte à la surface de l'eau, mais aussi de détritus en décomposition au fond de leur habitat, de bactéries, protistes, rotifères, charognes, carcasses d'autres gastéropodes, insectes, exuvies, d'œufs d'amphibiens ou de leurs propres œufs. Elles peuvent aussi devenir cannibales en cas de nécessité. Il a été observé que le bol alimentaire de certaines populations contient une fraction importante de matière organique d'origine animale pendant la saison chaude [Mouthon, 1982]. Elles se nourrissent aussi beaucoup d'algues (microalgues + macroalgues + phytoplancton), de périphyton et de macrophytes (élodées, *Lemna menor*, etc.). Une étude isotopique (carbone et azote) chez *L. stagnalis* suggère qu'il existe une très forte diversité intrapopulationnelle de source de nourriture. Il semble que cette diversité de nourriture est largement influencée par l'hétérogénéité de leur microhabitat plutôt que par des facteurs génétiques [Doi *et al.* , 2010].

1.1.4 Prédation

Une multitude d'animaux est susceptible de se nourrir de *L. stagnalis*. La prédation dépendra évidemment de leur habitat et microhabitat mais aussi de leur **stade de vie**.

Parmi les vertébrés, plusieurs **mammifères** sont prédateurs tels que les rats d'eau et autres rongeurs, les loutres et les blaireaux. Plusieurs **oiseaux** aquatiques (canards, hérons, mouettes, poules d'eau et cincles) se nourrissent régulièrement de mollusques dulcicoles. Parmi les vertébrés strictement aquatiques, beaucoup de prédateurs sont des **poissons** : truite, chabot, ombre, saumon de fontaine, corégone, vairon, anguille, goujon, gardon, brème, carpe, *black bass* (perche truitée). Quelques amphibiens peuvent aussi être prédateurs. De nombreux invertébrés sont aussi prédateurs de *L. stagnalis*, parmi lesquels certains **arthropodes** (écrevisses, imagos et larves d'insectes de coléoptères (*Dytiscidae*, *Hydrophilidae*)) ; des annélides (planaires (*Dugesia*, *Polycelis*), des **sangsues** (*Glossiphonia*, *Helobdella*, *Trocheta*). Les œufs et embryons sont aussi sujets à prédation par des invertébrés tels qu'odonates, hémiptères, trichoptères er rotifères [Mouthon, 1982].

1.1.5 Répartition

Nonobstant quelques déclins localisés, *Lymnaea stagnalis* est classée comme « stable » par l'IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) en ce qui concerne sa tendance d'évolution populationnelle dans le monde à ce jour. Cependant, il n'existe pas d'étude quantitative à large échelle sur le suivi de ses populations pour appuyer ceci. À ce jour, *Lymnaea stagnalis* est classée comme « *Least concern* » par l'IUCN et n'est donc pas inscrite sur la liste rouge des espèces à protéger. Sa distribution géographique est globalement **holarctique** (*i.e.*, hémisphère nord). Plus en détails, une première approximation de sa répartition est résumée dans la figure 1.3 p. 32. Elle est très présente sur l'ensemble du continent européen et en amérique du nord [2].

2. **http://www.iucnredlist.org/details/summary/155475/0**

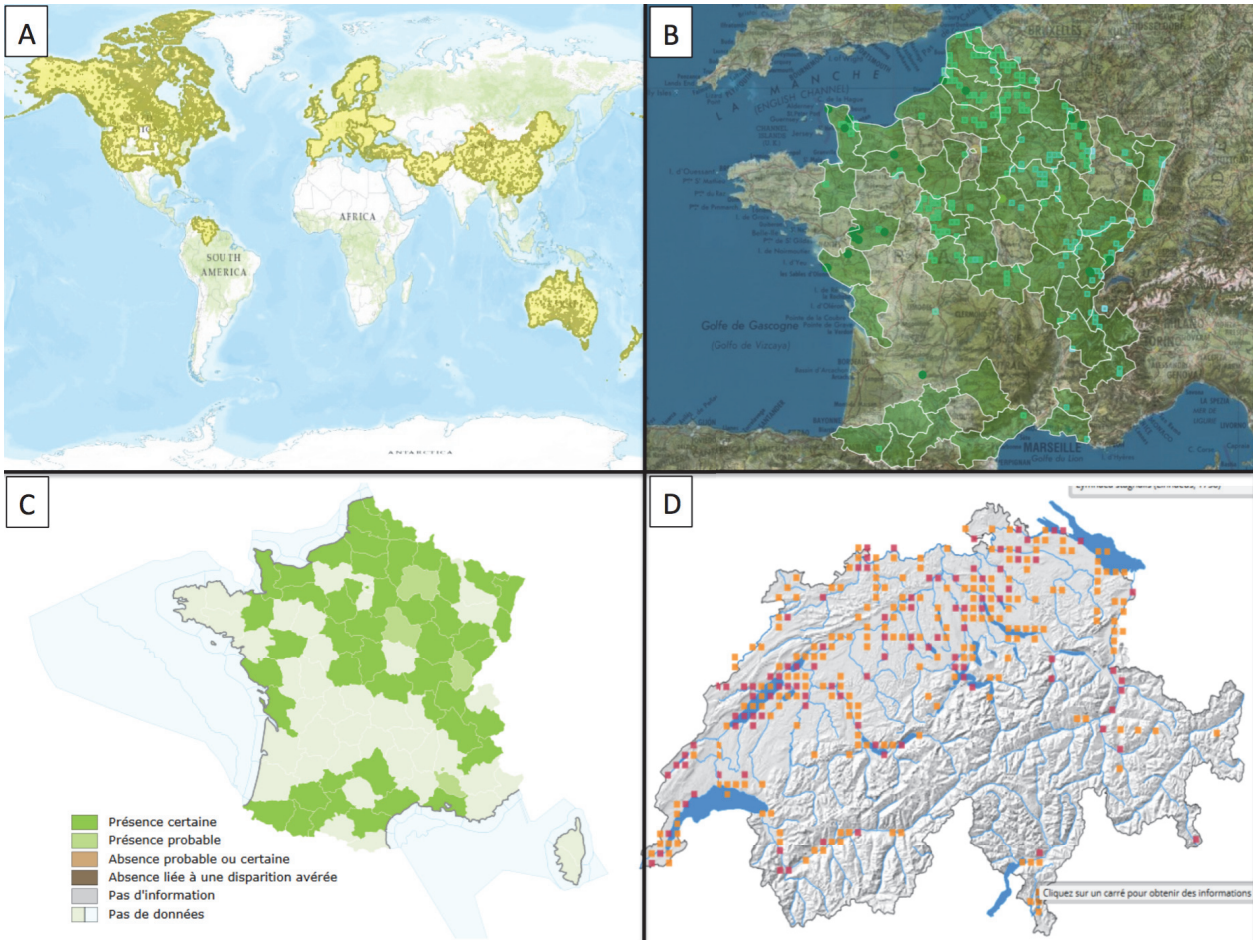


FIGURE 1.3 – Distribution géographique de *Lymnaea stagnalis*

La figure 1.3A correspond à la distribution de *L. stagnalis* dans le monde et a été collectée depuis le site internet :
http://www.iucnredlist.org/details/summary/155475/0

La figure 1.3B correspond à la distribution de *L. stagnalis* en France et a été collectée depuis le site internet :
https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/64063

La figure 1.3C correspond à la distribution de *L. stagnalis* en France et a été collectée depuis le site internet :
https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/64063

La figure 1.3D correspond à la distribution de *L. stagnalis* en Suisse et a été collectée depuis le site internet :
http://lepus.unine.ch/carto/index.php?nuesp=8028&rivieres=on&lacs=on&hillsh=on&year=2000

1.2 Biologie de *L. stagnalis*

1.2.1 Système nerveux

Les gastéropodes sont de bons modèles d'études en neurobiologie. Dans son livre rétrospectif passionnant, le professeur Kandel [2007] explique ses études sur un autre modèle de gastéropode aquatique — *Aplysia Californica* (lièvre de mer) — qui lui ont valu le prix nobel de Médecine et Physiologie en 2000 pour ses découvertes sur les processus qui régissent la mémoire et les réflexes de rétraction conditionnés. *L. stagnalis* est aussi une espèce modèle en neurobiologie, les comparaisons avec *A. Californica* sont fréquentes et le nombre d'études qui lui sont dédiées dans le domaine témoigne de sa pertinence. Le transcriptome du SNC (système nerveux central) de *L. stagnalis* a été séquencé et analysé [Sadamoto *et al.* , 2012; Feng *et al.* , 2009]. Le transcriptome complet du plus jeune stade embryonnaire (1 — 2 cellules) a aussi été séquencé [Liu *et al.* , 2014]. *L. stagnalis* possède un système nerveux central (SNC) « relativement simple ». Ses neurones ont une couleur spectaculairement orange brillante. Son SNC se compose d'environ 20 000 neurones distribués en 9 ganglions relais plus 2 autres un peu plus éloignés sous la cavité buccale. Ils sont pour la plupart très larges (environ 100 μm) ce qui facilite les dissections et analyses électrophysiologiques. Cela a permis d'étudier les réseaux et/ou fonctionnements neuronaux mis en jeu dans de nombreux comportements de *L. stagnalis* : **réflexe de rétraction** [Ferguson & Benjamin, 1991a,b], phénomènes de **mémorisation** et réflexes conditionnés [Ito *et al.* , 1999; Kojima *et al.* , 1996; Hatakeyama *et al.* , 2004; Wagatsuma *et al.* , 2004; Ito *et al.* , 2013], **respiration** [Syed *et al.* , 1991], **alimentation** [Nakamura *et al.* , 1999; Vehovszky *et al.* , 2005], **reproduction** [Koene, 2010; De Boer *et al.* , 1997], **locomotion** [Syed & Winlow, 1989, 1991; Winlow & Haydon, 1986; Longley & Peterman, 2013; Dyakonova *et al.* , 2015], **battements cardiaques** [Kerkhoven *et al.* , 1991; Syed & Winlow, 1991; Brezden *et al.* , 1991], réponse à la **prédation** [Orr *et al.* , 2007], tolérance aux conditions **hypoxiques** ou anoxiques [Silverman-Gavrila *et al.* , 2009; Janse *et al.* , 1985; Buck *et al.* , 2017], etc. L'ouverture de leur pneumostome pour respirer à la surface de l'eau via leurs poumons est déclenchée par un stimuli chemosensoriel (chemorécepteurs) en réponse à une hypoxie du milieu. *L. stagnalis* se déplace par **chimiotactisme** et surtout par **phototactisme**. Chacun de leurs deux tentacules possède un œil à sa base [3]. L'image possiblement formée sous l'eau sur leur rétine a été étudiée [Gál *et al.* , 2004]. Outre

3. d'où l'appellation du sous-ordre *Basommatophora* pour les escargots aquatiques

leurs yeux, ils possèdent aussi des photorécepteurs dermiques (non-oculaires) [Takigami *et al.* , 2014; Pankey *et al.* , 2010]. Leurs yeux, conjointement à leurs photorécepteurs et chemorécepteurs dermiques, leur permettent de s'orienter (**tropotaxie**) [Benjamin, 2008]. *L. stagnalis* sécrète un mucus, ce qui lui permet d'adhérer sur son substrat et de glisser dessus. L'action complémentaire des cellules musculaires **ciliées** et de leur pied lui permet de se mouvoir. Les ondes contractiles de la musculature du **pied** fournit environ 80% de la vitesse de glissement [Pavlova, 2010]. Les zones périphériques sont riches en mécanorécepteurs et photorécepteurs. Le réflexe de rétraction est un réflexe rapide de défense qui peut être induit par stimuli lumineux ou mécanique. Les deux types de stimulation provoquent la contraction du muscle **columelle** et du muscle **dorsal longitudinal** [Ferguson & Benjamin, 1991a,b]. Les motoneurones impliqués dans la contraction simultanée des deux muscles se répartissent dans un vaste réseau avec l'ensemble des 9 ganglions. Cette contraction globale de l'organisme induit l'expulsion immédiate du liquide circulatoire hémolymphatique.

1.2.2 Croissance

Ce sont des organismes **ectothermes**. Les températures physiologiques de *L. stagnalis* vont de 1 à 28 ° C. Cependant, ils peuvent survivre à des températures extrêmes proches de 0 ° C (hiver) [Karanova & Gakhova, 2007] et jusqu'à au moins 30 ° C [Seppälä & Jokela, 2011] (possibles pics de températures des mares en été), voire 35 ° C [Harrison, 1978] et possiblement quelques heures à 40 ° C [Boon-Niermeijer *et al.* , 1986]. La température et les conditions trophiques vont influencer fortement le métabolisme et donc la croissance qui sera plus forte au printemps-été qu'en automne-hiver. La coquille commence à se former pendant le développement embryonnaire par invagination de l'ectoderme. Cette invagination aboutit à la formation d'une glande qui constituera *in fine* un organe (*shell-secreting organ*), le manteau, qui contient les cellules minéralisantes [Hohagen & Jackson, 2013]. L'édification de la coquille chez les mollusques est en effet le résultat d'une biominéralisation complexe riche en carbonate de calcium [Marie, 2008]. La croissance est continue au cours de la vie mais n'est pas uniforme et suit une courbe de type sigmoïdale. Les longueurs de coquille maximales sont d'environ 5 cm, ce qui est rare. La plupart des adultes auront une coquille allant de 2.5 à 4 cm. La croissance est forte au printemps et en été, puis elle ralentit en automne et peut devenir pratiquement nulle en hiver. Plusieurs facteurs

environnementaux vont influencer l'intensité de croissance, en particulier les conditions trophiques et la température. Par ailleurs, la croissance diminue avec l'âge. Il existe une certaine diversité phénotipyque de formes de coquilles chez *L. stagnalis* [Vinarski, 2015; Hohagen & Jackson, 2013]. Les « lignes de croissance » de la coquille témoignent de l'histoire de vie des organismes [Marie, 2008] a l'instar de la dendrochronologie des arbres. De manière générale, les différentes couches de la coquille des mollusques sont considérées comme des sortes de traceurs des conditions environnementales. Chez *L. stagnalis*, la coquille est très fine et friable, ce qui rend cet archivage plus délicat que chez d'autres mollusques à coquille multicouches épaisses. Notons au passage que sa coquille — comme tous les *Pulmonata* — ne possède pas d'opercule (contrairement aux *Prosobranchia*). Chez *L. stagnalis*, il semble que la diversité phénotypique de la coquille des organismes est mieux expliquée par les effets directs des pressions environnementales plutôt que par des effets génétiques [Arthur, 1982]. J'ai clairement remarqué ces différences phénotypiques de coquilles de formes et couleurs entre plusieurs populations différentes. Cependant, j'ai aussi constaté qu'une population de laboratoire élevée sur plusieurs générations selon des conditions environnementales proches d'un autre élevage avait des différences phénotypiques assez marquées (forme et couleur). Cela suggère tout de même que les différences ontogéniques chez *L. stagnalis* sont aussi conditionnées par des facteurs génétiques, bien que vraisemblablement moins que les facteurs environnementaux. De fortes variations de traits d'histoire de vie ont été rapportées entre différentes populations de *L. stagnalis* au Royaume-Unis. Lors de ces investigations [Grant Reid, 2013], il a effectivement été observé que cette espèce possède une forte plasticité d'adaptation à son milieu. Bien que la l'identification de *Lymnaea stagnalis* ne pose pas de doute, les fortes variations intraspécifiques (traits de vie) et les différences de plasticités phénotypiques entre populations de *L. stagnalis* fortement éloignées géographiquement — et donc avec une certaine distance génétique — ont conduit Vinarski [2015] à évoquer la possibilité d'inclure une notion de **sous-espèce** dans l'approche cladistique concernant *L. stagnalis*.

1.2.3 Reproduction

Lymanea stagnalis est **ovipare**. Elle est hermaphrodite. Il s'agit d'un **hermaphrodisme simultané** (non séquentiel). Cette espèce est **itéropare** car elle ne meurt pas après la reproduction et elle peut se reproduire plusieurs fois au cours de sa vie [Grant Reid, 2013]. Elle peut se reproduire par **autofécondation** (phénomène de *selfing* en anglais). Cependant, l'**allofécondation** — c'est-à-dire la fécondation croisée — est en général privilégiée lorsque des partenaires sont présents. Un seul rôle (*i.e.*, mâle ou femelle) se fait à la fois mais ils peuvent être intervertis pendant l'accouplement. Les séquences de l'accouplement ont été décrites en détail et les neurones du SNC mis en jeu ont été déterminés (Koene [2010], voir figure 1.4 p. 38). Le mâle féconde la femelle au moyen de son preputium. Les femelles peuvent stocker le sperme dans leur spermathèque mais la durée maximale et moyenne de stockage est mal connue. Les organismes vont ensuite déposer une masse gélatineuse (contenant les œufs) sur un substrat solide de leur environnement. C'est le phénomène d'**oviposition**. L'oviposition est influencée par stimuli photique (lumineux) correspondant à une photopériode à dominance diurne (printemps — été) [Bohlken & Joosse, 1981; Dogterom *et al.* , 1983; Ter Maat *et al.* , 2012], par l'alimentation [Van de Ven & Roubos, 1990; Dogterom *et al.* , 1985; Van Der Steen, 1966] et des stimuli chimiques comme la teneur en oxygène [Ter Maat *et al.* , 2012, 1983].

Chaque masse est de taille variable et contient une densité d'œufs variable également. Un exemple de corrélation entre la longueur d'une masse et le nombre d'œufs dans la masse est présenté en annexe B.1. La variabilité associée s'explique en partie par les différences de diamètre entre masses, leurs différences de rugosités (les masses adoptent une morphologie dépendante de la topographie de leur substrat) et aussi une densité en œufs fluctuante pour un même volume de masse. Par ailleurs, le nombre d'œufs produits par masse augmente avec l'âge des animaux. Pour des individus de 25 à 35 mm, les masses varient en moyenne de 1 à 3 cm et contiennent de 30 à 70 œufs avec des maximums à 150. Le développement embryonnaire complet se fait pendant 9 à 12 jours à 20 $^{\circ}$ C. Quatre stades embryonnaires sont généralement distingués : **Morula** (jaune et mouvements lents), **Trocophore** (grisâtre et mouvements répétés), **Veliger** (perte de l'apparence ronde et différentiation du pied et de la coquille) et **Hippo** (différentiation des yeux, développement complet et battements cardiaques). Plusieurs anomalies de développement peuvent apparaitre — notamment lors de tests embryotoxiques — comme par exemple la polyembryonie, des œufs

avec un albumen atrophié, des œufs non fertilisés ou encore une cellule embryonnaire seule (sans chorion ni albumine) [Giusti, 2013]. Après éclosion, l'âge de maturité sexuelle est acquis à partir d'environ trois mois en laboratoire. Cela est plus long en milieu naturel. De nombreux paramètres vont influer sur la reproduction des organismes. En particulier leur **alimentation** [Ter Maat *et al.* , 2007], leur possible **parasitisme** [Puurtinen *et al.* , 2004], leur taille et âge [Nakadera *et al.* , 2015] et leur densité dans leur microhabitat seront importants. En effet, *Lymnaea stagnalis* est le premier organisme hermaphrodite chez qui « l'**effet Coolidge** » a été démontré [Koene & Ter Maat, 2007]. Celui-ci correspond à l'augmentation des phénomènes d'accouplement selon la probabilité de rencontre de nouveaux partenaires. Ainsi, 100 limnées dans un aquarium auront une production d'œufs par individu et par jour plus importante que celle de 10 limnées — par individu et par jour — dans ce même aquarium. Cet effet peut donc constituer un facteur confondant car le *design* expérimental aura une influence sur les paramètres de reproduction.

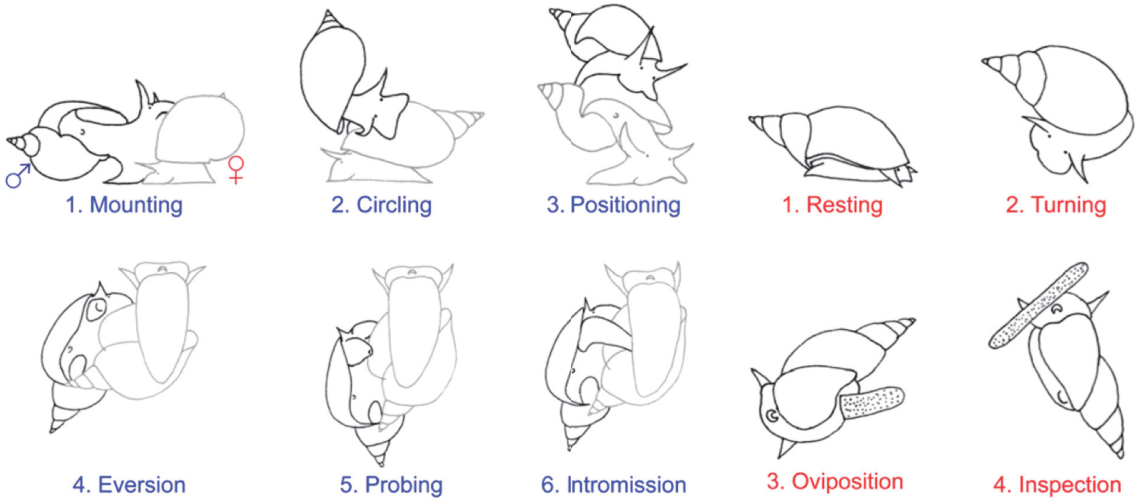


FIGURE 1.4 – Séquences d'accouplement et d'oviposition chez *Lymnaea stagnalis* [Koene, 2010]

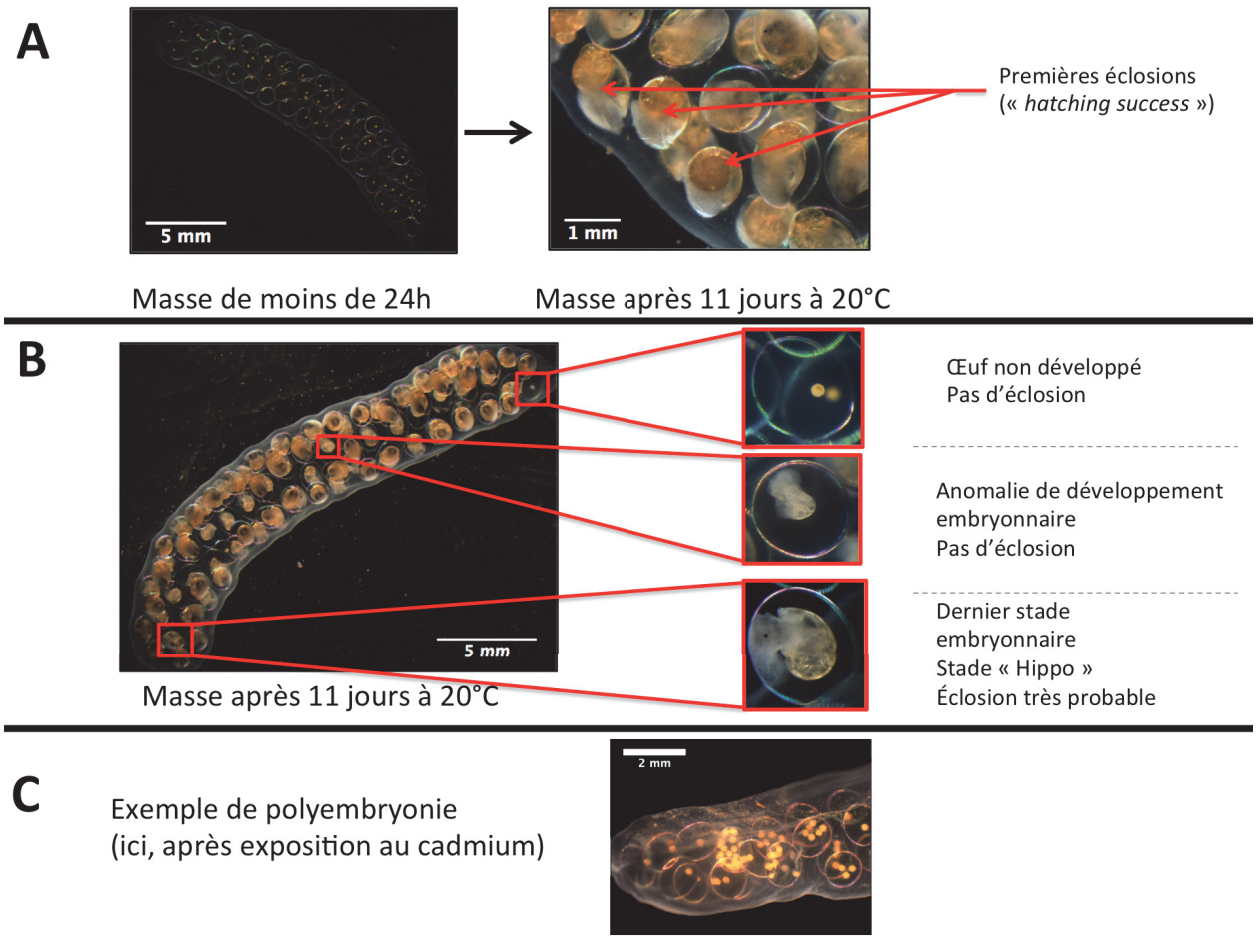


FIGURE 1.5 – Masses de *Lymnaea stagnalis*

1.2.4 Système circulatoire

Lymnaea stagnalis possède un **système circulatoire ouvert** [Sminia, 1981] (figure 1.6 p. 40 et figure 1.8, p. 45). Il n'y a pas de différence entre le liquide interstitiel et le sang. Le liquide circulant est appelé « hémolymphe » et correspond à son « sang ». Le cœur pompe l'hémolymphe dans le système artériel qui lui-même continue en artérioles puis capillaires. Ensuite, l'hémolymphe est collectée par le système veineux inverse. Le cœur fournit l'impulsion nécessaire à la circulation hémolymphatique. Cependant, d'autres contractions musculaires vont largement influencer le rythme de circulation, comme par exemple sa locomotion et son muscle columnelle (garant du maintien dans la coquille). Le cœur de *L. stagnalis* possède un ventricule et une auricule. La majorité de la musculature de son système circulatoire est composée de petits muscles non-striés uninucléés. Par contre, son cœur est un muscle strié qui ressemble fortement aux muscles striés squelettiques des vertébrés et arthropodes. Il semble que la régulation neuronale du cœur soit comparable en complexité à celle des mammifères [Brezden & Gardner, 1992]. Entre le lumen du cœur ou des vaisseaux et leurs cellules musculaires respectives, il n'y a pas d'espace endothélial continu (contrairement aux vertébrés). Les cellules endothéliales sont irrégulièrement réparties et certaines zones en sont dépourvues. Ainsi, les sinus sont ouvertement connectés avec le tissu conjonctif (voir figure 1.8, p. 45). Celui-ci rassemble des fibres de collagène, des fibroblastes et des cellules turgescentes de réserve de glycogène. Ces dernières confèrent une certaine rigidité aux vaisseaux. Ces structures conjonctives ne contiennent pas de fibres élastiques. L'épaisseur des vaisseaux et leur composition varie fortement d'un endroit à l'autre du corps.

1.2.5 Hémolymphe

Ce liquide circule à travers le système vasculaire de *L. stagnalis* et « baigne » ses tissus et organes. Il contient les hémocytes qui sont les cellules immunocompétences circulantes. Face à une menace pathogène, l'hémolymphe aura notamment des propriétés bactériostatiques et bactériolytiques. Elle contient aussi des nutriments et protéines nécessaires au bon fonctionnement physiologique de l'organisme. Ainsi, l'hémolymphe reflète le statut physiologique de l'organisme (homéostasie). Par exemple, il a été suggéré que le pH de l'hémolymphe est un des éléments qui détermine le comportement des organismes (alimentation, respiration) [Sidorov & Polyanina, 2003]. Plusieurs techniques de collecte de

l'hémolymphe ont été décrites. La première, invasive, consiste à ponctionner l'organisme directement dans le cœur ou dans un vaisseau suffisamment large (*e.g.*, *vena pulmonis*). Une autre technique, vraisemblablement peu invasive, consiste à déclencher le réflexe de rétraction de l'organisme par stimulus au niveau de son pied [Bekius, 1971; Sminia, 1981]. La limnée se rétracte dans sa coquille (réflexe à la prédation) et expulse l'hémolymphe via le pore hémal situé près de l'anus. Cela lui permet de réduire son volume et donc de se rétracter au fond de sa coquille pour se protéger d'une menace de prédation. Bekius [1971] avait mesuré que les organismes perdaient environ 25% de leur poids frais après expulsion de leur hémolymphe. Ainsi, la mesure de poids frais des organismes doit se faire en prenant soin de ne pas déclencher leur réflexe de rétraction. Les deux techniques de collectes de l'hémolymphe ont été validées dans la mesure où la qualité des échantillons d'hémolymphe étaient égales en terme de densité hémocytaire et composition ionique [Sminia, 1981].

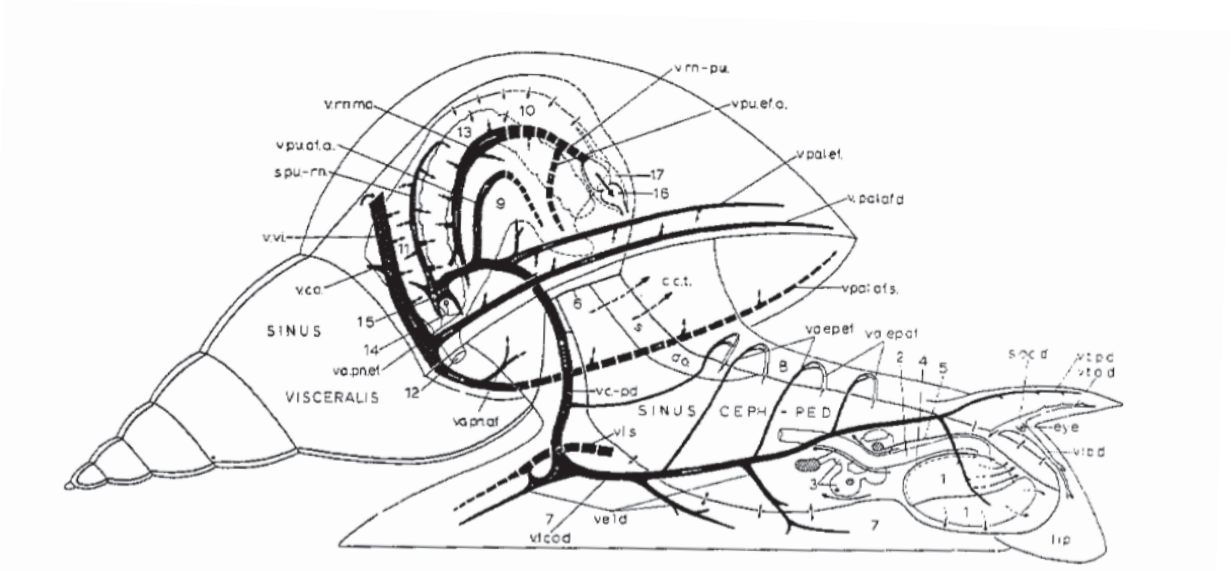


Fig. 2. The main *venous* vessels and sinuses of *L. stagnalis*, viewed from the right side. The organs and vessels shown in broken lines are situated in the left half of the body; the normal direction of the blood flow is indicated by solid arrows; the circulation at the moment of the blood extrusion is marked with broken arrows. 1, buccal mass; 2, oesophagus; 3, CNS with surrounding connective tissue; 4, membrane on upper half of the buccal mass; 5, membrana capito-cerebralis; 6, membrana transversa; 7 and 8, connective tissue of the foot and of the dorsal part of the head-foot, respectively; 9, 10 and 11, anterior, left posterior and right posterior part of the lung roof, respectively; 12, pneumostome; 13, kidney; 14, renal pore; 15, haemal pore; 16, heart; 17, pericard; c.c.t., central connective tissue; s.do., sinus dorsalis; s.oc.d., sinus oculis dextra; s.pu.-rn., sinus pulmorenalis; va.ep. (af.,ef.), vasa epidermalis (afferentia, efferentia); va.pn. (af., ef.), vasa pneumostomales (afferentia, efferentia); va.pu. (af.a., ef.a), vasa pulmonalis (afferentia anterior, efferentia anterior); v.co., vena columellaris; v.c. -pd., vena cephalo-pedalis; v.lb.d., vena labialis dextra; ve.l.d., venae laterales dextrae; v.l. (co.d., s.), vena lateralis (communis dextra, sinistra); v. pal. (af.d., af.s., ef.), vena pallialis (afferens dextra, afferens sinistra, efferens) v. rn.ma., vena renalis major; v.rn. -pu., vena reno-pulmonalis; v.t. (a.d., p.d.), vena tentacularis (anterior dextra, posterior dextra); v.vi., vena visceralis. [Courtesy of Dr R. Bekius (1972). *Neth. J. Zool.* **22**, 1–58].

FIGURE 1.6 – Système circulatoire chez *Lymnaea stagnalis* (copie de Sminia [1981])

1.2.6 Respiration

L. stagnalis est une espèce à respiration bimodale. Elle peut respirer par voie cutanée ou pulmonée [Taylor & Lukowiak, 2000]. Dans ce cas, elle remonte à la surface de l'eau et ouvre son pneumostome qui lui permettra de remplir d'air ses deux poumons rudimentaires. Sa cavité palléale est dépourvue de branchies mais richement vascularisée et fait office de poumon. Ainsi, cette espèce peut supporter correctement des milieux hypoxiques voir anoxiques. À 20 ° C, il a été rapporté que *L. stagnalis* peut supporter un milieu anoxique pendant 40h [Wijsman *et al.* , 1985].

1.2.7 Hémocyanine

Le transport de l'oxygène dans la circulation sanguine de certains gastéropodes se fait via une protéine appelée hémocyanine. C'est le cas chez *L. stagnalis* mais pas — par exemple — chez *Biomphalaria glabrata* ou chez *Planorbarius corneas*. Ces derniers ont une hémoglobine comme pigment hémolymphatique de transport de l'oxygène. L'hémocynanine chez *L. stagnalis* est produite par les **cellules « pores »** situées dans le tissu conjonctif de leurs vaisseaux, leur pied et surtout de leur manteau [Sminia & Boer, 1973]. C'est un assemblage géant de chaines polypeptidiques formant un didécamère de larges sous unités (350-450 kDa). Elle contient approximativement 160 sites de liaison à l'oxygène. Chaque site nécessite deux atomes de **cuivre** comme cofacteurs essentiels [Wood *et al.* , 1981]. Le cuivre sous sa forme oxydée donne une **couleur bleuâtre** caractéristique d'une hémolymphe oxygénée. Ainsi, le degré d'oxygénation de l'hémolymphe pourrait se quantifier par colorimétrie. L'hémocyanine appartient à la famille des protéines de type 3. Elle a une activité tyrosinase et donc **phénol-oxydase** [Kremer *et al.* , 2014; Decker & Jaenicke, 2004; Decker & Tuczek, 2000]. Il a été suggéré que l'hémocyanine de certains arthropodes est impliquée dans leur système immunitaire inné [Coates & Decker, 2016; Zlateva *et al.* , 1996], ce qui semble être aussi le cas de certains mollusques [Siddiqui *et al.* , 2006]. Wood *et al.* [1981] avaient mesuré une concentration d'hémocyanine dans l'hémolymphe de *L. stagnalis* adulte allant de 1 à 3 mg/ml. Ils avaient observé un pic de biosynthèse de l'hémocyanine intervenant trois jours après la collecte de l'hémolymphe. La concentration dans l'hémolymphe revient progressivement à sa valeur basale jusqu'au 14e jour. Les cellules "pores" ont un réticulum endoplasmique rugueux très développé. Les citernes du réticulum sont faites de structures cristallines correspondant à l'hémocyanine.

Il a été supposé que les appareils de Golgi ne sont pas impliqués dans cette biosynthèse. Les cellules pores seraient responsables de la biosynthèse, du stockage et de la sécrétion de l'hémocyanine.

1.3 Système de défense interne chez *L. stagnalis*

Cette section présente les caractéristiques générales du système de défense interne chez *L. stagnalis*. Certains paragraphes sont volontairement courts et exempts de références bibliographiques afin de faciliter la lecture et éviter les redondances avec la suite du document. La section est suivie d'une revue en anglais qui contient les références bibliographiques. Cette revue aborde le sujet dans un contexte écotoxicologique.

1.3.1 Réponse immunitaire humorale

Opsonines, agglutinines et lectines : Des réponses humorales – d'origines cellulaires – existent pour augmenter l'efficacité immunitaire via une amélioration de la reconnaissance et/ou présentation des cibles (*e.g.*, microbe ou cellule apoptotique) vis-à-vis des hémocytes pour leur phagocytose. Ainsi, toute (macro)molécule qui remplit cette fonction est appelée opsonine. Le phénomène est appelé opsonisation et l'ensemble du processus jusqu'à la phagocytose est appelé **opsonophagocytose** [Raman *et al.* , 2008]. Les anticorps de vertébrés sont des opsonines mais les opsonines d'invertébrés sont de nature différente. Les hémocytes produisent des opsonines [Van der Knaap *et al.* , 1981c]. Chez *L. stagnalis*, ces molécules sont également appelées agglutinines car elles ont des propriétés d'agglutination et certains auteurs considèrent ces termes comme synonymes pour cette espèce. Il a été proposé que ces molécules agissent de concert (voir figure 1.7, p. 43). Dans ce cas précis, il peut être employé le terme « ***agglutinin-mediated opsonophagocytosis*** » [Raman *et al.* , 2008; Van der Knaap *et al.* , 1982]. Les lectines sont des protéines qui se lient de façon réversible aux carbohydrates des membranes plasmatiques. Ainsi, ce sont des opsonines mais également des agglutinines [Smit et al. 2004] car elles participent à l'hemagglutination des hémocytes (*e.g.*, lors de nodulations). Certains auteurs parlent de « **lectinophagocytose** » [Canesi *et al.* , 2002]. Elles ont un rôle également dans l'adhésion cellulaire. Une opsonine a été décrite et étudiée chez *L. stagnalis* : la **granularine**. Elle est synthétisée par les cellules granulaires du tissu conjonctif [Smit *et al.* , 2004]. Ils ont observé une sécrétion de cette protéine après stimulation avec des particules

de zymosane et l'augmentation concomitante de l'activité de phagocytose. Il a aussi été observé une augmentation de l'ARNm qui code pour cette protéine lors de parasitisme avec le trématode *Trichobilharzia ocellata*. Hoek *et al.* [1996] ont découvert une protéine de la famille des Ig (immunoglobulines) appelée ***Molluscan Defense Molecule*** (MDM). Elle a été découverte dans les cellules granulaires du tissu conjonctif de *L. stagnalis*. Gust *et al.* [2013b] ont aussi réussi à quantifier l'ARNm de la MDM dans les hémocytes de *L. stagnalis*. Hoek *et al.* [1996] ont décrit cette protéine comme partageant des domaines Ig avec les *neural cell adhesion molecules* (NCAMs) de vertébrés et invertébrés et présentant aussi beaucoup de similitudes avec la protéine de la famille des Ig chez les insectes, appelée « hémoline ». MDM active le système immunitaire inné mais les mécanismes d'action sous-jacents sont inconnus. Il a été également observé que cette protéine était sous-exprimée lors de parasitisme avec *T. ocellata*, ce qui serait une stratégie du parasite pour empêcher sa reconnaissance.

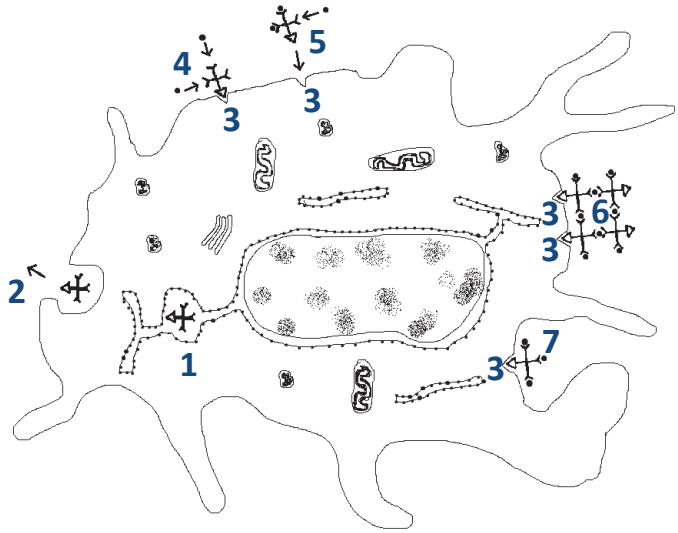


FIGURE 1.7 – Modèle de reconnaissance et phagocytose d'un pathogène via les opsonines-agglutinines chez *L. stagnalis* selon Sminia & Van der Knaap [1986]
1 : synthèse des opsonines-agglutinines (protéines), 2 : exocytose, 3 : sites de liaison des opsonines à la membrane plasmatique hémocytaire, 4-5 : opsonisation et fixation à l'hémocyte, 6 : agglutination, 7 : internalisation du couple opsonines–agglutinines–cibles dans la cellule pour sa destruction.

Phénol-oxydases : Des enzymes de la famille des phénol-oxydases peuvent être exocytées dans la lymphe via la voie d'activation pro-phénol-oxydase. Ces enzymes vont oxyder les résidus phénols des microbes ce qui va *in fine* mener à la formation d'une structure polymère appelée **mélanine**. Ainsi, l'activité enzymatique des phénol-oxydases va induire

l'encerclement des microbes dans une capsule de mélanine où ils seront véritablement piégés. Cette capsule est relativement imperméable aux toxines de certains pathogènes et elle bloque leur motilité. Par ailleurs, les hémocytes auront plus de facilité à phagocyter une telle structure mélanisée et en ce sens la mélanine ou les POs peuvent être envisagés comme des « facteurs d'opsonisation ».

1.3.2 Réponse immunitaire cellulaire

Système inné ? Les invertébrés possèdent un système immunitaire inné. Ils ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif spécifique supplémentaire comme chez les vertébrés. En effet, il n'y a pas de base moléculaire ou cellulaire qui puisse justifier l'existence d'un tel système adaptatif : pas d'anticorps, pas de cellules B, etc. Cependant, il est insuffisant et trompeur de décrire leur système immunitaire par comparaison avec les vertébrés chez qui beaucoup plus de recherches et connaissances ont été développées. Il semble justifié de changer de paradigme. Les invertébrés pourraient avoir une forme de mémoire immunitaire, une certaine coopération cellulaire et une certaine reconnaissance de leur cible qui déterminera la réponse mise en place [Loker *et al.* , 2004]. Ainsi, il serait plus juste de décrire le système de défense interne de *L. stagnalis* comme un système quasi-spécifique et quasi-inné. Les cellules immunitaires circulantes sont appelée hémocytes. Les hémocytes peuvent être classés de différentes manières selon les espèces et les auteurs (voir paragraphe suivant).

Effecteurs cellulaires : Les **hémocytes** constituent la base de l'immunité cellulaire de *L. stagnalis*. Les hémocytes sont les cellules immunitaires circulantes directement impliquées dans la destruction d'agents infectieux tels que des bactéries ou des parasites. Ils sont par ailleurs impliqués dans d'autres fonctions physiologiques telles que la réparation de tissus et de leur coquille, le transport de nutriments, le nettoyage de déchets métaboliques et le nettoyage de cellules mortes (apoptotiques, nécrotiques ou autres). Ainsi, ils sont actifs contre le développement de certaines pathologies malignes (*e.g.*, destruction de cellules cancéreuses). Ils sont également impliqués dans la détoxication de xénobiotiques (*e.g.*, CYP 450, protéines de résistance multixénobiotique, métallothionéines, etc) mais cela n'a pas encore été exploré chez *L. stagnalis* spécifiquement. Sous leur forme circulante dans l'organisme, les hémocytes sont ovoïdes. Au contact d'un substrat, ils s'aplatissent (*spreading cells*). Ces cellules possèdent une grande plasticité ce qui leur confère leur grande

motilité sur leur substrat. Ils peuvent se déplacer dans leur microenvironnement jusqu'à leur cible. Pour cette raison, chez *L. stagnalis* ils étaient initialement appelés **aemibocytes**. Les hémocytes peuvent donc migrer du lumen des vaisseaux lymphatiques vers les tissus et vice-versa (***tissue-dwelling hemocytes***; voir figure 1.8, p. 45). Par ailleurs, des cellules fixes sont aussi impliquées dans l'immunité de ces organismes. Les vaisseaux sont tapissés de **cellules endothéliales**, mais de manière non continue. Certaines zones peuvent en être totalement dépourvues. Ces cellules endothéliales possèdent des récepteurs qui ressemblent à des lectines qui peuvent « attraper » les microorganismes qui sont ensuite phagocytés par les hémocytes mobiles. Les **cellules « pores »** sont enchevêtrées dans le tissu conjonctif et permettent de produire l'hémocyanine mais aussi de recycler des protéines étrangères par pinocytose [Van der Knaap *et al.* , 1993]. La troisième ligne de défense cellulaire fixe correspond aux **cellules réticulaires** du tissu conjonctif.

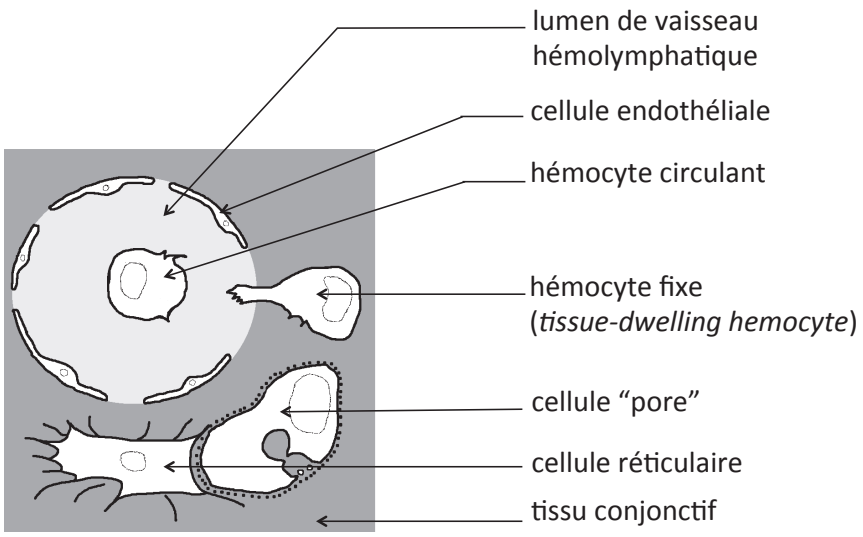


FIGURE 1.8 – Représentation schématique des effecteurs cellulaires du système de défense interne chez *L. stagnalis* selon Van der Knaap & Loker [1990]

Formation et renouvellement des hémocytes ou hémocytopoïèse : La question de l'origine et du renouvellement des hémocytes chez les mollusques et notamment chez les gastéropodes est en discussion depuis des décennies mais elle reste imparfaitement comprise. Chez certaines espèces, un organe lymphatique ayant une fonction hémocytopoïétique a clairement été identifié et désigné comme *amoebocyte-producing organ* (APO). C'est le cas chez le planorbe *Biomphalaria glabrata* [Sullivan *et al.* , 2014; Jeong *et al.* , 1983; Joky *et al.* , 1985]. Une étude sur le transcriptome de cet AOP vient récemment d'être publiée [Zhang *et al.* , 2016]. Il semble que l'AOP soit un organe « filtrant », se rapprochant plus d'un rein que de la moelle osseuse chez les vertébrés [Souza & Andrade, 2012]. Chez les *Lymnaeids*, un AOP a été identifié chez *Lymnaea truncatula* [Rondelaud & Barthe, 1981, 1982] :

"In ***Lymnaea truncatula, there is an amoebocyte-producing organ located in the posterior part of the kidney****."..."The conclusions of Sminia (1974) incompletely explain our observations because this author has not seen an amoebocyte-producing organ in Lymnaea stagnalis. These data suggest the following hypothesis : in Lymnaea truncatula, hematopoiesis is accomplished by two processes, (1) a disseminated process probably located in the connective tissue and vascular system of the snail, (2) a focal process with the amoebocyte-producing organ, which appears only when some condition such as parasitic infection permits the stimulation of this amoebocytic organ."*

Cependant, **cela a été nuancé** par la suite par Monteil & Matricon-Gondran [1991] pour qui il semble que le processus soit différent entre *B. glabrata* et *L. truncatula*. Ces derniers expliquent que chez les *Lymnaeids*, la production d'hémocytes est plutôt diffuse que localisée, bien que la partie proximale des reins soit probablement impliquée dans le processus de maturation des hémocytes. Chez *L. stagnalis*, l'auteur Sminia a exploré la question de l'origine hémocytaire [Sminia, 1974]. Ses conclusions sont les suivantes :

"The results of the present investigations indicate that ***Lymnaea stagnalis does not possess a well-defined haematopoietic organ****. Blood cell formation occurs* ***throughout the connective tissue and the vascular system****"... "The percentage of dividing cells in the blood and in the connective tissue is the same"...."These quantitative data indicate furthermore that there is no difference in the relative importance of the blood and the connective tissue in the process of haematopoiesis"...."The conclusion that L. stagnalis lacks a haematopoietic organ disagrees with the assumption of Cuénot (1891) and Miller (1956) that the connective tissue around the heart-kidney system should be considered as haematopoietic region. In other molluscs (gastropods as well as bivalves) no mention has been made of specialized haematopoietic organs (e.g., Cheng and Rifkin, 1970 ; Narain, 1973). This might suggest that in these animals too blood cells are formed throughout the body. The presence of dividing amoebocytes both in the circulating blood and in the connec-*

tive tissue of a number of molluscs, supports this supposition (e.g., Cuénot, 1892 ; George and Ferguson, 1950 ; Brown and Brown, 1965)."

Ainsi, chez *L. stagnalis*, les amœbocytes du tissu conjonctif et ceux de l'hémolymphe circulante ont tous la capacité de se diviser (mitose). Il semble que la production d'hémocytes soit diffuse. Cependant, cela reste imparfaitement compris car nous ne savons pas quelle est la part des hémocytes qui provient de cellules souches ou pluripotentes qui « bourgeonne » et celle qui provient directement de la division cellulaire d'un stock hémocytaire déjà présent (hémocytes jeunes *vs spreading hemocytes*). **Ces hypothèses doivent être approfondies et confirmées**.

Selon Sminia *et al.* [1983], il semble que l'hématopoiesis chez *L. stagnalis* est diffuse, les hémocytes ont une activité mitotique inversement proportionnelle à leur degré de maturation. Ils suivent un cycle de différentiation-dédifférentiation et migration tissulaire comme cela est présenté dans la figure 1.9 p. 48. De fait, les processus qui régulent l'origine même de la formation des hémocytes « non issus d'autres hémocytes » reste imparfaitement comprise. Les facteurs qui stimulent ou répriment la division cellulaire sont mal compris. Quelle est la capacité de renouvellement du stock hémocytaire chez *L. stagnalis* ? Les hémocytes de mollusques ou insectes peuvent être cultivés [Lebel *et al.* , 1996; Mialhe *et al.* , 1988; Sohi, 1971]. En revanche, il reste de nombreux défis pour les maintenir sur le très long-terme comme de vraies lignées cellulaires. Je ne connais pas d'études chez *L. stagnalis* qui reporte l'observation de multiplication cellulaire lors de la mise en plaque (*ex vivo*) d'échantillons hémolymphatiques.

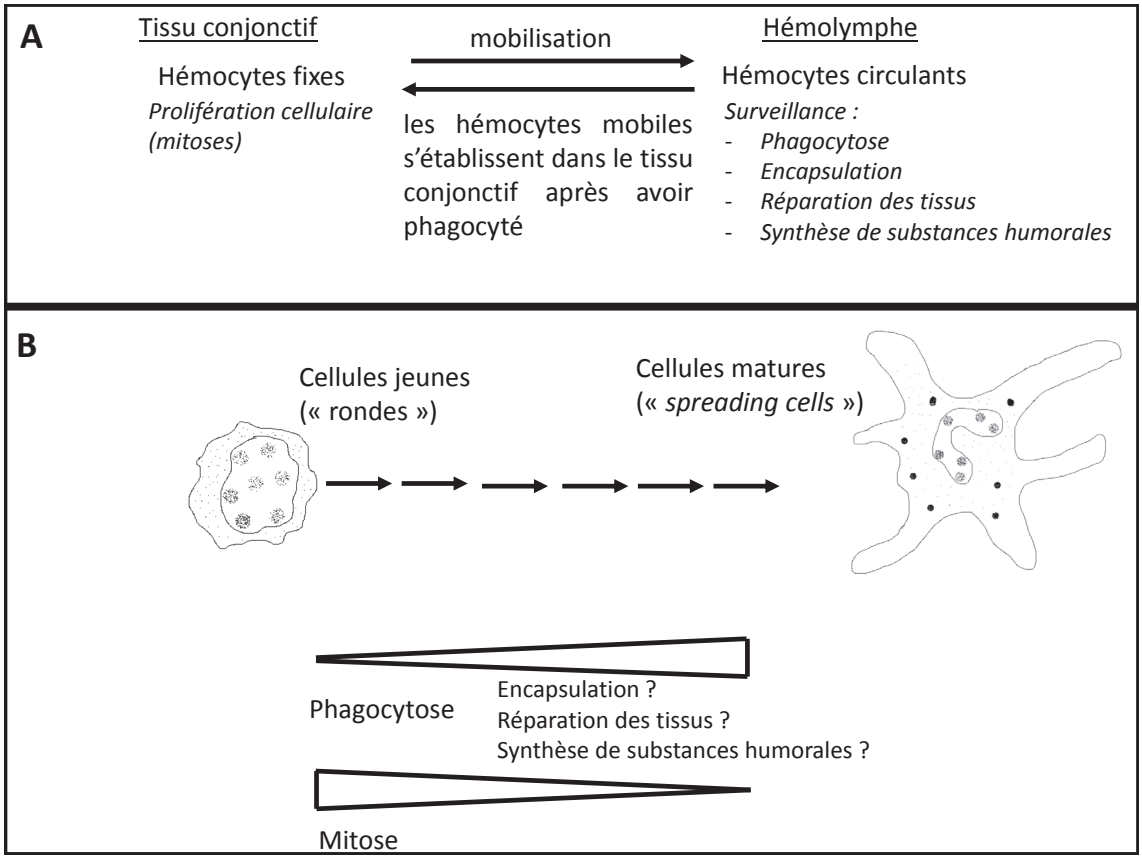


FIGURE 1.9 – Les hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* (selon [Sminia *et al.* , 1983]) : formation, prolifération et maturation

Classification des hémocytes chez *L. stagnalis* : Chez de nombreux mollusques, les hémocytes peuvent être clairement séparés en plusieurs types cellulaires. Un premier type hémocytaire souvent décrit correspond à des cellules jeunes et peu différenciées appelées cellules rondes. D'autres cellules plus grandes et plus différenciées mais avec un faible contenu cytoplasmique en granules sont appelées des hyalinocytes, alors qu'un cytoplasme riche en granules qualifie les hémocytes de granulocytes. Chez *L. stagnalis*, il n'y a qu'un seul type d'hémocyte avec un gradient de différentiation [Van der Knaap *et al.* , 1993]. Dikkeboom *et al.* [1989] indiquent qu'il y a plusieurs sous-populations. D'autres auteurs entretiennent la confusion en parlant de hyalinocytes et de granulocytes. Ainsi, il est nécessaire de clarifier les types/sous-types en vue d'une possible utilisation de ces distinctions dans un contexte écotoxicologique.

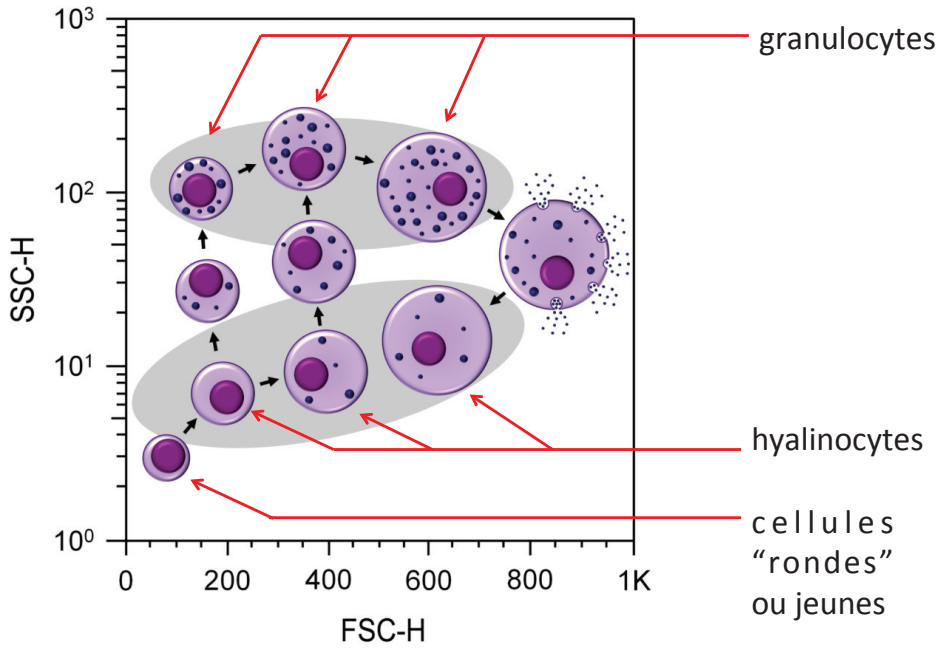


FIGURE 1.10 – Représentation schématique de la classification des hémocytes selon leur cytogramme en cytométrie de flux chez les mollusques : existence d'un « continuum » de taille et de granulation (image de de Freitas Rebelo *et al.* [2013])

Les hémocytes sont observés selon leur taille en abscisse (FSC-H, *Forward scattering-height*) et leur complexité intracellulaire ou granulométrie (SSC-H, *Side scattering - height*). Chez beaucoup de mollusques, les cytogrammes de leurs hémocytes en cytométrie de flux présentent un continuum de taille et de granulation. Les cellules « rondes » ou jeunes sont des cellules peu différenciées. Il est proposé que les hémocytes suivent un cycle de maturation où ils augmentent en taille et gagnent en granulométrie. Des cellules très granulées et grandes seront appelée granulocytes alors que des cellules grandes mais avec peu de granules seront appelées hyalinocytes. Après dégranulation lors d'une immunoréponse par exemple, les granulocytes redeviennent des hyalinocytes. La dichotomie de classification granulocyte/hyalinocyte avec un tel continuum pose néanmoins le problème de savoir comment classer les cellules intermédiaires entre hyalinocytes et granulocytes.

Phagocytose : La phagocytose est un des mécanismes majoritaires mis en jeu dans la destruction cellulaire des microbes. Pour cela, les hémocytes forment des pseudopodes — par invagination de la membrane plasmatique — autour de leur cible et se referment sur celle-ci. Une fois dans le compartiment intracellulaire, le microbe est piégé dans une structure appelée phagosome voire phagolysosome. Un hémocyte (5-25 μm de diamètre circulaire et jusqu'à 75 μm si applati et allongé) peut phagocyter une ou plusieurs bactéries (1–10 μm). Lorsqu'un hémocyte est trop petit pour phagocyter sa cible, une coopération peut se mettre en place (*e.g.*, cas de certains parasites). Un agglomérat de quelques hémocytes sera appelé un phénomène de **nodulation** alors qu'un rassemblement de plusieurs hémocytes sur une surface plus importance sera appelée un phénomène d'**encapsulation**. Ensuite, les hémocytes détruisent leur cible « bouchée par bouchée » [Van der Knaap *et al.* , 1993].

Reconnaissance : Les hémocytes possèdent des récepteurs transmembranaires avec des domaines de reconnaissance sur la face externe de la membrane plasmatique appelés **PRRs** (*pattern recognition receptors*). Par exemple, une grande classe de PRRs connue est celle des **TLRs** (*Toll-like receptors*). Il a été observé que les hémocytes de *L. stagnalis* possèdent des TLR4. Les PRRs sont capables de reconnaitre des molécules d'origine microbiologique provenant du non-soi qui sont appelés **PAMPs** (*Pathogen-associated molecular patterns*). Plusieurs PAMPs existent par microbe et ils peuvent être plus ou moins spécifiques de chaque microbe. Par exemple, un PAMP connu est le LPS (lipopolysaccharide). Toutes les bactéries à gram négatif ont des LPS mais chacun d'entre eux sera légèrement différent. Les LPS sont issus de la paroi de ces bactéries et naturellement relâchés dans leur microenvironnement. D'autres PAMPs très connus sont les LTA (acide lipotéichoïque) provenant des parois de bactéries à gram positif ou encore les particules de zymosane (zymosan en anglais) qui proviennent des parois membranaires de levures. Ainsi, les PRRs vont reconnaitre plus ou moins spécifiquement les PAMPs. Une transduction de signal mènera à une réponse cellulaire et humorale pour une action immunitaire efficace. Par ailleurs, les hémocytes ont des zones membranaires de reconnaissance de protéines humorales appelées opsonines (voir ci-avant) qui ont pour fonction de reconnaitre et de se lier aux microorganismes ou agglutines de la fraction humorale. Une fois ces opsonines liées aux hémocytes, la phagocytose des microorganismes est facilitée.

Enzymes : Des enzymes sont impliquées dans la continuation du processus de destruction. Par exemple, des enzymes transmembranaires formant un complexe NADPH-oxydase vont générer des espèces réactives à l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species* en anglais) à l'extérieur de l'hémocyte et aussi à l'intérieur du phagosome (voir figure 1.11). Ces ROS sont des molécules aux propriétés biocides qui vont destructurer le microbe. Ce mécanisme est appelé flambée oxydative chez les vertébrés. Il semble plus juste de parler d'**activité oxydative immunocompétente** chez les invertébrés dans la mesure où le phénomène n'est pas aussi transitoire que chez les vertébrés et que l'activité augmente la production de ROS issue du métabolisme cellulaire basal d'une magnitude plus importante. D'autres enzymes sont aussi connues pour être impliquées dans la destruction du microbe internalisé telles que des **enzymes lysosomiales** lors de la formation de phagolysosomes en particulier (*e.g.*, β -glucoronidase, phosphatases, esterases, peroxydases, aminopeptidases, amylase et lipase).

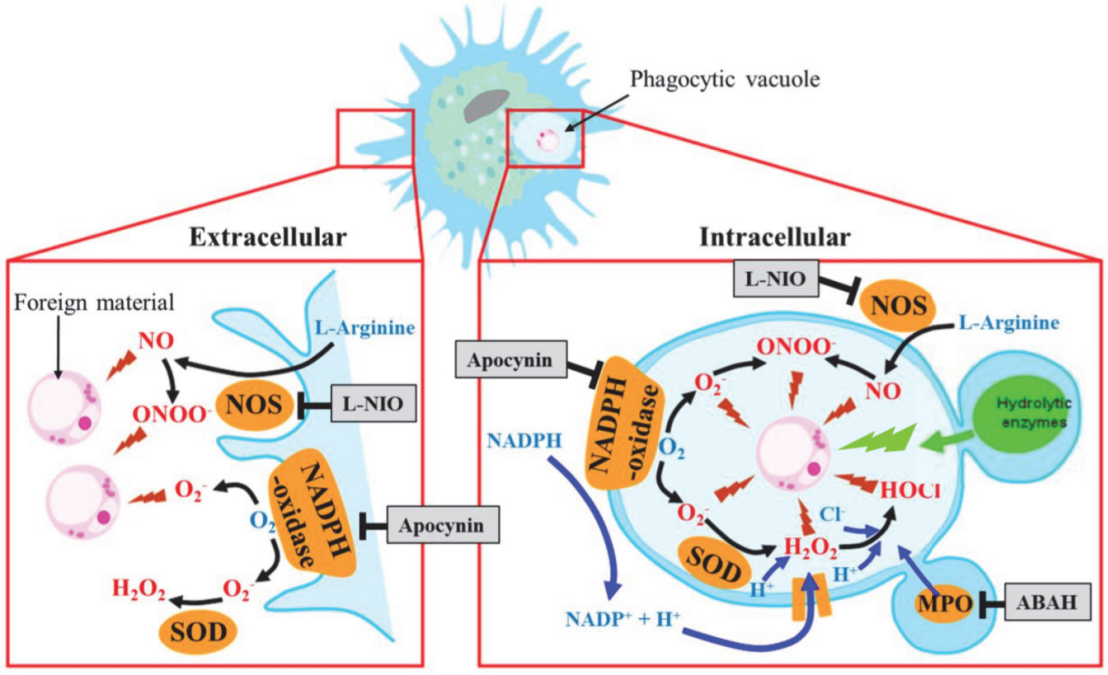


FIGURE 1.11 – Représentation schématique de la production de ROS non-mitochondriales et immunostimulée — à l'extérieur de l'hémocyte (à gauche) et dans le phagosome (à droite) — chez les hémocytes de bivalves selon Donaghy *et al.* [2012]

1.3.3 Parasites

Presque la totalité des trématodes digénétiques (*i.e.*, *digeneans* en anglais, Classe : *Trematoda*, Sous-classe : *Digena*) sont des parasites qui dépendent des mollusques (le plus souvent gastéropodes) comme hôtes intermédiaires pour une reproduction asexuée [Van der Knaap & Loker, 1990]. Ils appartiennent à l'embranchement des plathelminthes (*i.e.*, vers plats ou planaires) et sont représentés par deux ordres principaux : *Echinostoma* et *Strigeatida* (=*Schistosoma*). De manière générale, les larves parasitaires au stade miracidium (« *water-free-living ciliated motile larvaea* ») vont pénétrer dans les gastéropodes (étape 1), une fois dans l'hôte ils deviennent des sporocystes et vont s'y multiplier asexuellement pour devenir des sporocystes filles ou des rédies (étape 2), lesquels vont générer des cercaires motiles (deuxième forme larvaire du parasite) qui vont sortir de l'hôte (étape 3), ils peuvent atteindre un stade intermédiaire appelé métacercaire qui leur permet de survivre jusqu'à l'infestation de leur hôte définitif (*e.g.*, ils peuvent s'enkyster sur des végétaux pour être brouté) (étape 3 bis), les métacercaires vont finalement infester leur hôte vertébré définitif où ils atteindront le stade adulte et vont se reproduire sexuellement (étape 4). Le cycle recommence avec les œufs qui deviennent des miracidiums (voir fig. 1.12 p. 54 et fig. 1.13, p. 56). Beaucoup de parasites sont rythmés par les photopériodes, comme il vient récemment d'être observé chez *L. stagnalis* avec les cercaires *tondoni sp* (gymnocephalus cercaria) qui sont émises surtout en phase diurne avec des pics en Avril, Mai et Juin [Ray & Agrawal, 2015].

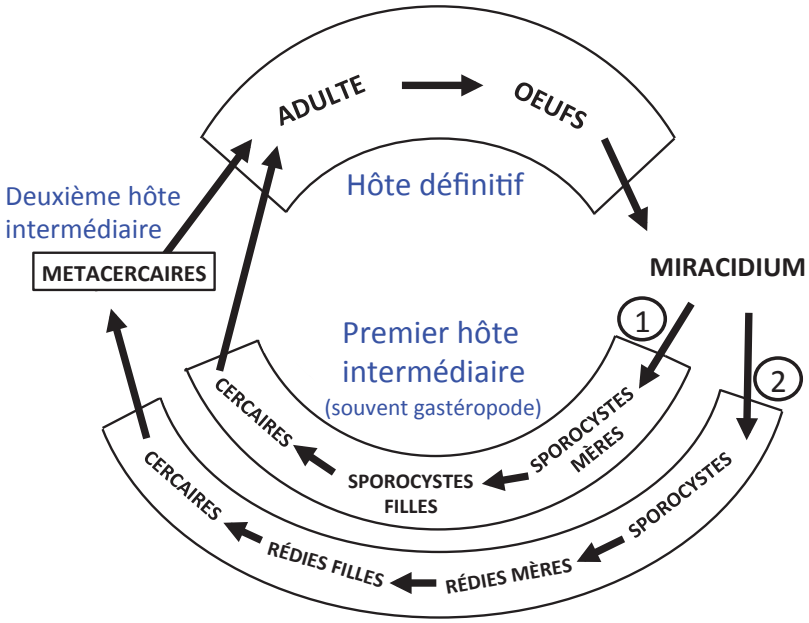


FIGURE 1.12 – Vue d'ensemble du cycle de vie de trématodes digénétiques de la famille schistosoma (1) et echinostoma (2) selon Van der Knaap & Loker [1990]

Les relations hôtes–parasites sont majoritaires dans les processus évolutifs et coévolutifs des organismes et en particulier pour l'évolution de leurs systèmes immunitaires [Brockhurst & Koskella, 2013]. Ces relations vont déterminer en grande partie les résistances ou incompatibilités avec certains parasites alors que d'autres sont compatibles (*e.g.*, mutualismes, neutralismes, commensalismes, amensalisme). Les parasites interagissent fortement avec le système de défense interne des organismes. Chez les gastéropodes, plusieurs phénomènes « d'évasion » de la reconnaissance des parasites ont été décrits. Ces phénomènes peuvent être (i) de nature active (véritable stratégie du parasite) comme par exemple mimer des récepteurs du « soi » de l'hôte, masquer leurs propres récepteurs (donc récepteurs du « non-soi » pour l'hôte) ou interférer avec le processus de reconnaissance (*e.g.*, sécrétion de facteurs) ou alors (ii) de nature passive lorsque l'hôte ne reconnait pas les épitopes du parasites.

Il existe environ 5 à 10 000 trématodes digénétiques recensés et la plupart utilisent les gastéropodes comme premiers hôtes obligatoire intermédiaire. Chez *L. stagnalis*, le parasite le plus étudié est *Trichobilharzia ocellata*. Une méthode pour maintenir le cycle de vie complet du parasite en laboratoire a été décrit [Meuleman *et al.* , 1984b]. Il faut pour cela des élevages de *L. stagnalis* et des canards. Voici une liste non-exhaustive de parasites connus et étudiés chez *L. stagnalis* (sans information quantitative de prévalence

d'infestation géographique) [Van der Knaap & Loker, 1990; Soldánová *et al.* , 2010; Kudlai *et al.* , 2009; Skála *et al.* , 2014; Soldánová *et al.* , 2016; McClelland & Bourns, 1969; Plows *et al.* , 2005; Kendall *et al.* , 1949; Davison & Blaxter, 2005; Meuleman *et al.* , 1984b; Yurlova *et al.* , 2006] :

- *Trichobilharzia ocellata*
- *Schistosoma mansoni*
- *Fasciola hepatica*
- *Notocotylus attenuatus*
- *Moliniella anceps*
- *Cotylurus cornutus*
- *Echinoparyphium aconiatum*
- *Echinoparyphium recurvatum*
- *Opisthioglyphe ranae*
- *Plagiorchis elegans*
- *Diplostomum pseudospathaceum*
- *Echinostoma revolutum*

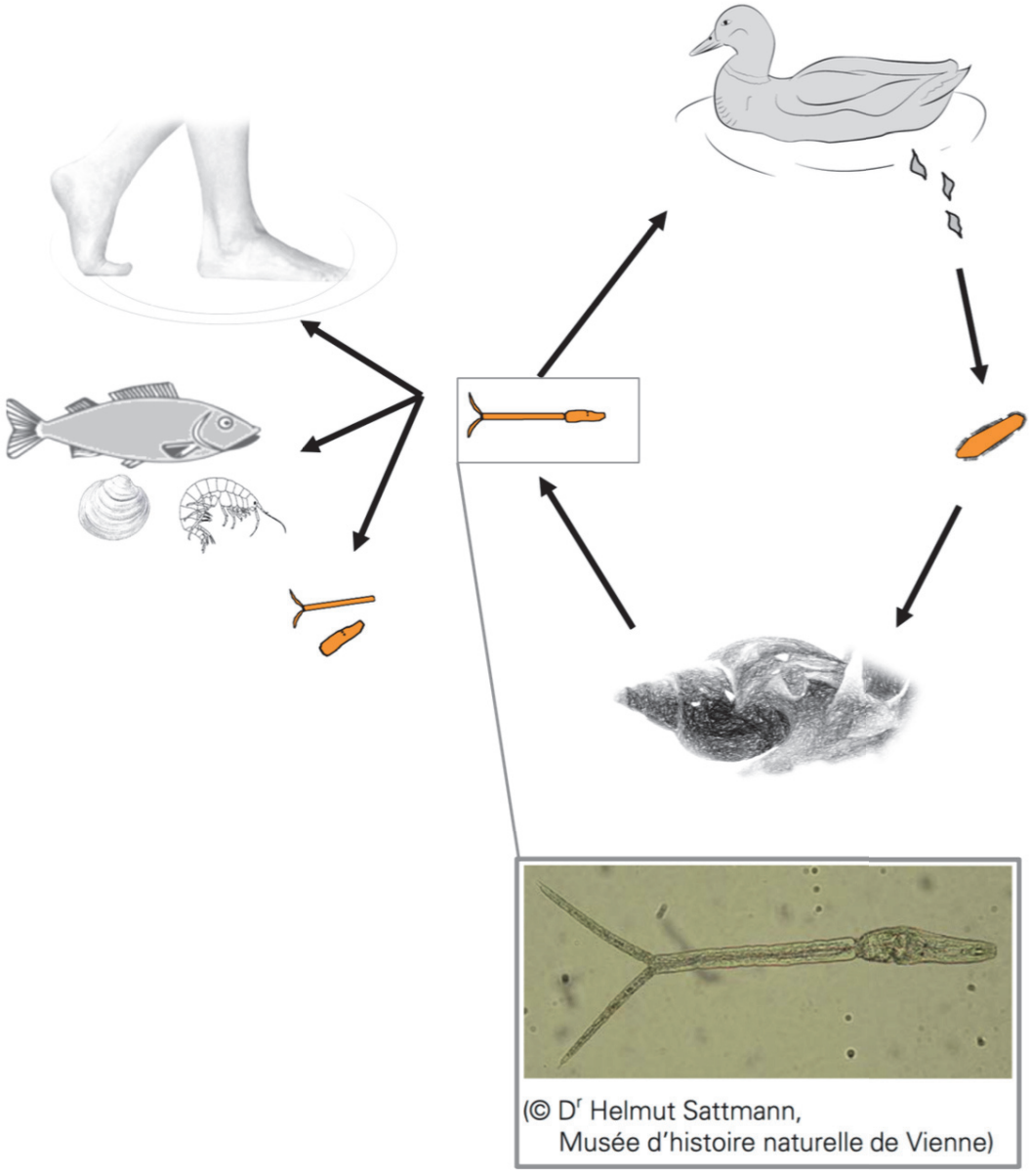


FIGURE 1.13 – Cercaire du *Trichobilharzia szidati* (=*Trichobilharzia ocellata*, environ 400 μm) et son cycle selon [Soldánová *et al.* , 2016]

Remarque : Les gastéropodes comme *L. stagnalis* ou *B. glabrata* sont largement étudiés en parasitologie et en sciences médicales car ils peuvent présenter des risques d'infestation pour les vertébrés et en particulier les humains. Par exemple, *S. mansoni* a pour hôte définitif mais néanmoins accidentel l'Homme. Cela provoque la bilharziose ou schistosomia, la deuxième maladie parasitaire après le paludisme qui est à l'origine d'environ 280 000 décès chaque année. Très connu également est *Fasciola hepatica* ou la Douve du mouton qui a pour hôte définitif des ovins, éventuellement des bovins mais peut aussi infester accidentellement l'Homme. Cela peut engendrer une distomatose hépatique. Très connu aussi, est le parasite *T. ocellata* qui utilise l'Homme comme possible hôte intermédiaire. Les cercaires du parasite rentrent dans la peau et provoquent des dermatites, phénomène connu sous l'appellation « dermatite des baigneurs ». D'autres espèces appartenant à d'autres genres sont aussi susceptibles d'être agents de dermatite cercarienne (Bilharziella). Ainsi, l'expérimentation avec des parasites requiert des précautions très strictes de sécurité sanitaire. Lors des manipulations, une certaine expertise est requise pour se prémunir d'une infestation accidentelle chez l'opérateur humain.

1.4 Article 1 : Vue d'ensemble des immunomarqueurs en immunotoxicologie environnementale avec un regard particulier sur *L. stagnalis*

(en préparation)

Type : ***Review***

Immunomarkers in the great pond snail *Lymnaea stagnalis* and challenges in ecotoxicology

Paul Boisseaux[a], Marion Gust[b], Hélène Thomas-Guyon[c], Jeanne Garric[a]

[a]*Irstea Centre de Lyon-Villeurbanne, Laboratoire d'Écotoxicologie, MAEP, 5 rue de la Doua, 69626 VILLEURBANNE (France)*
[b]*Ministère de l'Écologie, du Développement durable, de l'Énergie, 1 voie Carpeaux, 92800 Puteaux, France*
[c]*LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle*

Abstract

The underlying mechanisms involved in immunity are being decoded stepwise. The immune system has a prominent physiological role, particularly in a multistress context (*e.g.,* chemicals and pathogens). Chemical pollutants that hamper the immune system of aquatic animals is a growing issue. In ecotoxicology, many challenges remain to determine the possibility of using immunomarkers in order to provide new insights into the environmental hazard of chemicals, as well as using such biomarkers to diagnose animal health or the exposure to contaminants. This review summarizes the fundamental background in the immune system of *Lymnaea stagnalis* and the major discoveries over the last decades. The main immunomarkers are described. Methodologies, issues and perspectives are discussed. Based on this existing knowledge, the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* constitutes a promising invertebrate model in eco-immunotoxicology.

Keywords: immune biomarkers, immunocompetence, freshwater, gastropod, *Lymnaea stagnalis*, ecotoxicology

1. Introduction

Environmental immunotoxicology is a branch of ecotoxicology that bridges advances in immunology, toxicology, parasitology, pharmacology and ecology among others. It aims to understand the impact of xenobiotics on the immune system of non-target organisms (Galloway and Depledge 2001). There is increasing interest in this subject due to the pivotal role of the immune function in animal health, particularly in a multistress context (*i.e.*, pollution and microbes). The rise of immune disrupting chemicals in the environment strengthens the concerns. Data for invertebrates' immune systems are scarcer than for vertebrates. Hence, it may be quite challenging to apprehend the framing questions. In parallel, the management of aquatic environments requires a focus on sentinel species that are ecologically relevant. The promotion of *Lymnaea stagnalis* in ecotoxicological guidelines (OECD 2010, Ducrot 2014, Charles 2016) coupled with available knowledge in developmental biology (Meshcheryakov 1990, Hohagen and Jackson 2013) and immunology/parasitology (Amen et al. 1991a,b, Van der Knaap et al. 1993, Loy and Haas 2001) among other freshwater gastropods argue for its implementation in this emerging field of research. Plus, recent environmental immunotoxicology studies on *L. stagnalis* are promising (Gust et al. 2013b, a). Nevertheless, a compilation of current knowledge

of this species in immunology and ecotoxicology is still lacking. A need has arisen to picture the state-of-the-art regarding this specie in possible eco-immunotoxicology applications and to define the main issues to be resolved. Retrospectives on immunotoxicological methodologies used on *L. stagnalis* are missing. This review summarizes the general features of the great pond snail *Lymnaea stagnalis* immune system. The main markers of immunotoxicity are presented. Technical and conceptual approaches are discussed. An exhaustive description of each marker is beyond the scope of this review.

2. Concepts and methods in environmental immunotoxicology

2.1. Why focus on the immune system?

The immune system is the primary defense barrier against pathogen invasion in the internal body. Therefore, immunosuppression leads to high vulnerability to contract infectious diseases with possible effects at the population level. Immunocompetence is a major fitness determinant (Lochmiller and Deerenberg 2000, Segner et al. 2012a,b). Hence, the immune system may also represent an utterly relevant health indicator in wildlife (shift of the homeostasis). Molluscan immunocytes are not only involved in the clearance of invaders but also in shell/tissue repair, nutrient digestion/transportation through the body and possibly pollutant detoxification (Cheng 1984, Robinson and Ryan 1988, T. Suzuki et al. 1991, Franchini and Ottaviani 2000, Hooper et al. 2007, Donaghy et al. 2010, Li et al. 2016). In natural environments, animals are under multistress pressures (*e.g.,* chemical and biological) that will interact with their immune system. Gastropods are particularly known as hosts for intermediate lifecycle stages of a myriad of parasites (*e.g.,* the common liver fluke). Since a wide array of pollutants are described as effectors of the immune system, the latter is now broadly considered to be a direct target system in the context of aquatic contamination. Many pollutants exert immunotoxic effects at concentrations not metabolically toxic, signing hereby the sensitivity of immunomarkers (Galloway and Depledge 2001). The immune system is one of the most sensitive physiological functions to reveal detrimental effects as a result of environmental stressors (Tryphonas et al. 2014). In this context, markers of immunotoxicity may appear as an early warning of water quality contamination and/or health alteration before observations are made on other life-history traits. Last, but not least, the use of invertebrates is encouraged in ecotoxicology (Artigas et al. 2012), in particular because of their numerical and biomass superiority and because of their relatively simplified immune system.

2.2. Immunotoxicity of chemical pollutants and semantic significance

A growing body of evidence highlights the concerns about pollutants that interact with the internal defense of non-target species. Xenobiotics specifically acting on the immune system at low concentrations before any other physiological effects are observed could be called immune disruptive chemicals (IDCs). To date and to our knowledge, no such type of xenobiotics has been described. If no specificity of the xenobiotic to act on the immune system has been proved, but that immunotoxic effects are observed, they cannot be classified as proper IDCs. All these have to be carefully managed, both by assessing their (i) "*a priori* immunotoxicity" (prospective assessment) under controlled laboratory exposure and/or alternative method (*e.g., ex vivo* screening) or "*a*

posteriori immunotoxicity" (retrospective assessment) by evaluating immune adverse effects of environmental samples (water, sediments, effluents) on ecological relevant species, either in laboratory or *in situ* by using caging techniques or autochthonous species.

The concentration of the xenobiotic is an important parameter in ecotoxicology. The usefulness of biomarkers will partly depend on their sensitivity to respond to xenobiotic exposures. "Environmental concentrations" are terms often used to describe the ranges of concentrations that are likely to be encountered in the environment. They may correspond whether to the highest concentrations measured or to the highest concentrations predicted ((*i.e.*, worst case scenario) or eventually to concentrations the most often encountered ((*i.e.*, environmentally-realistic concentrations). More data is required to understand the sensitivity of immunomarkers in real chemical contamination context. Oftentimes, laboratory studies report immunotoxicity at doses quite high and are not really relevant to represent field situations.

Langezaal et al. (2001) classified the immunotoxicity of chemicals into three general immunotoxic reactions:

- immunostimulation (inflammatory response): this can be triggered either by antigens of foreign materials or by pro-inflammatory chemicals
- sensitization of the immunoresponse (idiosyncratic reactions): molecules that "prompt a more vigorous response to subsequent stimulation but do not induce a reaction by themselves"
- impairment of the immunoresponse (immunosuppression)

The terms immunomodulation or immunoresponse refer to the reorganization of immune parameters (fig.1). They may be used if the immunomarker's trend goes over/under the homeostatic confidence intervals but direct beneficial/detrimental effects are not obvious. If a particular immunomarker is hampered but immune resources are still present or slightly reduced, the term immunotoxicity is more appropriate (fig.1). If such immunomodulation is actually a drastic reduction in immune resources, the information will be more explicit in describing the effect as immunosuppressive (immunosuppression) than only "immunotoxicity". Note that a sharp but transient drop in hemocytes is called hemocytopenia, which in fact corresponds to the greatest decrease of hemocytes during the fluctuating phase (*e.g.,* (Lorenzon et al. 2001)) (fig.1).

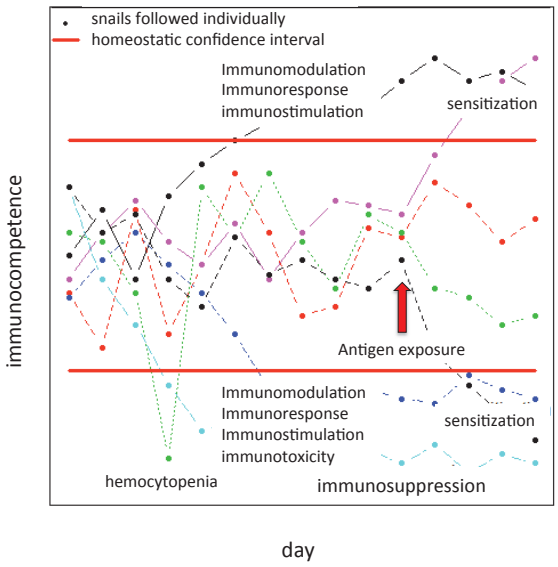


Figure 1: interpretation of immune phenomenons in environmental immunotoxicology

A definition of immune competence or immunocompetence is "the ability of the immune system to respond appropriately to an antigenic stimulation, and unleash an immune response 'cascade' ". (Farlex)[medical dictionary]. Hence, determining the animal immunocompetence without challenge or elicitation of the whole system to orchestrate an immunoresponse, it is an "*a priori* immunocompetence" by opposition to an "*a posteriori* immunocompetence" resulting from a bacterial challenge for example (table 1). The immunocapacity corresponds to the quantitative information on immune resources (no functional insights) that, by extension, confers the capacity to perform an immune action. The immunoefficiency corresponds to the efficiency of immune resources to perform an immune action (functional information). Both terms are integral parts of the immunocompetence. The effects toward what elicitors the observations are done (*e.g.,* chemical exposure or microbiological challenge or both) are worth to precise if relationships are established. Hence, immunocompetence can be extrapolated to gradual accuracy. The resulting overall immunocompetence is only accountable in multistress-induced contexts. Immune status would be the generic term. Thus, the subtleties of these terminologies should be acknowledged (Table 1).

2.3. Immune elicitors and pathogen challenges

Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) are molecules uniquely found in pathogens that are recognized by the innate immune system via pattern recognition receptors (PRRs). PAMPs molecules can refer to any component of a microbe – pathogenic or nonpathogenic – that is recognized by PRRs (fig.2). They may be specific to one microbe or common to a class of microbe. The most well characterized PAMPs comprise viral glycoproteins, viral single/double-strand RNA, bacterial endotoxins such as lipopolysaccharides (LPS), bacterial lipoproteins, bacterial lipoteichoic acids (LTA), flagellins, unmethylated GpG of bacterial DNA, yeast cell wall glucans (zymosan) etc. The phosphate patterns, the number of acyl chains and fatty-acid composition will determine the structural differences of LPS. Among the gram-positive bacteria, the major PAMP is the lipoteichoic acid (LTA), a glycolipid from cell wall that is amphiphilic and negatively charged. The physical forces (wettability, hydrophobicity and repulsion charges) may influence the adhesion/recognition of foreign materials with circulating blood cells. Physical interactions between the invading pathogen and the hemolymph components (hemocytes plasma membranes and soluble effectors of humoral fraction) seem to play a critical role in the consequent immune response set off and therefore in the fate of the microorganism (Canesi et al. 2002, Dumetre et al. 2012). A major PRR family is the Toll-like receptors (TLRs), which are transmembrane proteins found in most cells of the innate immune system. TLRs are considered the major PRR involved in both vertebrate and invertebrate phyla. This family of protein is well preserved and many studies focus on the related cell signaling characterization in other species, including mollusks (Wang et al. 2011, Zhang et al. 2011, Gust et al. 2013b), although mammals were by far the most heavily studied (Medzhitov and Janeway 2002, Takeda et al. 2003, Akira et al. 2006, Kawai and Akira 2009). Their expression is modulated by pathogen invasion, cytokines and environmental stresses (Takeda et al. 2003). Recently, Gust et al (2013 a,b) assessed the modulation of TLR4 on hemocytes of *L. stagnalis*. It was highly modulated upon exposure of psychiatric pharmaceuti-

Table 1: Description of immune effects and semantic uses

unstimulated or unchallenged		stimulated or challenged	
uncontaminated	contaminated	uncontaminated	contaminated
immune status	Chemical-immunomodulation Chemical-immunoresponse Chemical-immunostimulation Chemical-immunodepression Chemical-immunotoxicity Chemical-immunosuppression	Biological-immunomodulation Biological-immunoresponse Biological-immunostimulation Biological-immunodepression Biological-immunotoxicity Biological-immunosuppression	Immunomodulation immunoresponse immunostimulation immunosuppression immunotoxicity immunosuppression Contaminated then stimulated : Chemical sensitization Stimulated then contaminated : Biological sensitization (*e.g.,* parasitism)

cals and municipal effluents. Hence, this receptor is a good candidate for detecting water contamination by pharmaceuticals but this has to be further confirmed.

Hence, in the study of the loss of immune responsiveness resulting from pollutant insult, it may be helpful to characterize the markers in non-stimulated (basal) and stimulated situations towards elicitors to see if they respond accordingly (Segner et al. 2012b). The immune system is an inducible system (fig.2). Constitutive defense assessments (components that are always active) correspond to markers of immunocompetence in unstimulated situations (*e.g.,* basal phenol oxidase). However, many immune defenses are inducible (eventually repressible): when an invading micro-organism is detected (direct contact or PAMPs), a set of responses is triggered. Hence, different pathogens may trigger different responses. By extension, a pollutant that damages one specific cell component may schematically decrease the immunocompetence toward one class of pathogens, while immunocompetence toward others may be affected to a lesser extent (fig.2). Many studies have assessed immune parameters upon challenge by pathogens. By mimicking a real invasion of pathogens, the clearance capacity can be measured. For instance, De Zoysa et al. (2009) prepared a mixture of three bacteria strains for a final intramuscular *in vivo* injection into abalones. In parallel, they designed an injection of VHSV virus. Then, they performed a time-course post pathogen-challenge analysis of hemolymph parameters (De Zoysa et al. 2009). Seppälä and Leicht (2013) assessed various immune elicitors by serynge-foot injection of snail saline buffer containing lyophilized bacteria in *L. stagnalis*. Cheng et al. (1979) observed that dead bacteria did not attract hemocytes from the oyster *Crassostrea virginica* while live bacteria did, suggesting the involvement of pathogen molecular pattern in the migration/motility of such hemocytes. Fawcett and Tripp (1994) observed a migration of the clam *Mercenaria mercenaria* hemocytes toward N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (N-FMLP), a PAMP encountered in both gram positive and negative bacterias. Alvarez et al. (1995), observed an induction of chemokinesis on the hemocytes of *C. virginica* after immune-challenge by live *E. Coli* and cell-free medium coming from the culture of theses bacteria. Van der Knaap et al. (1981b) found that the injection of *E. Coli* and *Staphylococcus* at non-lethal doses (below 109 bacteria) into the cephalopedal blood sinus of *Lymnaea stagnalis* cleared to 99% within 2 hours of the injection [elimination of bacteria from the blood circulation of *Lymnaea stagnalis*]. In spite of the realistic scenario of these experiments, they are not convenient routinely (bacteria cultures, *in vivo* injections, security procedures, required material, etc.). Thus, the use of PAMPs is greatly encouraged. For example, *ex vivo* immunostimulation with LPS, LTA and superantigens such as staphylococcal enterotoxin B (SEB) or soluble egg antigen (SEA) were reported to stimulate the release of lymphokines in humans: these analyses can be further quantified for routine check-ups (Hermann et al. 2003). In *L. stagnalis*, many PAMPs have been reported to be activators of the immune system (table 2).

2.4. Parasitism : a confounding factor ?

Parasitism is a non-mutual symbiotic relationship between species where the parasite takes advantage of its host at the expense of the latter. The pathogen burden of *L. stagnalis* is tremendous. In wildlife, this organism is widely subjected to parasitism (commensalism) and hosts intermediate life stages of trematodes such as *Fas-*

Table 2: Description of immune effects and semantic uses

Elicitors of immune response	Type of elicitor	Exposure condition	Main endpoints	Reference
Laminarin (from *Laminaria digitata*)	PAMPs	*in vitro*	NO production	(Wright et al. 2006)
Phorbol myristate acetate (PMA)	Immunostimulant		phosphorylation of PKC	
Zymosan A (from *Saccharomyces cerevisiae*)	PAMPs from eucaryote			
LPS (from *Escherichia coli*)	PAMPs bacteria gram-			
LPS (from *E. coli*)	PAMPs	*in vitro*	Phosphorylation of ERK Phagocytosis	(Plows et al. 2004)
E. coli, Micrococcus lysodeikticus, Plagiorchis sp. , Water with yeast extracts, microalgae, sugars	PAMPs, Bacteria gram – and +, Parasites, algae and mixtures	*in vivo* or *ex vivo*	Phenol-oxidase activity, Anti-bacterial activity	(Seppälä and Leicht 2013)
Phorbol myristate acetate	Immunostimulant	*in vitro*	Luminol chemoluminescence	(Dikkeboom et al. 1987)
Zymosan A (*S. cerevisiae*)	PAMPs from eucaryote		Superoxide anions and hydrogen peroxydes	(Adema et al. 1993)
Living/dead *Staphylococcus saprophyticus* and *E. coli*	Bacteria gram + and -			
Living bacteria and heat killed bacteria (*S. saprophyticus* and *E. coli*)	Bacteria gram + and Bacteria gram –	*in vivo* foot injection and *ex vivo* exposure	Bacterial clearance, staining of agglutinins/opsonins, agglutinating activity	(Van der Knaap et al. 1981a,b)
Trichobilharzia ocellata	Parasite		Phagocytosis, hemocytes density	(Van der Knaap et al. 1987)
LPS (*E. coli*)	Bacteria gram –	*in vitro*	Hemocyte density and viability, LPS-binding capacity	(Russo et al. 2008)
T. ocellata	Parasite	*in vivo*	spreading activity, hemocyte maturation and cell markers	(Amen et al. 1991b), (Amen et al. 1991a)

ciola hepatica, also known as the common liver fluke. Most digenetic trematodes ((*i.e.*, digeneans or flukes) need gastropods for the intermediate stages of asexual reproduction. More than 18 000 nominal species of digeneans are known, most of them being parasites of gastropods (van der Knaap and Loker 1990, Loker 2010). The second largest parasite-related human disease (after paludism) is the schistosomiasis caused by the trematode *Schistosoma mansoni*, a parasite of *L. stagnalis*. Fundamental understanding of *L. stagnalis* immune system upon parasitation is essential to tackle the disease threat (Coustau 2009), but it is also necessary in eco-immunotoxicology in order to interpret correctly the results. Indeed, when invaded by pathogens, the snail's internal defense system will trigger appropriate responses, including humoral and cellular responses. For example, Russo and Lagadic (2000) found an increase in the total hemocyte counts from *Lymnaea palustris* upon infection with the trematode parasite *Metaleptocephalis sp.*. In parallel, parasites interact intimately with the body tissues of their chosen host and modulate the immune status of this latter to overcome their own destruction.

Riley and Chappell (1992) reported that infection with the parasite *Diplostomum spathaceum* in *L. stagnalis* led to a shift in the proportion of hemocyte subpopulations, an unchanged hemocyte density, a reduced phagocytosis activity and most importantly a decrease in the hemolymph agglutinating capacity. Internal defence system was found to be modulated upon parasitation with the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata* (Amen et al. 1991b, Amen et al. 1992b). Van der Knaap et al. (1987) also had found important immunomodulations caused by *T. ocellata*. Nunez et al. (1994) found that bacterial clearance (*Aeromonas salmonicida*) was stimulated upon short-term (<5 h) and decreased at later times (> 24h) of infection with the parasite *T. ocellata* in *L. stagnalis*. Other studies revealed an up-regulation of the molluscan defense molecule (MDM) in *L. stagnalis* upon short term-parasitation (few hours) by *T. ocellata*, whereas it was down-regulated at later stages (Hoek et al. 1996). Similarly, the same parasite — in *L. stagnalis* — was found to upregulate granularin, an Ig-containing domain protein that is involved in opsonization (Smit et al, 2004). Worth is to note that techniques to maintain the entire lifecycle of the schistosome *T. ocellata* between *L. stagnalis* and the duck *Anas Platyrhynchos* has been described (Meuleman et al. 1984a,b). Last, Adema et al. (1994a) reported that both *S. mansoni* and *T. ocellata* are vulnerable to ROS from hemocytes NADPH-oxidative activity in *L. stagnalis* and that snail/parasite compatibility (*i.e.*, resistance) is rather importantly determined by the parasite' ability to modulate hemocyte behaviours.

The phenomenon by which parasites control their host immune responses to their advantage and the consequences on the snails are gradually being understood. Assessing the role of chemical pressure in such complex interactions is challenging. Nonetheless, it is essential to exclude biotic factors when an immunomodulation is observed, specifically for studies in the field. Thus, parasitism from an ecotoxicological viewpoint should be considered as a potential confounding factor. A parasite may interfere with the immune system. Xenobiotics cannot be easily linked to immunomodulation when the organism is parasitized (Minguez et al. 2012). The snail's immune system co-evolves with its parasites and probably with rising chemical pollution. Finally, parasitosis in *L. stagnalis* has been reported to modify other traits such as survival reproduction, growth and reproduction (McClelland and Bourns 1969, De Jong-Brink

1994, Puurtinen et al. 2004).

2.5. Innate, quasi-specific or quasi-adaptive immune system ?

Species that benefit from an adaptive immune system also possess an innate immune system; both types operate complementarily. The innate system has existed for much longer, proving its evolutionary success (Cooper and Alder 2006). The internal defense system (IDS) of invertebrates, and by extension of *L. stagnalis*, is commonly described as exclusively innate. Innate immune system provides an immediate response to invaders in a nonspecific way. It lacks of a long lasting protective effect that allows the adaptive immune system of vertebrate. Nevertheless, a type of adaptive system may be present and the dichotomous classification in invertebrates is often inappropriate (Arala-Chaves and Sequeira 2000, Yakovleva et al. 2001, Tirouvanziam et al. 2004). A vast scientific consensus excludes the possibility of characterizing the immune system of mollusks as "adaptive". For instance, no antibodies are found and there are no major histocompatibility complexes. In spite of the extensive description of mollusks' immune systems as "innate", it is not that simple (Loker et al. 2004). In many invertebrates, a certain form of memory is revealed exhibiting the phenomenon of priming (Sadd and Schmid-Hempel 2006). Alternative anticipatory IDS may be present. In gastropods, fibrinogen-related proteins (FREPs) that contain immunoglobulin superfamily (IgSF) domains are believed to constitute the molecular basis of such possible anticipatory systems (immune memory). For instance, a protein that contains Ig-domains has been identified in *L. stagnalis*, namely the MDM (mollusk defense molecule) (Hoek et al. 1996). *L. stagnalis*' IDS recognizes different PAMPs with a pathogen-dependent response. Hence, different signaling pathways are triggered according to the invader and the immune response is therefore adapted to the invader (Takeda et al. 2003, Akira et al. 2006, Rowley and Powell 2007). Hence, the immune system of *L. stagnalis* could be more accurately defined as innate-like quasi-specific immune system.

2.6. Functional vs non-functional immunomarkers

Of uppermost interest is the assessment of immunomarkers that will directly affect the immunocompetence of the organism. Indeed, such types of markers reflect the final defense capacity, whatever the context. Note that all functional immunomarkers are necessarily markers of immunocompetence (*e.g.,* phagocytosis), but all markers of immunocompetence are not necessarily functional (*e.g.,* hemocytes density/viability). Immunomarkers that are not markers of immunocompetence may provide information to apprehend the immunotoxicity more mechanistically (*i.e.*, pattern of immunotoxicity from a particular toxicant). This includes markers at the cellular level (*e.g.,* apoptosis, cell cycle, etc) and at lower levels such as proteomic or transcriptomic levels. Eventually, a more ambitious research project would be to implement markers that specifically identify a toxic insult representative of a class of pollutant that shares a similar action mechanism. For instance, quantification of hemocyte mRNA TLR genes seem good immunomarker candidates to characterize exposure of psychiatric drugs in *L. stagnalis* (Gust et al, 2013).

2.7. Variability and normality

Claude Bernard paved the basis of modern physiology by arguing the necessity of implementing the complexity of individual idiosyncrasy as the driving

paradigm of modern medicine. All types of biomarkers, including immunomarkers, do not circumvent the rule and the knowledge of marker's variability should be of primary concern. Ashton-Alcox and Ford (1998) reported a high variability of marine bivalve hemocytes immediately linked to individual differences in terms of metabolisms rather than ambient conditions such as temperature or food changes. In that regard, even well controlled laboratory model validation requires a broad statistical basis of the markers in order to address this variability and by extension to establish reference range of values for healthy organisms. For instance, in human immunology the massive acquisition of data for any of the common immune biomarkers has allowed a well-defined range of values to be established taking into account individual variability and multifactorial environmental pressures before a case can be declared as pathologic. The immune function is highly energetic-dependent (Little and Kraaijeveld 2004). Hence, trade-off may exist between life-history traits and the immune system; as a consequence, the latter may be greatly influenced by resource allocations. Seppala and Jokela (2010) questioned about the relative importance of abiotic environmental heterogeneity (*e.g.,* temperatures, food quality/quantity, etc) and genetic polymorphisms of different *L. stagnalis* populations in natural environments (as the results of biotic genetic trade-off with pathogen burdens of respective strains) on immune parameters. Food starvation resulted in a significantly lower hemocyte density and lower PO activity at the first day. At day 3 and 7, the PO activity remained drastically lower in the food starvation groups compared to the *ad libitum* groups, whatever the strain of snail considered. On the contrary, the hemocyte concentrations tend to balance at day 3 and then to counterbalance at day 7 where the food starvation groups had significant higher hemocyte concentrations than the *ad libitum* groups. Hence, this study proves the high importance of food quantity on immune parameters in *L. stagnalis*. The latters are affected to a different extent (*e.g.,* antibacterial activity fluctuated at a lower level of magnitude) and the trends are time-dependent, suggesting physiological feedbacks. Furthermore, the mean differences between snails populations coming from different locations in natural environments were quite important, whereas the intrapopulation variability remained quite similar each other's. In spite of the above, more experiences and data are required in *L. stagnalis* regarding the immunomarkers variability. In particular, how the hemocyte densities may vary between different populations, different organisms within the same population (*i.e.*, inter-individual variability), the time-course variability within one snail (*i.e.*, intraindividual variability) ? How well are we able to understand this variability, to handle it and to take it into account for eco-immunotoxicological studies ?

2.8. Convenience of methods

Depending on the type of research conducted, the method used should be adapted. Management of the environment is a paramount issue that requires discussions with stakeholders (politicians, citizens, private companies etc.). Methods used on a regular basis should be robust, easily understandable, cost/time-efficient and environmentally friendly. Only methods matching these aspects can be implemented for routine biomonitoring. Mamaca et al. (2005) highlighted the necessity to have practical and time-efficient tools in ecotoxicology for biomonitoring purposes, in case of chemical spillage for instance. Automatic techniques with standardized

methods in flow cytometry may be of great value in that regard. Emerging methods in ecotoxicology require inter-laboratory cross validation in order to achieve harmonization for data comparison. Although this is a huge challenge, time-consuming and beyond the scope of most research, any efforts made in that direction would be beneficial in the long-term.

3. The pond snail in environmental immunotoxicology

3.1. ecological relevance

Mollusks are the second largest invertebrate phylum (≈ 8% of metazoan species, below arthropods ≈ 75%), which supports their numerical importance in wildlife and the idea of their own evolutionary success (Van der Knaap W.P.W 1993, Loker 2010). Nonmarine mollusks are one of the most endangered group threatened by extinctions (Lydeard et al. 2004). Freshwater snails encompass up to 60% of invertebrate biomass in some lentic ecosystems (Russel-Hunter 1983, Lagadic et al. 2007b). The pond snail *Lymnaea stagnalis* is a pulmonated gastropod mollusk, order of basommatophora. It is a widespread species stretching throughout Europa and North America (*i.e.*, Holarctic distribution) in freshwater lentic ecosystems such as pond, lake and rivers characterized by a low water flow. They can be found particularly in macrophytes growing on land shores. They are ectotherm and bimodal breather (both aerial and cutaneous). They regularly come to the surface, open their pseumostome (respiratory orifice) and close it to go back down (Lukowiak 2003). They feed by using a tongue-like structure covered by rows of rasping teeth, namely the radula. Vegetal compounds, such as periphyton or macrophytes, represent the main source of nutrients. Nonetheless, they can feed on animal detritus or eventually become cannibals eating their own congeners in times of food scarcity. Hence, they have an important role in the transfer of energy. Many animals are potentially predators of *L. stagnalis* : mammals, fishes, birds, leeches, flatworms, crayfish and fish from the Centrarchidae family (Lagadic et al. 2007b).

3.2. transdisciplinary researches

L. stagnalis benefits from an increase in fundamental knowledge in the fields of developmental biology (Van Duivenboden et al. 1985, Meshcheryakov 1990, Voronezhskaya et al. 1999, Hohagen and Jackson 2013), genomics/transcriptomics data (De Lange et al. 1997, Feng et al. 2009), parasitism (Van der Knaap et al. 1987, Amen et al. 1991b, Loy and Haas 2001, Puurtinen et al. 2004) and neurobiology (Cox et al. 1997, Lukowiak et al. 2003, Martens et al. 2007, Sadamoto et al. 2012). Much research has been conducted in this regard (model organism in Neurobiology), unraveling cognitive behavioral processes such as locomotion, feeding, respiration, reproduction, learning and memory. Several researches about nicotinic acetylcholine receptors and activities have been conducted, although not with an ecotoxicological viewpoint (Chemeris et al. 1982, van Nierop et al. 2006, Vulfius et al. 2013). Such approaches could help developing neurotoxicity tests for contaminants such as neonicotinoides. *L. stagnalis* has been also studied in ecology (Berrie 1965, Brown 1979, Zonneveld and Kooijman 1989, Elger and Lemoine 2005, Koene et al. 2006, Dalesman et al. 2007).

3.3. Lymnaea stagnalis in ecotoxicology

L. stagnalis has been extensively studied in ecotoxicology, using very diverse endpoints and experimental

designs. Briefly, this species is suitable for the study of bioconcentration/bioaccumulation/elimination (Elangovan et al. 1997, Legierse et al. 1998, Coeurdassier et al. 2003) features and tissue or subcellular distributions of many pollutants (Legierse et al. 1998, Coeurdassier et al. 2003, Desouky 2006). Many laboratory studies have been conducted to assess the effects of both acute and chronic exposures to pollutants on life history trait (Coeurdassier et al. 2003) such as growth and reproduction (Gomot 1998). Evolutionary or adaptive insights to anthropogenic effects among wild and laboratory-bred populations have been realized as well as comparisons of population sensitivities or multi-generational investigations in xenobiotic contamination contexts (Coutellec and Lagadic 2006, Coutellec et al. 2013, Bouétard et al. 2014, Côte et al. 2015). Modelling has been developed to understand diquat impact on *L. stagnalis* populations (Ducrot et al. 2010a). Model contaminants such as TBT, 4-nonylphenol, DDT, dihalogenated biphenyls or lindane were used as typical case studies (survival, histopathology of epithelial tissue, growth, reproduction, fecundity) (Seugé and Bluzat 1983, Wilbrink et al. 1987, Woin and Brönmark 1992, Czech et al. 2001, Leung et al. 2007). The effect of emerging contaminants such as nanomaterials has also been evaluated (Harley 2008, Hudson 2013, Oliver et al. 2014). Combined action of nonylphenol polyethoxylate adjuvant with/without herbicides fomesafen (Jumel et al. 2002) or diquat (Coutellec et al. 2008) on reproductive performances in *L. stagnalis* have been evaluated. Effect of food quality on *L. stagnalis* sensitivity to toxic insults was investigated (Reátegui-Zirena et al. 2016). Behavioral dysfunctions (locomotion, feeding) resulting from lead exposures have been reported (Pyatt et al. 2002). Physiological effects have been reported — and notably hemolymph acidosis phenomenon —- due to copper exposures to relatively moderate exposure concentrations (Brix et al. 2011). Not only partial life-stage (Coeurdassier et al. 2004) but also full-life cycle toxicity tests, (Grosell et al. 2006, Leung et al. 2007, Ng et al. 2011, Brix et al. 2012), have been broadly implemented to assess the toxic impact of chemicals. Early life-stage tests with *L. stagnalis* have been promoted to assess water quality (Munley et al. 2013). Embryotoxicity tests have been developed (Bandow and Weltje 2012). *L. stagnalis* is a hermaphroditic species that can mate in either the male or female role (one role is performed at a time) and this snail appears particularly suitable for the study of effects of pollutants on reproductive outputs (oviposition, number of eggs per clutches, fecundity, egg abnormalities, etc.) and more specifically toward endocrine disrupting chemicals (EDCs) (Czech et al. 2001, Lagadic et al. 2007, Ducrot et al. 2010b, Giusti 2013, Giusti et al. 2014). Other endpoints include hatching success (Gomot 1998) and progeny early performances (Coutellec et al. 2008). An OECD reproductive toxicity test guideline has been recently validated (Ducrot 2014, Charles et al. 2016). Further life history trait endpoints have been investigated, such as shell length/quality caused by pesticide exposure (Seugé and Bluzat 1979) or radioactive exposure (Zuykov et al. 2011). Laboratory studies were performed with this species as well as outdoor experimentations (Jumel et al. 2002, Coutellec and Lagadic 2006, Nélieu et al. 2010).

3.4. immune characteristics

L. stagnalis possesses an open immune system (circulatory system not closed within continuous endothelial vessels). The circulating immunocompetent cells are called hemocytes. They constitute the building block

of immunocompetence to fight against intruders (fig.2). In addition, *L. stagnalis* benefits from fixed cells that are also involved in immune defense: (i) endothelial cells lining the hemolymph with lectin-like receptors that trap the microbes and thereafter are internalized by circulating hemocytes, (ii) pore cells, also known as rhogocytes (connective tissue), that carry out pinocytosis of foreign protein and (iii) phagocytic reticulum cells (Van der Knaap W.P.W 1993). However, the role of fixed cells in the immune biology of *L. stagnalis* is not well understood and the vast majority of immunological studies focus on hemocytes. Pathways involved in the regulation of haematopoiesis or hemocytopoiesis are badly understood. The location of hemocyte production, their lifespan and the distinct lineages are also not well understood. An amebocyte producing organ (APO) has been identified in few snails (*e.g., Biomphalaria glabrata* and *Lymnaea trunculata*). However, this organ would not be fully involved in the production of hemocytes and peripheral vascular location may be implied (Loker et al. 2004). To date, none of such organ has been identified in *L. stagnalis*. Authors suggest that the hemocytopoiesis in *L. stagnalis* is originated from connective tissues at different locations and then hemocytes have the ability to divide all along their physiological lifespan (Sminia 1974).

L. stagnalis is of great interest in eco-immunotoxicology, in particular because of the ease of hemolymph extraction. It can be performed by using a simple micropipette. When gently stimulating the foot sole of the snail, a reflex mechanism is triggered (response to simulated predation signal) leading to its retraction into the shell and the straightforward extrusion of hemolymph through the hemal pore (Sminia 1972). Moreover, this technique is non-invasive; hemolymph collection can be performed several times on the same snail without killing it. In addition, the quantity is sufficient (approximately 500 μl for 30 mm shell-length snails) to have an individual approach instead of pooled hemolymph samples and assess various immune endpoints per organism at a time (personal observation).

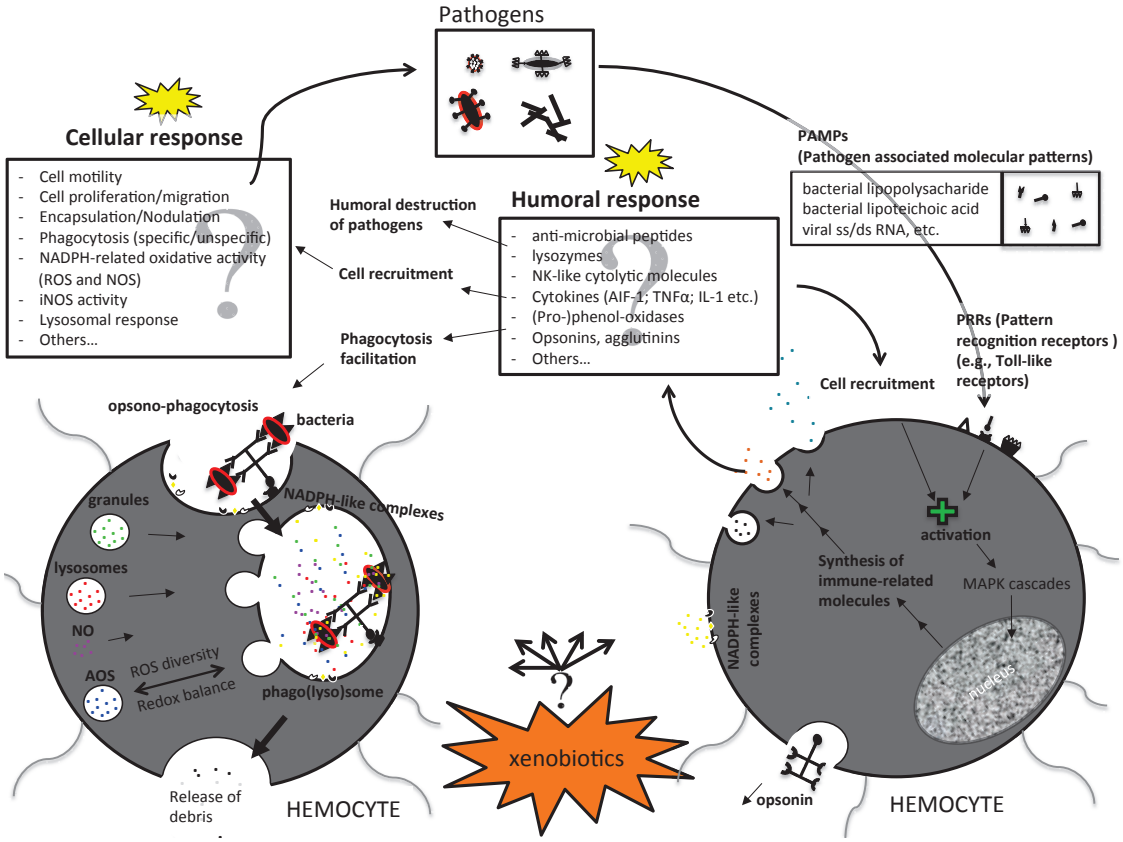


Figure 2: Schematic and simplified immunoresponses via hemocytes in the great pond snail

Abbreviations: AOS: anti-oxidant system; NO: nitric oxide; iNOS: inducible nitric oxide synthase; ROS: reactive oxygen species; RNS: reactive nitrogen species; AIF-1: allograft-inflammatory factor-1; TNF-α : tumor necrosis factor, IL-1 : interleukine-1 ; MMD: molluscan defense molecule; NK-like: natural killer-like.

For better clarity, the figure 2 represents two hemocytes, although all events may occur on the same hemocyte depending on the maturation status. Cell maturation is likely involved in the difference between hemocyte functions in L. stagnalis. Pathogens secrete molecules uniquely found in microbes called pathogen-associated-molecular-patterns (PAMPs). They will be recognized as non-self by specific anchor membrane receptors, namely the pathogen recognition receptors (PRRs) such as the family of Toll-like receptors. Subsequently, the signaling message will be transduced, leading to the secretion of immune-related molecules into the extra-cellular environment (humoral response). Some molecules will directly destruct the pathogens in the humoral fraction (*e.g.,* AMPs and NK-like cytolytic molecules); some will entomb them in a capsule (POs); some will facilitate the phagocytosis to other hemocytes (*e.g.,* opsonins and agglutinins); some will activate/recruit further hemocytes to promote the cellular response (*e.g.,* cytokines). Hemocytes may cooperate according to the size of the intruder (*e.g.,* nodulation vs encapsulation). The phagocytosis constitutes the driving force of the immunoresponse. Once internalized (phagosome), the microbe will be destructed mainly by ROS generated from anchor NADPH-like oxidative activity and by lysosomal hydrolytic enzymes. The anti-oxidant system has a prominent role to ensure ROS diversity and to counterbalance the redox state. Xenobiotics may positively or negatively interact with any cell components, secreted immune-related molecules and intruders.

4. Markers of immunotoxicity in *L. stagnalis*

There are many definitions of the term "biomarker". They are usually specific to the application domain, although share similar features (*e.g.,* medecine *vs* toxicology *vs* ecotoxicology). Biomarker is a portmanteau of biological marker. In ecotoxicology, Newman (2003) defined a biomarker as "a cellular, tissue, body fluid, physiological or biochemical change in extant individuals that is used quantitatively during biomonitoring to either imply the presence of significant pollutant" (*i.e.*, exposure biomarkers) "or as an early warning system of imminent effects" (*i.e.*, health biomarkers) . In the following section, we present and discuss the characteristics of immunomarkers already used in eco-immunotoxicology in *L. stagnalis* or in other aquatic mollusks that can be adapted to *L. stagnalis*. The table 3 below aims at proposing characteristics of immunomarkers. They will be presented one by one in the following subsections in the order of the list from the table 3.

Table 3: Categories of immunomarkers

Physiological function	Localization	Level of measurement	Mode of measurement	Type of measurement	Marker
Immune system (immunomarker)	cellular fraction	cellular	non-functional	health/exposure?	hemocyte density
			non-functional	health/exposure?	hemocyte viability
			functional/non-functional	health/exposure?	lysosomes
			non-functional	health	hemocytes subpopulations
			functional	health	cell motility, focal adhesion and spreading capacity
			functional	health	phagocytosis
		molecular	functional/non-functional	health	anti-oxidant system
	cellular/humoral fraction		functional	health	ROS and oxidative immunocompetent activity
			functional/non-functional	health	nitric oxide
	humoral fraction		functional	health/exposure?	phenol-oxidase activities
			functional	health	NK-like cytotoxic activity
			functional	health	anti-microbial activity
			non-functional	?	cytokines
			non-functional	?	opsonins

To present characteristics of biomarkers, the more information, the better. Biomarkers directly/indirectly linked to immune cells are immunomarkers, regardless the specificity in the immune function. Immunomarkers may correspond either to the humoral or cellular fraction. In the humoral fraction, they are necessarily molecular, whereas the ones from the cellular fraction may be either cellular or molecular. They may be functional or not; this depends on the method of measurement implemented. For instance, the oxidative activity is a functional immunomarker from at the interface of the cellular/humoral fraction and performed at the molecular level (measurement of ROS production). However, the quantification of mRNA from enzymes responsible for this activity will be immunomarkers from the cellular fraction, performed at the molecular level and non-functional, although both markers correspond to the same cellular function. The immunomarker may reveal health weakening (health biomarker) or reveal the presence of pollutants (exposure biomarkers). It may also be both, which is more desirable as an environmental biomarker. Note that the classification into proper "exposure" biomarker have been used herein according to the quantity of information available in the literature where frank modulations have been observed when dealing with chemical pollutant exposures.

4.1. Hemocyte density

Hemocyte density is the most common assessed immunomarker endpoint to determine the immunocompetence of aquatic molluscan species. Often, the total hemocyte count (THC) is mentioned instead of hemocyte density/concentration. In *L. stagnalis*, the quantity of hemolymph increases with the snail size as the hemocyte density increases (Van der Knaap W.P.W 1993). The quantity of hemolymph is very variable even with a calibrated batch of snails (personal observation). It has been observed that toxic insults at environmentally-relevant concentrations resulted in an increased hemocyte density (Russo and Lagadic 2004, Russo and Madec 2007, Gust et al. 2013a, b, Boisseaux et al. 2014). The individual variability of hemocyte density is a crucial parameter when interpreting results. They may vary intra-individually with time, even within a population that has close morphometric characteristics. Differences in density may be the result of fluctuating physiological status, genetic differences, ambient conditions, etc. Furthermore, as presented above, when population are parasite, results should be interpreted with caution. Clarification is needed to explain the increment in hemocyte density that has been observed when snails were exposed to low environmentally-realistic concentrations of some chemical pollutants. In any case, a sharp decrease in hemocyte density reflects an immunosuppression (Boisseaux et al. 2014). It is commonly admitted that deep impairment of hemocyte ressources is a sign of unbalanced health condition —- at the exception of haemocytoponia — that alerts a likely imminent mortality. However, one difficulty in environmental immunotoxicology lies in detecting subtle sublethal effects (*e.g.,* slight hemocyte density variations) due to low environmental contaminant exposures (Brousseau P. et al. 1998a).

4.2. Hemocyte viability

As a matter of fact, hemocytes may not be viable and so cellular viability assessment should be associated to cell density analysis. Xenobiotics may weaken hemocytes and consequently induce directly cell mortality by necrosis or apoptosis. Russo et al. (2007) reported that hemocyte viability was not affected by exposures of the pesticide fomesafen (up to 270 $\mu g.L^{-1}$ of nominal concentration for 504 h), what suggests a low sensitivity of this endpoint toward contamination. However, underlying effects likely occurred since in another study, Russo and Madec (2007) reported an activation of the hemocyte apoptotic program resulting from fomesfen exposures. This confirms the subtleties of immune resource impairment when snails are exposed to pesticides. Jumel et al. (2002) had found that long-term (170 days) mesocosm exposures to fomesafen (repeated contaminations at 40 $\mu g.L^{-1}$) reduced reproductive performances. Hence, doors are still open regarding possible precocity of occurrence of hemocyte mortality/apoptosis increases over such long time of exposure (early warning markers). Exposure of xenobiotics may also indirectly induce apoptosis in a multistress context : apoptosis would occur in hemocytes that do not efficiently purge the cell from the invader (*e.g.,* bacteria), whereas in the unstimulated/unchallenged status, apoptosis does not occur as a result of the unique action of xenobiotics. Anyhow, a depletion of hemocyte viability will reflect immunotoxicity, as it has been observed in *L. stagnalis* with an anti-cancer drug exposure at non-environmentally realistic high concentrations (100 and 1000 $\mu g.L^{-1}$) (Boisseaux et al. 2014).

4.3. Lysosomes

Lysosomal integrity is assessed, among others, in cytotoxicological studies (*e.g.,* nanomaterials' emerging products) (Lammel et al. 2013) and as an early warning marker of pollutant contamination in ecotoxicology (Galloway and Depledge 2001). Damaged lysosome membranes will release hydrolytic enzymes into the cytosol and subsequently promote mitochondrial oxidant production, resulting in apoptosis (Zhao et al. 2003). Lysosomes are particularly important in immune cells in order to destruct the phagocytized microorganism (phagolysosomes) (fig.2). Mamaca et al. (2005) emphasized the relevance of this marker on mussels' immune cells in biomonitoring contexts. Lysosomal membrane stability (LMS) using neutral red retention principle and observation by microscopy gained extensive attention (Lowe et al. 1995, Broeg et al. 2002, Canesi et al. 2007). Other techniques involving spectrofluorescence microplate readers may be more suitable, as it has been already performed on *L. stagnalis*' hemocytes by Russo et al. (2009) to assess the immunotoxic effect of the herbicide atrazine. Moreover, Bado-Nilles et al. (2013) reported that flow cytometry is a practical tool to quantify accurately lysosomal presence/membrane integrity on fish blood cells such as the three-spined stickleback (*Gasterosteous aculeatus*).

4.4. Hemocytes (sub)populations

In *L. stagnalis*, hemocytes resemble human monocytes/macrophages; visually they are typical phagocytes or eventually amebocytes. Morphological differences range from small hemocytes (approximately 8 μm of diameter) with a high nucleus-to-cytoplasm ratio to large hemocytes more differentiated (approximately 20 μm) with a low-nucleus-to cytoplasm ratio (Van der Knaap et al. 1993). No broad consensus exists on hemocyte types/subtype classifications in *L. stagnalis*. Some authors classify them into round cells and granulocytes (Russo and Lagadic 2004). Others classify them into round cells, intermediate hemocytes and spreading hemocytes (Riley and Chappell 1992). Some researchers describe the hemocytes as one cell type (one population) with three subpopulations (Dikkeboom et al. 1989, Van der Knaap et al. 1993). Morphological heterogeneity would be the result of maturation/differentiation states. Mohandas et al. (1992) reported the difficulty of distinguishing subpopulations using only morphology and internal complexity by conventional microscopy methods. The use of epitope-binding antibodies revealed at least three subpopulations in *L. stagnalis*. The percentage varied among juveniles and adults, suggesting a maturation of cells with age that is accompanied by a differentiation in their membrane epitopes. The percentage of young, undifferentiated hemocytes in juvenile *L. stagnalis* was higher than in adults. These cells exerted higher proliferative activity but lower phagocytic activity and less lysosomal extent. They displayed a variation of spreading activity onto a glass substrate. The cytoplasm diameter increases as the snail matures. It also increases when snails are subjected to a parasitic infection (Amen et al. 1991b). Among the subpopulations, differences in lysosomal enzymes have been demonstrated (Mohandas et al. 1992). Flow cytometry techniques are very promising for quantitative and brief qualitative analysis. Indeed, the forward scattering (FSC)/side scattering (SSC) signals acquired with the flow cytometer prevail by far the cell type discrimination (*i.e.*, cytograms) without requiring any external treatment and/or coloration. FSC provides information on the size of the cell and

SSC on the internal complexity that is interpreted by extension as the cellular granularity. Discrepancies exist among aquatic mollusks (mainly oysters, mussels, abalones, snails) regarding the self-sufficiency of flow cytometry to quantify (sub)populations of hemocytes. Furthermore, different cell handling within a protocol may be the source of disparate results among authors. For instance, even at low rpm, it must not be excluded that centrifugation of hemocytes leads to intracellular rearrangement and consequently the signal output observed on the acquisition systems is different from the circulating/physiological status of the cells (Taylor et al. 2009, Donaghy et al. 2010). Similarly, addition of a buffer solution may modify hemocyte shapes (*e.g.,* molality differences, anti-aggregate molecules, etc).

4.5. Cell motility, focal adhesion and spreading capacity

Cell motility is very important for the immunocompetence of the organism since it will determine the capacity to reach a target (pathogen), realize phagocytosis, cooperate efficiently (*e.g.,* encapsulation), etc (fig. 1). The adhesion capacity of the hemocyte and spreading capacity, which are somehow inter-linked, are additional markers worth taking into account when determining the snail's immunocompetence. The underlying molecular events regulating cell motility and how it operates in *L. stagnalis* remain poorly understood and more studies are required. Plows et al (2006) demonstrated the importance of focal adhesion kinase-like proteins phosphorylation in the adhesion process of *L. stagnalis* hemocytes. This was further confirmed by J. Walker et al, (2010). They observed the concomitant phosphorylation events of protein kinase C molecules (PKC) and focal-adhesion kinases (FAK)-Src proteins complexes with adhesion states of *L. stagnalis* hemocytes. Many reports dealing with *L. stagnalis* observed a monolayer formation of hemocytes after addition onto 96-well plate within minutes. Further washing steps appeared to remove some of the cells, but most of them adhere to the well bottom substrate. Finally, the spreading size has been studied in *L. stagnalis* (Van der Knaap et al. 1987), which was reported to be increased after parasitic infection. Tests were conducted on bivalves in order to assess cell motility. Once on a substrate (*e.g.,* petri dish), hemocytes can be tracked using microscopy photography, which is subsequently compiled to form video-motions (Le Foll et al. 2010, Rioult et al. 2013). Additional nuclear fluorescent dyes were reported to improve the observations. Therefore, this endpoint deserves development in *L. stagnalis* since few studies have so far focused on it in bivalves. Hemocyte video-tracking may help to determine *L. stagnalis* immunocompetence.

4.6. Phagocytosis

Phagocytosis activity can be considered as the driving force of the immune response against pathogen invasion and as such should be a prioritized marker of immunocompetence to consider (fig. 2). It has been massively studied in invertebrates and several reports have already focused on *L. stagnalis*. Toxicants that impede phagocytosis from operating correctly against an intruder will increase its susceptibility to contract a related disease. Moreover, in the scope of emerging pollution, phagocytosis may be particularly important (*e.g.,* sequestration of nanomaterials such as graphene nanoplatelets or microplastics). For example, it has been observed that hemocytes from marine bivalves were affected by carbon nanomaterials (Canesi et al. 2008, Canesi et

al. 2012). Many techniques have been used to assess the phagocytosis. For instance, the most common technique is the flow cytometric measurement of fluorescent latex microbeads that are engulfed by hemocytes (Gust et al. 2013a, b). Protocol differences correspond to the diameter of beads, the number of beads exposed and the incubation time. The difficulty lies in determining the best hemocyte-to-bead ratio. Too many beads will lead to high noise background and possible overestimation of the phagocytosis. After the incubation time, beads may stick on hemocyte membranes, although they are not internalized and can interfere with signal output used to quantify the phagocytosis. Too few beads may result in underestimation of the phagocytosis activity. Hence, they should be in excess, but not too much. Other flow cytometric techniques include the measurement of fluorescent-labeled bacteria phagocytized by hemocytes (Russo and Lagadic 2004). Phagocytosis can also be semi-quantified by spectrofluorometry: once the cells attach to the bottom of wells, fluorochrome-conjugated bioparticles are added, incubated, then washed, thereby removing extracellular unphagocytized bioparticles and the fluorescence is measured (Plows et al. 2004). The phagocytosis activity of *Lymnaea stagnalis*' hemocytes was reduced following atrazine exposures (10-100 $\mu g.L^{-1}$) (Russo and Lagadic 2004). At 10 $\mu g.L^{-1}$, phagocytosis at 24h and 96h was importantly reduced compared to controls while it recovered and difference was not statistically significant after 504h of exposure. After 96h of toxicant exposure, an increase with dose-response pattern occurred from 10 to 100 $\mu g.L^{-1}$ range, whereas a decrease, also in a dose-response pattern occurred at these range of concentration. However, most of toxicant-exposed groups were below control levels. Russo et al. (2007) also observed a decrease in the phagocytosis activity following 24h and 504h exposures to the pesticide fomesafen from 30 to 270 $\mu g.L^{-1}$. However, no dose-response pattern occurred and the difference between 24h and 504h are not considerable. Gust et al. (2013a) observed a slight increase in phagocytosis capacity following short-term exposures to a mixture of pharmaceuticals at environmentally-realistic concentrations, compared to controls. These studies suggest that phagocytosis activity could be implemented in environmental immunotoxicology with *L. stagnalis*, but trends in terms of time of exposure, concentrations and recoveries are not well understood. Also, an additional problem could be the lack of harmonized methods between studies (Brousseau P. et al. 1998a,b).

4.7. Anti-oxidant system (AOS)

The non-functional characteristic is referred to the measurement of thiol groups but may vary according to another considered endpoint as for instance activity of enzymes from the AOS which are more "functional". The anti-oxidant system (AOS) is intricately involved in hemocyte immunocompetence at two levels. First, it will guarantee the ROS diversity (different type of ROS may have different destructing power according to the ultrastructure of the pathogen considered) (fig. 3 and 4). The initial O2 from NADPH-oxidase activity is subsequently converted into the diverse ROS through the web of enzymes that constitute the anti-oxidant system. Second, it tends to counteract the detrimental ROS production by reestablishing the ROS balance (Valavanidis et al. 2006), being thereby responsible for the redox homeostasis of the cell (fig. 3 and fig.4). Note that secondary reactive oxidant species may result from ROS interactions with NO (nitric ox-

ide) leading to very reactive species such as $ONOO^-$ (peroxynitrite) (RNOS, reactive nitrogen oxide species), a highly powerful bactericide and so deleterious compound to the cells (fig. 4). As mentioned before, a defective AOS can lead to chain reactions that will result in hemocyte mortality (fig. 3). Thioprotein and generally speaking thiol groups or sulfhydryl groups (-SH) are molecules, among other functions, involved in the redox balance of the cells and therefore have a key role in immune function. In *L. stagnalis*, Thiol groups from hemocytes have been evaluated after short-term exposures to pharmaceuticals and/or water river samples nearby waste water treatment plants (WWTP) (Gust et al. 2013a, b) (fig. 4). The results were significantly affected by environmentally realistic concentrations of hypolypemic, antibiotic pharmaceuticals and WWTP contaminated groups. High signals outputs obtained on flow cytometers using CFMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) as fluorescent probe of thiol groups comfort the fact that this technique allows quantification of AOS. In sum, markers of the AOS are compelling in eco-immunotoxicology, particularly because of the close relationship of phagocytose – NADPH-activity – AOS.

4.8. ROS and oxidative immunocompetent activity

The ROS paradigm is widespread in toxicology as an indicator of cellular toxicity (Valavanidis et al. 2006, Lammel et al. 2013). Many pollutants interact with cell ultrastructures and damage the components leading to intracellular ROS generation that will be detrimental because of their high reactive capacity (oxidative stress) (Valavanidis et al. 2006) (fig. 3 and 4). Hence, a defective anti-oxidant system (AOS) will lead to a chain reaction. For example, ROS generation has been suggested to be the toxic mechanism of the pesticide fomesafen into hemocytes of *L. stagnalis* (Canesi et al. 2007). In parallel, the rise of ROS in hemocytes may be an indicator of the animal immunocompetence as long as it is associated with the immune function, likely NADPH-complexes in *L. stagnalis* (see below). If this function is hampered, then the consequent immunotoxicity may result in pathological situations (fig. 3). One of the most remarkable features of immune systems through many species is the capacity of phagocytes to produce diverse forms of oxidizing agents in order to destruct invaders. In many species, the production of ROS from immune cells in response to an antigen is associated with an abrupt but transient rise in oxygen consumption: for this reason the metabolic event by which they are generated is called respiratory burst. However, this phenomenon well observed in vertebrates may not be transient and the increased basal-stimulated fold intensity is much lower in marine bivalves and the term oxidative burst could not be appropriate (Donaghy et al. 2009, Donaghy et al. 2015). For better clarity, we recommend to use the generic term immunocompetent oxidative activity for aquatic mollusks instead of oxidative burst. The NADPH oxidase catalytic complexes (also called respiratory burst oxidases) are most often believed to be responsible for this activity. These enzymes are activated when the cell is exposed to appropriate stimuli such as pathogen-associated-molecular patterns (PAMPs) and cytokines: the phenomenon is inducible (Babior et al. 1997, Hahn et al. 2000, Donaghy et al. 2012). On the contrary, the constitutive ROS production in hemocytes of aquatic mollusks is believed to be originated mainly from mitochondria, reticulum endoplasmics and peroxisomes (Donaghy et al. 2012, Donaghy et al. 2015). In *L. stagnalis*, the implication

of NADPH-oxidases in the immunocompetent oxidative activity phenomenon was suggested by Adema et al. (1993). Hemocytes from *L. stagnalis* produce diverse form of ROS and this production can be stimulated by various elicitors, of which zymosan elicited a strong induction (Dikkeboom et al. 1987). The "oxidative burst" has been evaluated in *L. stagnalis* and has been reported to be inducible by *E. Coli* and PMA ; exposure of the herbicide fomesafen (10-270 $\mu g.L^{-1}$) reduced the capacity of hemocytes to unleash this activity following 504h and 24h for E.Coli and PMA stimulations, respectively (Russo et al. 2007). However, reductions were weak and did not follow dose-response patterns. Similar results have been obtained with atrazine exposures (10-100 $\mu g.L^{-1}$) (Russo and Lagadic 2004).

4.9. Nitric oxide (NO)

NO plays a prominent role in immunity as a toxic molecule to fight intruders (fig. 2). It is responsible for the formation of reactive nitrogen species (RNS), such as peroxinitrite. This potent bactericide is capable of modifying cellular components and depleting anti-oxidant defenses. NO also contributes to the destruction of pathogens and therefore to the success of the immune response. However, it may also be deleterious to hemocytes at high concentrations. Furthermore, NO plays a prominent role in hemocyte communications (growth, activity, death) but this is poorly understood in invertebrates. In *L. stagnalis*, the Lym-nNOS has been identified and cloned (Korneev et al. 1998, Korneev and O'Shea 2002). NO generation upon immune challenge has been described in crustaceans (*e.g.,* giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii) (Raman et al. 2008), bivalves Mytilus galloprovincialis (Tafalla et al. 2002, Novas et al. 2007),

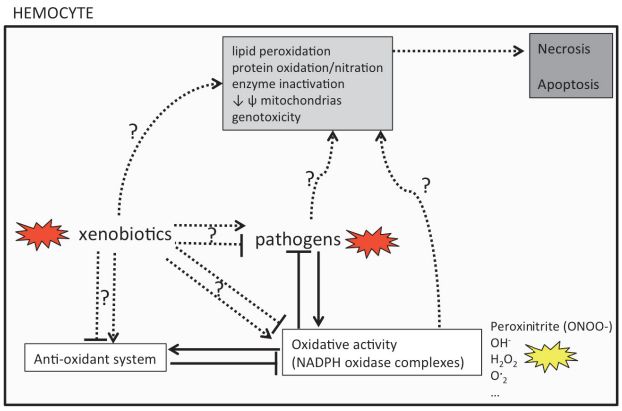


Figure 3: Normal and pollutant-disturbed relationships with regards to oxidative activity and AOS in gastropods' hemocytes

Legend: arrow = "event will lead to"; ⊣ symbol = "inhibits"; solid symbol or arrow = "normal situations"; dotted symbol or arrow = "pollutant-disturbed situations"

In hemocytes, NADPH-oxidative activity (OA) and AOS (anti-oxidant system) are functioning complementarily. On the one hand, pathogens will stimulate, in a cascade of events, both OA and AOS, but at the same time the pathogen can generate deleterious cellular effects leading to cell death. On the other hand, xenobiotics can have deleterious (or possibly beneficial effects) to both the AOS and the OA, and other cell systems (*e.g.*, nucleus) but as well directly to the pathogen.

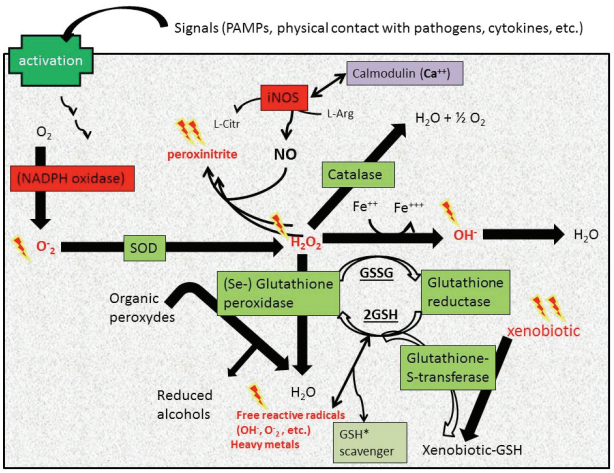


Figure 4: Schematic and simplified representation of the PAMPs-related ROS generation and fate through the anti-oxidant system (AOS) in a molluscan hemocyte

Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) will be recognized by hemocytes. As a result, the NADPH-oxidase activity will be induced; it will catalyse the transformation (reduction) of O_2 to the O_2^-. The latter may be converted into intermediate ROS and finally into non-detrimental oxygen species (*e.g.*, H_2O) through the anti-oxidant system that mainly comprises the superoxide dismutases (SOD), the catalases and the glutathione peroxidases/reductases. The reaction of H_2O_2 with intracellular NO (nitric oxide) will result in peroxinitrite, a highly reactive bactericide.

Crassostrea gigas (Nakayama and Maruyama 1998, Lambert et al. 2007), gastropods, e.g. the freshwater snail *Viviparus ater* (Conte and Ottaviani 1995). Torreilles and GuÉRin (1999) observed that hemocytes from the mussel Mytillus galloprovincialis generated peroxinitrite (ONOO-) upon *ex vivo* stimulation with zymosan. In *L. stagnalis*, Wright et al. (2006) studied NO production after *ex vivo* hemocyte immunostimulation. They observed a clear increase of NO production upon stimulation by PMA, the β-1,3-glucan laminarin or zymosan as immunostimulants. Negative control using NOS inhibitors (L-NAME and L-NMMA) corroborated the observation. Gust et al (2013a) observed an increase in two isoforms of NOS mRNA from *L. stagnalis* hemocytes under short-term exposure of hypolipemic and antihypertensive pharmaceuticals. Hence, development to assess NO generation performance in *L. stagnalis*' hemocytes could be implemented in environmental immunotoxicology.

4.10. Phenol-oxidase activity

Phenol-oxidase (PO) activities play a pivotal role in animals innate immunity. Phenoloxidases catalyse the oxidation of tyrosine residues present onto bacterias/parasites that lead, after intermediate reactions, to their melanization. Once melanized, the motility of the entombed intruder is reduced and the phagocytosis by hemocytes is facilitated. As a recall, melanin corresponds to the final product (hydrophobic pigment of high molecular weight which is negatively charged and arranged in concentric layers) resulting from the non-enzymatic polymerization of the PO-enzymatically oxidized tyrosine residues present onto bacteria/parasites. Noteworthy, the PO is not involved only in innate immunity but as well in other physiological functions such

as sclerotization, shell/tissue repair, energy transducers. The role of PO in eco-immunotoxicology, and by extension that of melanins is poorly understood. The capacity of melanin to interact with drugs was demonstrated (Bridelli et al. 2006). Melanin is reported to bind to PAHs, cocaine and amphetamines, chemotherapeutics and diazepines (Ings 1984, Roberto et al. 1996, Svensson et al. 2003). Carboxyl, phenolic hydroxyl, and amine groups of melanins are all potential biosorption sites to heavy metals (Rizzo et al. 1992, Fogarty and Tobin 1996). In addition to this adsorption, the concentric and multilayered arrangement of melanin particles typically encountered was suggested to be designed as tight enough to inhibit drugs diffusion but sufficiently spacious for smaller compounds such as nutrients. As a result, the melanin capsule may protect the pathogen from biocidal molecules (*e.g.,* ROS, AMPs, xenobiotics) and from the host's own tissues against toxic insults (*e.g.,* chemical pollutants) and microbial aggressions (toxins stopped by the capsule if tight enough). Hence, melanin confers a survival advantage to the pathogen by reducing its own susceptibility to the host molecular antimicrobial defenses (*e.g.,* ROS and RNS) (Nosanchuk and Casadevall 2003). Thus, a major strategy of drug development (*e.g.,* antibiotic and anti-cancer drugs) to ameliorate the human clearance of pathogens is to target/inhibit the PO activities (Nosanchuk and Casadevall 2006). However, it is commonly agreed that pathogens trapped into melanin capsule are more easily phagocytized; in this respect, melanization decreases the microbe survival and participates actively in the efficiency of the immune response. In natural environments, complex cross-talks are likely to take place between the types of chemicals encountered, the types of pathogens and the snail species (fig.5). PO activity may respond to both PAMPs and toxicants. It seems that modulation of PO-like activity into invertebrates upon xenobiotic stress follows different trends (*i.e.*, increasing/decreasing) according to the species and the chemical considered. Thus, Mottin et al. (2010) reported a dose-dependent increase of the PO activity from abalone hemocytes being exposed *in vitro* to increasing zinc concentrations. Similarly, Bado-Nilles et al. (2008) found an increase in PO-like activity of hemocytes from Crassostrea gigas when exposed to benzo[b]fluoranthene *in vitro* for 24h. However, the Zn2+ cation inhibited the activity of this enzyme in the crab Charybdis japonica. Similarly, mercury was found to inhibit the PO activity of hemocytes from C. gigas (*in vitro*, 21h) (Gagnaire et al. 2004) (fig.5). In *L. stagnalis*, Seppälä and Leicht (2013) assessed the PO-like activity on hemolymph. They employ various immune elicitors by seryngue-foot injection that differentially induced the activity. Hence, in *Lymnaea stagnalis* this function is both inducible and constitutive. Last, to date no reports can be found on the PO activity from hemocytes of *L. stagnalis* in a context of chemical contamination. In summary, the role of chemicals on immune-related PO activities is poorly understood (fig. 5). In spite of that, the PO-like activity is a compelling immunomarker, specifically for mechanistic approaches to assess immunotoxicity of chemical pollutants and because a vast scientific consensus exists on the importance of PO in immunity of invertebrates. Nonetheless, any interpretation should be made with care since (1) the snail melanin is implicated in immunity and in tissue protection [i.e. sorption] against toxicants; (2) the melanin will confer an immune advantage or disadvantage depending on which pathogen is considered (*i.e.*, not that simple); (3) xenobiotics may

differentially modulate the PO activity (in terms of increasing/decreasing trends and intensity) and will interact with the PO activity of both the snail and the pathogen.

4.11. Cytotoxic activities : NK-lysozyme-antibacterial activities

In environmental immunotoxicology, to assess the animal immunocompetence, tools are need to concretely evaluate the general cytotoxicity activity toward a pathogen. Hence, whatever the cascade of events involved and the mechanisms by which the destruction occurs, if the hemolymph is able to purge efficiently the pathogen, then it will directly informs about their immunocompetence.

The Natural-killer (NK)-like cytotoxic test is used in humans and has also been developed for environmental immunotoxicology purposes (Brousseau P. et al. 1998b) by means of flow cytometry. The NK-like cytotoxic activity is a cell-mediated process (by natural killer cells) by which an intruder is destructed by cytolytic mechanisms (*e.g.,* creation of pores by liberation of granules – such as the protein perforin in humans– at the vicinity of the plasma membrane of the target leading to its cell lysis and further destruction). Even if the similar cascade of events are not clear in mollusks, such a test will help in determining their capacity of target cell destruction (*i.e.*, cytotoxic activity). A NK-like activity has been shown in various invertebrates such as the tunicate *Ciona intestinalis* (Parrinello and Arizza 1992), the annelids *Eisenia fetida* and Lumbricus terrestris. In mollusks, this test (using human K562 cells as target) has been employed such as in the mussel *Elliptio complanata* (Farcy et al. 2011, Gélinas et al. 2013) and the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Franceschi et al. 1991, Ottaviani 1992). Similarly, hemocytes from the mussel Mytilus galloprovincialis and the venus clam *Chamelea gallina* were reported to be able to lyse human A positive erythrocytes (Malagoli et al. 2006, Malagoli et al. 2008). To date, such NK-like activity has not been reported/evaluated in *Lymnaea stagnalis*.

Lysozyme-like activity assessment could also constitute similar test to be used in *L. stagnalis*. It is an important function of innate immune system of many mollusks (Mydlarz et al. 2006). Lysozymes are humoral protein able to cleave bacterial cell wall. Many of them have been described in mollusks (Nilsen et al. 1999, Xue et al. 2004, Bathige et al. 2013, Ding et al. 2014). An impairment of lysozyme activity (*in vitro* assay) caused by exposure to antibiotics at environmentally relevant concentrations had been reported in the freshwater mussel *Elliptio complanata* (Gust et al. 2012). Recently, it was assessed in hemolymph of Mytilus edulis which remained unaffected by temperature parameters (5–20˚C) (Beaudry et al. 2016). In the octopus vulgaris, injections of titanium dioxide nanoparticles resulted in an increase in hemolymph lysozyme activity (Grimaldi et al. 2013). In *L. stagnalis*, Van der Knaap et al. (1981b) had employed an *in vitro* lysozyme-like assay, but no lysozyme activity have been found toward *Micrococcus lysodeikticus*. However, further researches may reveal such an activity in *L. stagnalis* and almost no clues are available, to date, to state the contrary. If so, such assays could be used in environmental immunotoxcicology and so it deserves further investigations. Exploration of lysozyme proteins – as it was done in several bivalves – should be initiated in *L. stagnalis*.

Overall and as mentioned above, what is useful in environmental immunotoxicology is to assess the ani-

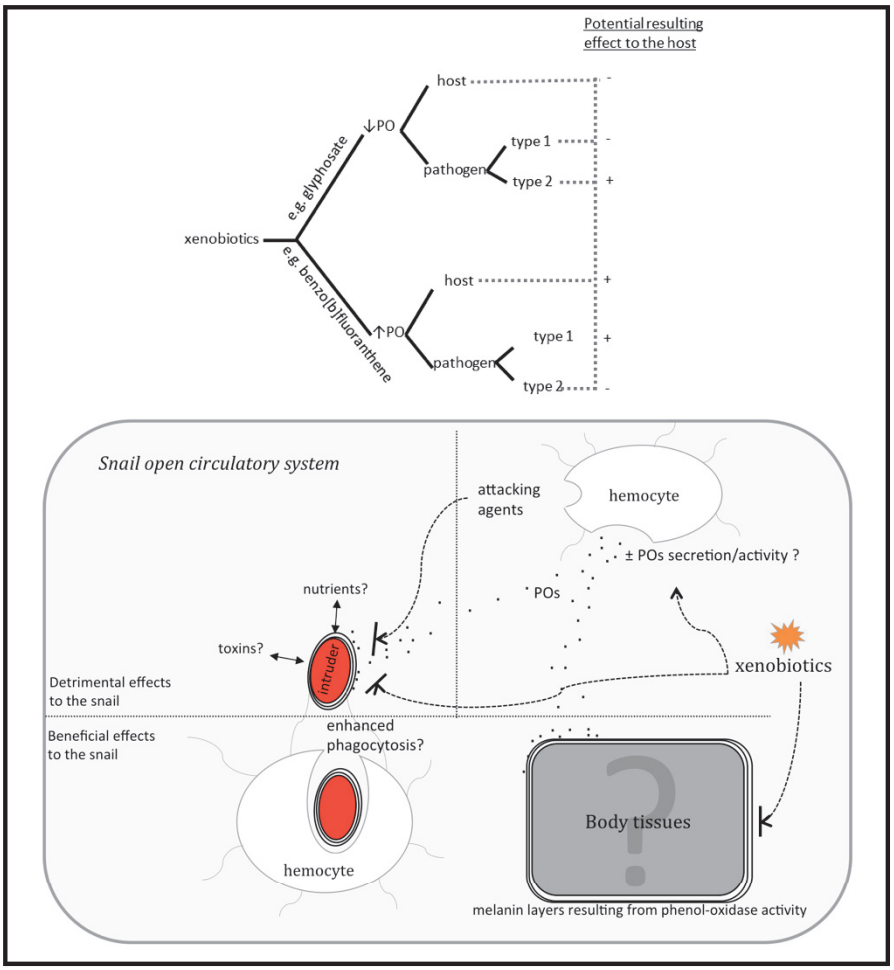


Figure 5: Overview of beneficial/detrimental effect of xenobiotics on PO-related immune system

The phenol-oxidase activity can be increased or decreased by xenobiotics, depending on the molecule considered. Similarly, the PO activity can be increased or decreased according to the intruder considered. In *L. stagnalis*, hemocytes are responsible for this activity in the humoral fraction via the pro-PO system. Hemocyanin may also be involved. The final result is the non-enzymatic formation of melanin layers. The latter protects the snail body tissues against toxicants (*i.e.*, chemical defence). PO will also act on intruders . On the one hand, melanized pathogens are protected from toxicants (*e.g.,* xenobiotics) and snail immune molecule, conferring thereby a survival advantage (pathogens type 1). On the other, the melanin-capsule entombs the pathogen and is believed to facilitate the phagocytosis, conferring a survival disadvantage (pathogen type 2). The PO activity should therefore be interpreted with caution with regards to molecule contamination and immune elicitor.

mal capacity to destruct a pathogen. Hence, antibacterial activity appears of uppermost relevance. In many aquatic invertebrates, antibacterial activities have been assessed, employing living marine bacteria in lobsters' hemolymph (Chisholm and Smith 1995) or marine bivalves' hemolymph (Anderson and Beaven 2001). Van der Knaap et al. (1981b) et al has investigated the bacterial clearance in *L. stagnalis*. They employed *in vivo* methods by injection of 5.10^7 Gram-positive bacteria (*Staphylococcus saprophyticus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) into the cephalopedal blood sinus. They further quantified the number of viable bacteria in hemolymph samples and found that following two hours of the injection, 99% of bacteria had been cleared. Such a test could be used in environmental immunotoxicology to determine the snail immunocompetence in ecotoxicology. However, such techniques deserve laboratory developments and *in vitro* tests could also be useful tools to consider. For example, in *L. stagnalis*, Seppala and Jokela (2010) assessed the antibacterial activity from *ex vivo* snap frozen hemolymph samples against lyophilized *Escherichia coli* cells. The absorbance decrease is then interpreted as the bacterial destruction. Nunez et al. (1994) had employed a colorimetric *in vitro* test to assess the ability of *L. stagnalis*' hemocytes to eliminate the bacterium *Aeromonas salmonicida*.

4.12. Opsonins, agglutinins and lectins

Hemolymph possesses bacteriolytic but also bacteriostatic properties. Anti-microbial peptides (AMP) in *L. stagnalis* are not described. AMPs constitute a tremendous part of the research in invertebrate immune systems and so it deserves to be investigated in *L. stagnalis*. On the contrary, few studies already focused on agglutinating properties, what may help selection of immune biomarkers in environmental immunotoxicology context. Opsonins are proteins that facilitate the presentation of pathogens to hemocytes for subsequent phagocytosis, a process known as opsonization or opsonophagocytosis (Raman et al. 2008). By enhancing the immune response, they participate in the success of the whole immune system to eliminate undesired agents. Agglutination refers to the clumping of insoluble molecules or self/non-selfparticles. In gastropod immunology, the phenomenon of hemagglutination is used for describing the clumping of hemocytes, sometimes incorrectly called coagulation/clotting (the latter are preferably used in the case of injury responses and implicitly suggest a well-determined cascade of events). Molecules that carry out agglutination are called agglutinins. Many authors point out that some agglutinins encompass both functions together with opsonins and may describe the phenomenon as "agglutinin-mediated opsonophagocytosis" (Raman et al. 2008, Booker et al. 2014). The terminologies are sometimes subject to confusion. Lectins are carbohydrate-binding proteins encountered either on plasma membranes of hemocytes or in the humoral fraction. Their major role is to bind onto carbohydrate moiety of living matter, which may be on hemocytes (agglutination) or on foreign agents (opsonization). Thus, they are involved in pathogen recognition and in the facilitation of phagocytosis (lectinophagocytosis) (Canesi et al. 2002). They are considered bridging molecules between effector and target cells. Lectins act as recognition molecules and as agglutinins (Smit et al. 2004). They also play a role in the regulation of cellular adhesion (Van der Knaap W.P.W 1993). An abundant opsonin molecule in *L. stagnalis* is granularin. Granular cells from the connec-

tive tissue surrounding the brain produce this molecule. This protein was found by Smit et al. (2004) to be released upon exposure to zymosan. They also observed a concomitant increase in phagocytosis. Granularin was upregulated upon parasitation of *T. ocellata*. Hoek et al. (1996) paved the way for the discovery of a new Ig-superfamily member, named the molluscan defense molecule (MDM). This secreted protein was first observed in *L. stagnalis*' granular cells of the connective tissue. It shares many Ig-domains with vertebrate/invertebrate neural cell adhesion molecules (NCAMs) and with the insect Ig-family hemolin. The MDM is believed to activate the general internal immune defense system of *L. stagnalis*, particularly in non-self recognition, but the underlying mechanisms remain to be clarified. This protein was found to be modulated upon parasitation of the avian schistosome T. ocellata, controlling its own immunorecognition, encapsulation and phagocytosis. Gust et al. (2013a) recently observed the presence of MDM mRNA in *L. stagnalis*' hemocytes. Van der Knaap (1982) reported the presence of agglutinins in the hemolymph of *L. stagnalis*. These proteins have a relatively high MW (approximately 60 000) and act rather nonspecifically since their action spectrum is wide. The binding of many lectins (LTA - Tetragonolobus purpureas, APA - Abrus precatorius, WGA - Triticum vulgaris, ConA - Canavalia ensiformis, LCA - Lens culinaris) have revealed the presence of several hemocyte-plasma membrane moieties in *L. stagnalis* (B-D-galactosyl, N-acetylglucosaminyl, galactosyl, glucosyl, mannosyl, fucosyl) (Dikkeboom et al. 1989, Horak and Deme 1998, Russo et al. 2008). Russo et al. (2008) investigated the effect of the toxicant fomesafen on the binding capacity of hemocyte to lectins. The WGA-binding capacity was decreased only after short-term exposures; meanwhile the ConA-binding capacity was decreased at short-term but increased at later stages. To date and to our knowledge, no lectins possessing fibrinogen-related proteins (FREPs) domains have been identified in *L. stagnalis* (setting aside the MDM), whereas several have been described other freshwater gastropods (*e.g.,* Biomphalaria glabrata) and play pivotal role in host–parasite immune interactions (Adema et al. 1997, Léonard et al. 2001, Zhang et al. 2001, Zhang et al. 2008). FREPs pertain to the Immunoglobulin-superfamily and thereby constitute a possible basis of immune adaptation/memory. This remains to be explored in *L. stagnalis*. To conclude, the discoveries mentioned above support the particular importance of granularin and MDM proteins in *L. stagnalis* internal defense response. Direct assessment of secreted opsonins, agglutinins and lectins may provide information on the immunological status of the organisms (immunoactivated, presence of parasites, etc.). All these aspects constitute potential basis for test developments to be used/explored in assessment of snail immunocompetence resulting from toxicant insult and parasite infection.

4.13. Cytokines

Cytokines are molecules secreted by hemocytes that participate in intercellular communication and orchestrate the efficiency of the immune response (fig. 2). TNFα presence has been detected in few invertebrates. A novel transcription factor LITAF-like (LPS-Induced-TNFα-Factor) has been cloned in the scallop *Chlamys farreri* and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The presence of TNF-like cytokines in these species were suggested (Yu et al. 2007, Park et al. 2008). The confirmation of TNFα presence in disk abalones was

then proved by De Zoysa et al. (2009). They highlighted the increase in mRNA sequence of TNFα-like (Ab TNFα) after an *in vivo* immunostimulation consisting in a mixture of pathogens and PAMPs. However, such a presence of TNFα has not been identified in *Lymnaea stagnalis*. The presence of AIF-1-like proteins in invertebrates was demonstrated in sponges and their involvement in activation of immunocytes was underlined (Kruse et al. 1999). In mollusk species, De Zoysa et al. (2010) showed the presence of an AIF-1 like sequence in disk abalone (AbAIF-1) and found a clear increase in its related mRNA after an immune challenge. In *Crassostrea gigas*, AIF-1 has been reported to stimulate the activation of hemocytes and to promote phagocytosis (Zhang et al. 2013). In *Lymnaea stagnalis*, Gust et al. (2013) observed a slight, although not significant, increase in AIF-1 like mRNA under exposure to antihypertensive and hypolipemic drugs. To date, the role and occurrence of cytokines in *L. stagnalis* is poorly understood. However, due to the extended knowledge of homologous proteins in humans and their pivotal roles in many immune-related functions, they deserve to be explored in *L. stagnalis* and may constitute candidate exposure biomarkers in environmental immunotoxicology as for instance the AIF-1 like in *L. stagnalis*' hemocytes. Additional cytokines such as interleukin-2 (IL2) (Novas et al. 2007), SOCS (De Zoysa and Lee 2009, Lee et al. 2014), PDGF and TGF-β (Franchini and Ottaviani 2000) that have been studied in bivalves could also be investigated in *L. stagnalis*.

5. Conclusion

- Chemical pollutants are a growing issue for the immune integrity of non-target aquatic species, including mollusks. The mechanisms of action of xenobiotics' immunotoxicities remain poorly understood.

- Eco-immunotoxicology needs biological and engineering tools (*e.g.,* flow cytometry), time/cost efficients to assess the immunocompetence of animals and set in perspective the possible inference of chemicals.

- The immune system is particularly important in multistress contexts (*e.g.,* pathogens and pollutants). Studies should be made to investigate the relationship between the organism immunocompetence and life-history traits.

- Hemocytes-related immunomarkers may be (i) sensitive to chemical stress (exposure biomarkers) and (ii) early warning markers of imminent effects at a higher biological level/gravity (health biomarkers). More research is required to assert the classification of each marker.

- *Lymnaea stagnalis* is a promising freshwater model in eco-immunotoxicology. Many markers of immunocompetence are available or need little development. Harmonization of methods is encouraged in order to upgrade the quality of data comparison (*e.g.,* between different strains).

- The quantity of hemolymph is quite important and so individual approaches can be realized. The hemolymph can be collected in a non-invasive manner. Thus, an individual time-course evolution of the snail immunocompetence can be evaluated.

- Comprehension of the inter-population, inter-individual (*i.e.*, subpopulation) and intra-

individual (over time) variability of immuno-markers should be investigated to a further extent. Better understanding of that variability under different physiological status would be acknowledged (*e.g.,* juveniles vs adults).

- The influence of biotic/abiotic confounding factors needs to be better understood (*e.g.,* parasitism, seasonal changes, etc).
- Complementary works are needed regarding hemocytes structural and functional characterizations.

References

Voir à la fin du manuscrit.

Table .4: Examples of studies working on immune performances of molluscan species

Species	Exposure and conditions	Main endpoints and techniques	References
Lymnaea stagnalis	WWTP effluents, Pharmaceuticals	Hemocytes count sand viability, Phagocytosis (latex microbeads, ROS generation, Thiol groups (Flow cytometry), RT-qPCR (mRNA of HSP, NOS, NOSbis, SOD, TLR4, AIF, CAT, GR, MDM, SeGPx)	(Gust et al. 2013a, b)
Lymnaea stagnalis	Fomesafen (herbicide, semi-static, 21 days), Atrazine (herbicide, 3-weeks)	Neutral-red retention time (NRRT) assay, Hemocyte counts and viability (haemocytometer or flow cytometry), lectins binding capacity , LPS-binding capacity, Apoptosis, ROS and oxidative burst , (LPS-challenges; PMA-challenges), mitochondrial potential	(Russo et al. 2004, 2007, 2008)
Babylonia areolat (ivory snail)		Optical density measurements: Phagocytic rate and index (of Saccharomyces cerevisiae and Vibrio Parahaemolyticus)	(Di et al. 2013)
Biomphalaria alexandrina	Roundup and/or Schistosoma mansoni infection	Hemocyte populations, Cell count, Phagocytic activity (against yeasts) , Cell cycle, DNA damage (comet assay)	(Mohamed 2011)
Shipped disk Abalone and Top shell	PMA immunostimulation	(flow cytometry), Hemocyte subtype characterization, Hemocyte viability, latex microbeads phagocytosis, oxidative burst analysis, ROS on 24 well-plate, Lysosomal quantification	(Donaghy et al. 2010)
Abalone H. diversicolor	Benzo(A)pyrene, 96h static laboratory *in vivo* exposure, Laminarin and LPS stimulations	Hemocyte count, PO assay, Bradford protein quantification in the humoral fraction, generation of superoxide anion, phagocytosis of yeasts, lysozyme activity, LMS (neutral red), Antibacterial activity: tracking of bacterial growth inhibition against controls by absorbance measurements	(Gopalakrishnan et al. 2009)

Table .5: Examples of studies working on immune performances of molluscan species

Species	Exposure and conditions	Main endpoints and techniques	References
Haliotis tuberculata	10 days hemocytes exposed *in vitro*, daily renewal with modified Hank's sterile 199 medium, kept at 17˚C in CO2-free incubator, cadmium chloride exposure	Mitochondrial health by the MTT assay, Microscopical hemocyte morphology, PO activity, Phagocytosis of latex microbeads, Lysosome presence, ROS	(Latire et al. 2012)
Haliotis tuberculata	24h *in vitro*, Zinc exposure	Mitochondrial health by the MTT assay, Microscopical hemocyte morphology, Acid phosphatase activity, PO activity, Phagocytosis of latex microbeads, Esterase activity, ROS	(Mottin et al. 2010)
Haliotis tuberculata	Bacterial challenge (the virulent V. harveyi strain)	Hemocyte populations, Total hemocyte count (THC), Hemocyte viability, Phagocytosis index and capacity, Activity of Phenol-oxidase and SOD, Agglutination titre, Leucine amino peptidase assay, Total protein content	(Travers et al. 2008b)
Haliotis diversicolor supertexta	Tributyltin, 5-15-30-day *in vivo* laboratory exposure	Phagocytic assay against staphylococcus aureus, measurement by fluorescence microscopy technique, Viability after phagocytosis assay (bacterial challenge), Lysozyme activity, PO activity, SOD activity	(Zhou et al. 2010)
Haliotis diversicolor	Bacterial challenge (mix of 5 strains): in the front of the foot	RTqPCR of abGSTsigma, Analysis of gene sequences	(Ren et al. 2009)
Blue mussel (Mytillus edulis)	Acute and chronic *in vivo* exposure of mercury	Hemocyte density, Latex microbead phagocytosis, Hemocyte viability	(Duchemin et al. 2008)

Table .6: Examples of studies working on immune performances of molluscan species

Species	Exposure and conditions	Main endpoints and techniques	References
Crassostra gigas	8 differents pesticides, 7-days *in vivo* laboratory exposure, 2 bacterial strains challenges	Flow cytometry: Cell viab, Esterase activity, ROS, Phagocytosis, Real-time PCR analysis (Ficolin 3; Galectin 4; LBP/BPI I; LPS/-1,3-glucan; Vav-3 oncogene homologue; Importin; ECSIT; DOCK 180 protein; c-Src kinase; Ankyrine brank-2; Cofilin; Filamin; Rho protein; Isocitrate dehydrogenase; Precursor of Cathepsine L; SOD-like; TIMP; Lysozyme-like; Defensin; Elongation factor I)	(Gagnaire et al. 2007)
Crassostrea virginica	Screening for Perkinsus marinus contamination	Individual variability , Cell distribution, comparison between microscopic observation and FACS analysis	(Ashton-Alcox and Ford 1998)
Mytilus galloprovincialis	estrogenic chemicals, *in vitro* exposure of chemicals , *in vivo* (intramuscular injections), Hemolymph pooled an centrifuged, *ex vivo* treatment	lysosomal membrane stability (LMS), neutral red retention principle, phagocytosis (neutral red-stained zymosan principle), lysosomal enzyme activity by measurement of extracellular lysozyme activity, levels of phosphorylated MAPK- and STAT-like proteins (Electrophoresis and Western blotting), proteins in whole cell extracts from hemocyte monolayers, Lysosomal membrane stability	(Canesi et al. 2004, Canesi et al. 2007)
Mytillus galloprovincialis	Tributyltin	hydrogen peroxide, determination of the phosphorylation level of MAPK by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	(Chatel et al. 2010)
Mytilus galloprovincialis	*in situ* collections, 2-years survey, polluted areas of western Meditterranea	"Immunotoxicological index", total hemocyte count (THC), lysosomal stability, phagocytosis, plus others (protein quantifications, hydrolase release assays, lethallothionein levels, ROS)	(Auffret et al. 2005)

Une **approche multibiomarqueurs** est souvent utilisée et conseillée en immunotoxicologie environnementale. La base des ressources immunitaires chez *L. stagnalis* correspond aux hémocytes bien que certaines cellules fixes non hémocytaires contribuent aussi à leur immunité. Il semble pertinent d'avoir une batterie de tests qui inclue des *endpoints* hémocytaires **fonctionnels** et d'autres **non fonctionnels**. Les paramètres non fonctionnels souvent évalués correspondent à la densité et viabilité des hémocytes. Cela donne une information sur (i) la base quantitative des effecteurs disponibles chez les organismes et (ii) leur statut qualitatif d'intégrité vitale. Parmi les paramètres fonctionnels des hémocytes, la phagocytose est un processus majeur de l'immunité cellulaire de *L. stagnalis* et doit donc être incluse dans l'approche multibiomarqueurs. Il est commun d'évaluer l'ensemble de ces trois paramètres (densité, viabilité et phagocytose) au moyen de la **cytométrie en flux** qui permet une analyse « cellule par cellule » de manière quantitative en peu de temps. Par ailleurs, des informations sur la structure des hémocytes peuvent être acquises, ce qui en fait un outil privilégié par les scientifiques du domaine. Par ailleurs, d'autres paramètres fonctionnels semblent centraux dans l'immunocompétence des organismes. En particulier, il existe plusieurs activités enzymatiques aux propriétés **bactériolytiques**. L'activité oxydative immunocompétente est une de ces activités majeures responsables de la bonne destruction des pathogènes, à la fois dans le compartiment extracellulaire et dans les phagosomes. Pour induire cette activité, nous avons besoin d'un **PAMP puissant** afin de pouvoir diagnostiquer la bonne mise en place de cette activité immunocompétente en réponse à une invasion d'antigènes. Par ailleurs, d'autres activités enzymatiques participent à la l'immunocompétence dont les propriétés sont de nature **bactériostatiques**. Par exemple, l'activité phénol-oxydase fait partie de ce type d'activité enzymatique. Bien que la cytométrie en flux présente de nombreux avantages, les cinétiques enzymatiques sont plus pertinemment évaluées en **spectrofluorimétrie**. Compte-tenu de ce qui précède, le chapitre suivant se propose de réaliser quelques développements méthodologiques afin de disposer d'une approche multibiomarqueurs d'évaluation de l'immunocompétence chez *L. stagnalis*.

Les marqueurs d'immunocompétence sélectionnés sont : la densité hémocytaire, la viabilité hémocytaire, l'activité de phagocytose, l'activité oxydative immunocompétente et l'activité phénol-oxydase non spécifique.

Chapitre 2

Matériels, méthodes et validations de protocoles

Sommaire

2.1 Approvisionnement de *Lymnaea stagnalis* 94

2.1.1 Reconnaissance de l'espèce 94

2.1.2 Populations étudiées 96

2.1.3 Paramètres biométriques et calibration des organismes 100

2.1.4 Individualisation des organismes 106

2.2 Marqueurs d'immunocompétence 107

2.2.1 Cytométrie en flux 107

2.2.2 Collecte de l'hémolymphe 111

2.2.3 Densités hémocytaires et distributions hémocytaires 113

2.2.4 Viabilités hémocytaires 125

2.2.5 Phagocytose 129

2.2.6 Activité oxydative immunocompétente 139

2.2.7 Phénol oxydase 140

2.3 Analyses statistiques 143

2.3.1 Choix des représentations graphiques 143

2.3.2 Modèles linéaires mixtes 144

2.1 Approvisionnement de *Lymnaea stagnalis*

2.1.1 Reconnaissance de l'espèce

La reconnaissance de l'espèce *L. stagnalis* se faisait selon les critères de la figure 2.1 (p. 94) et 2.2 (p. 95). Des photographies de *L. stagnalis* sont présentées page 96 et aussi en annexe C, p. 416.

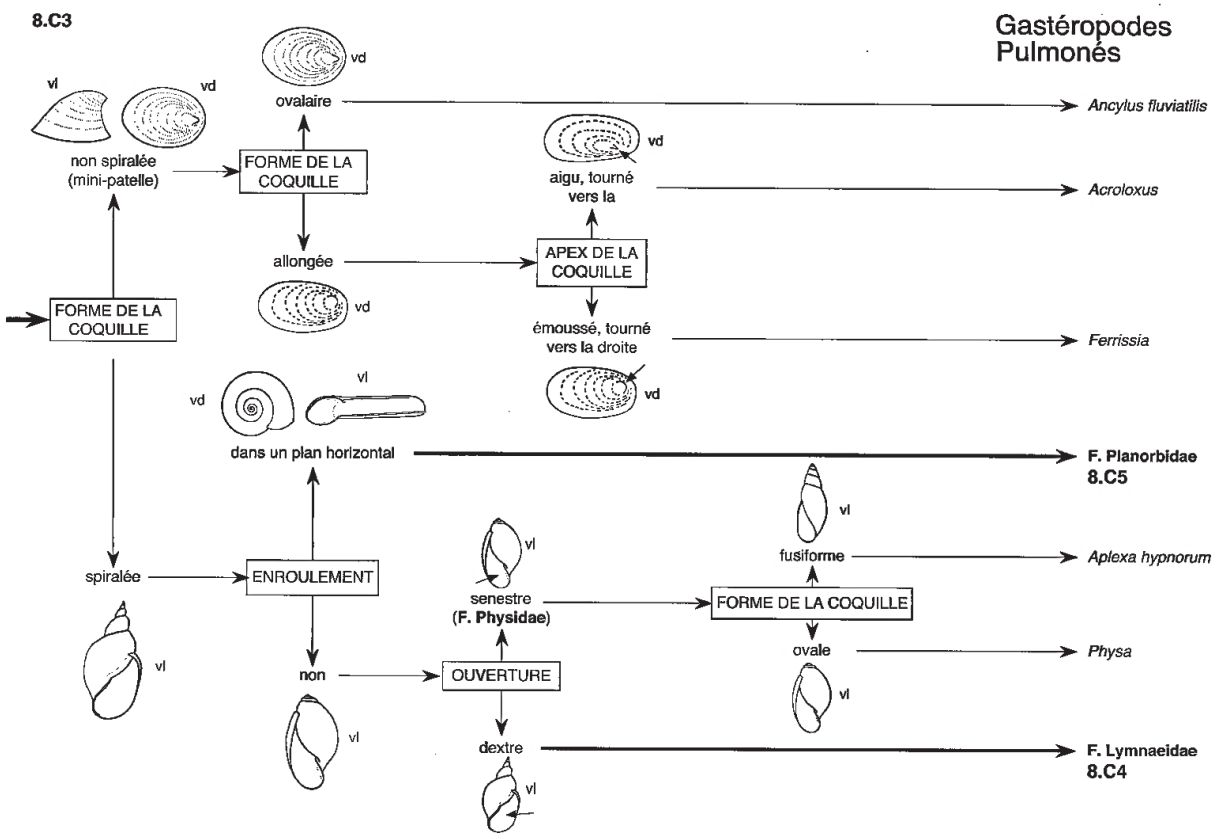


FIGURE 2.1 – Critères morphologiques de reconnaissance de l'espèce *Lymnaea stagnalis* [Tachet, 2008]

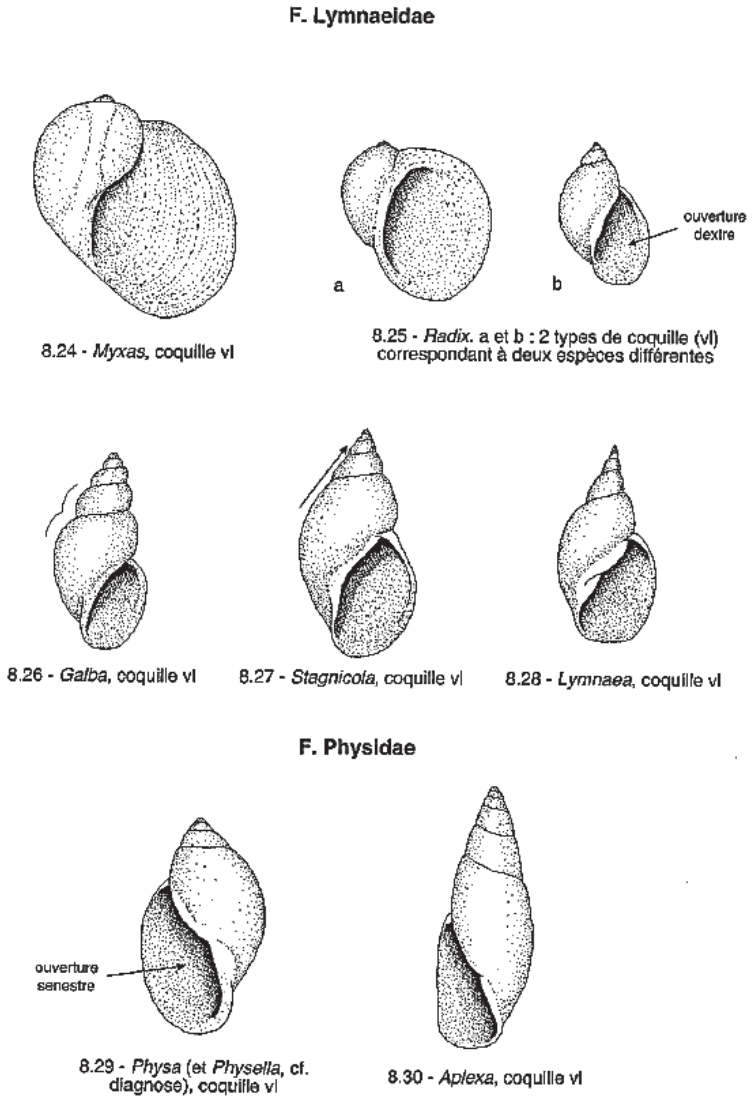


FIGURE 2.2 – Critères morphologiques de reconnaissance de l'espèce *Lymnaea stagnalis* [Tachet, 2008]

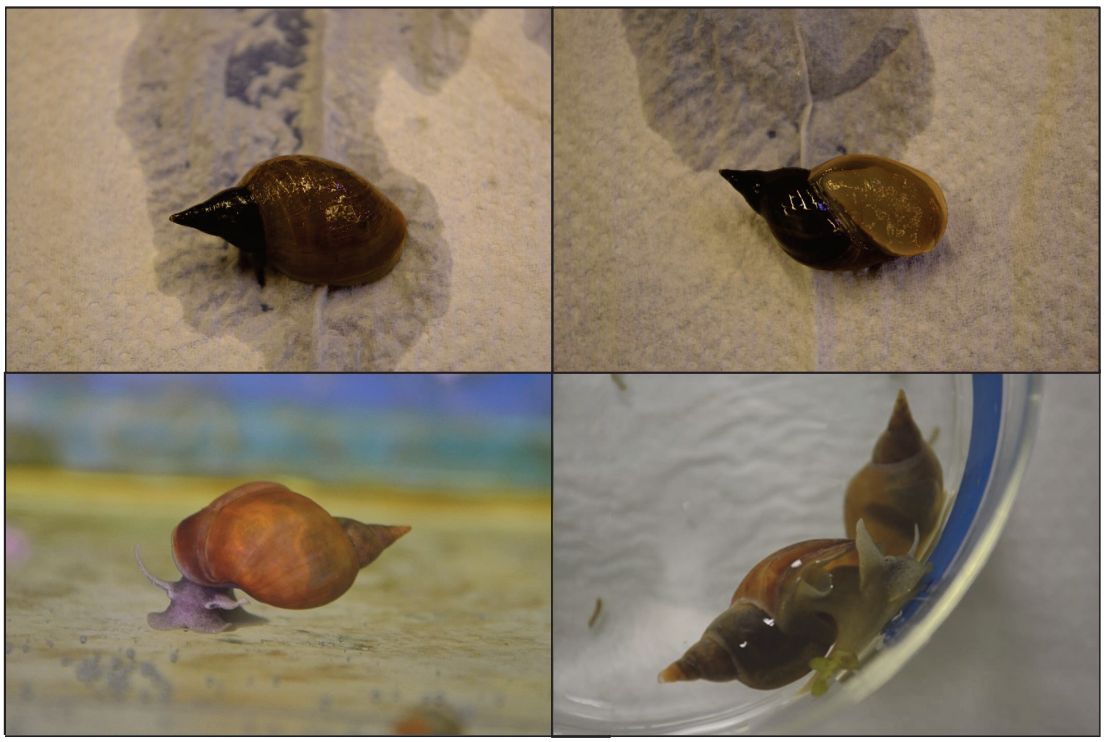


FIGURE 2.3 – Photographies de *Lymnaea stagnalis* adulte (32±2 mm)

2.1.2 Populations étudiées

2.1.2.1 élevages au laboratoire

Des essais d'élevages de *L. stagnalis* ont été réalisés pendant un certain temps au laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea de Lyon-Villeurbanne. Les organismes étaient maintenus dans des bacs de 300 et 600 L avec un apport continu en eau de forage. Les organismes étaient triés toutes les deux semaines par classe de taille, les feces étaient nettoyés et les organismes morts retirés. Le tableau 2.1 (p. 97) résume les caractéristiques des paramètres des élevages.

Tableau 2.1 – Paramètres des élevages

Type de bac	Fourchette de taille des organismes (mm)	Nombre d'organismes par bac
bac 1 : 300 L	< 5	> 200
bac 2 : 300 L	5-15	50-200
bac 3 : 300 L	15-30	50-200
bac 4 : 600 L	> 30	50-200
conductivité	500-600 $\mu S.cm^{-1}$	
température	20 ± 1 °C	
oxygénation	$> 60\%$	
photopériode	16h/8h [luminosité/obscurité]	
ion ammonium	< 0.1 $\mu g.L^{-1}$	
nitrites	< 0.025 $\mu g.L^{-1}$	
nourriture	Tetraphyll *ad libitum*	

Une deuxième série d'essais a été mise en place pendant la dernière année de thèse. Tous les organismes étaient nourris *ad libitum* à de la laitue fraîche. Les juvéniles étaient mis dans de petits aquariums (environ 1.5 L). Une quinzaine d'aquariums était disposée en série dans une armoire thermostatée et avec la même photopériode que celle du tableau 2.1. La moitié de l'eau était délicatement changée une à deux fois par semaine (conditions à renouvellement semi-statique). A partir d'une taille de 15—20 mm, les organismes étaient transférés dans des aquariums de 30L où un apport continu en eau de forage était assuré.

2.1.2.2 population en milieu naturel

Une zone particulière dans un contre-canal du Rhône (Briord) (voir figure 2.4, p. 98) a été trouvée avec une densité de limnées relativement faible mais suffisante [1] pour envisager une collecte d'une centaine d'organismes sur quelques jours [2]. La profondeur était d'environ 1,5 m. Les limnées ont été collectées en palme-masque-tuba. Une vidéo (web) subaquatique montre *Lymnaea stagnalis* vivant dans ce milieu naturel et comment elles ont été collectées à cet endroit (**cliquer ici pour le lien vers la vidéo internet**).

1. plus élevée qu'aux alentours de cet endroit
2. Période : fin mai 2015

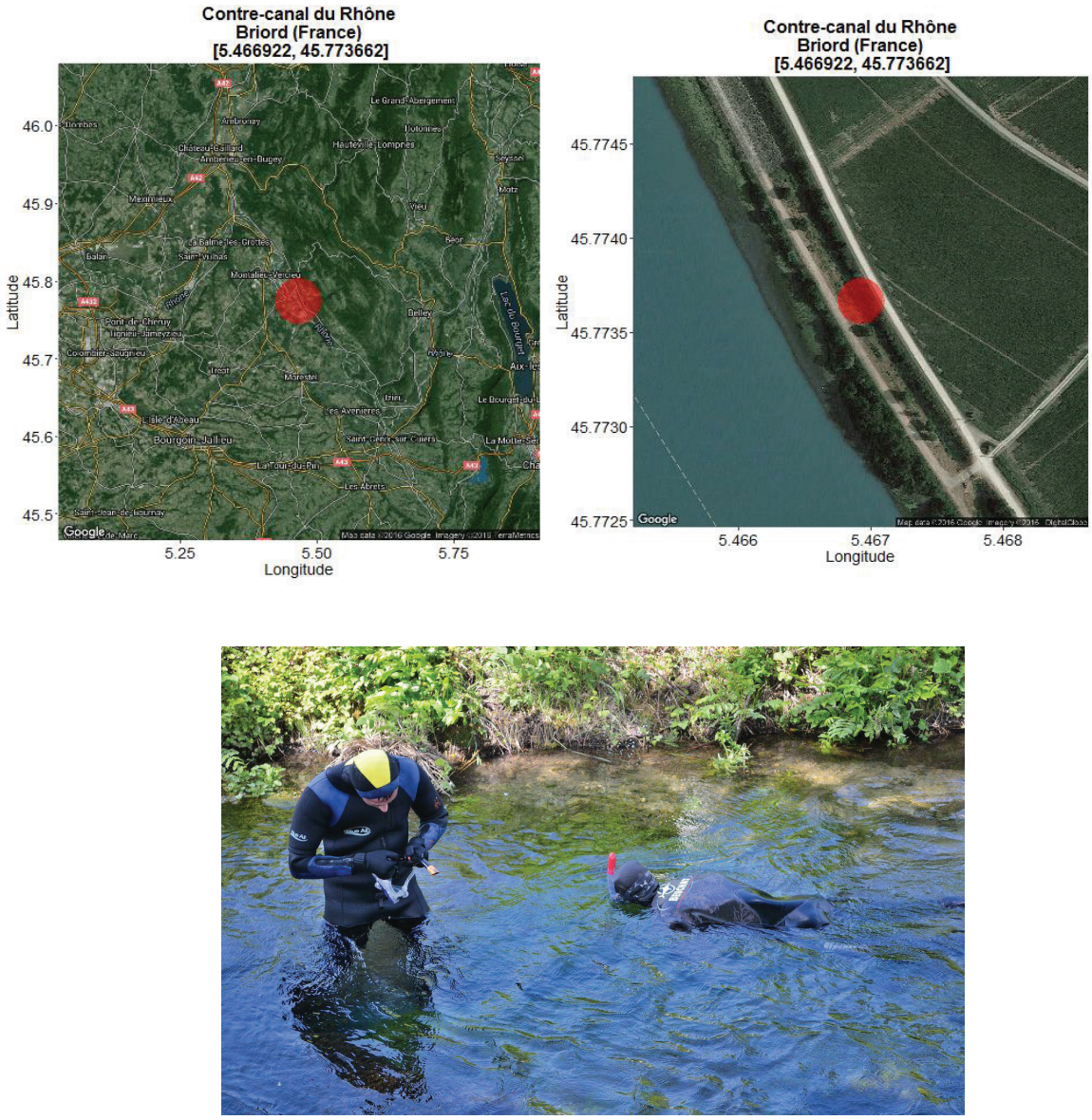


FIGURE 2.4 – Collecte de *Lymnaea stagnalis* en milieu naturel dans un contre-canal du rhône (Briord, France)

2.1.2.3 population en milieu urbain

Les limnées peuvent être présentes dans les mares de zones urbaines. Par exemple, l'étang de Broye à Renens (Suisse) contient beaucoup de limnées. Cette petite mare [3] est fortement végétalisée (voir figure 2.5, p. 99). Par ailleurs la faible profondeur rend la collecte de limnées [4] très facile. Une simple épuisette suffit.

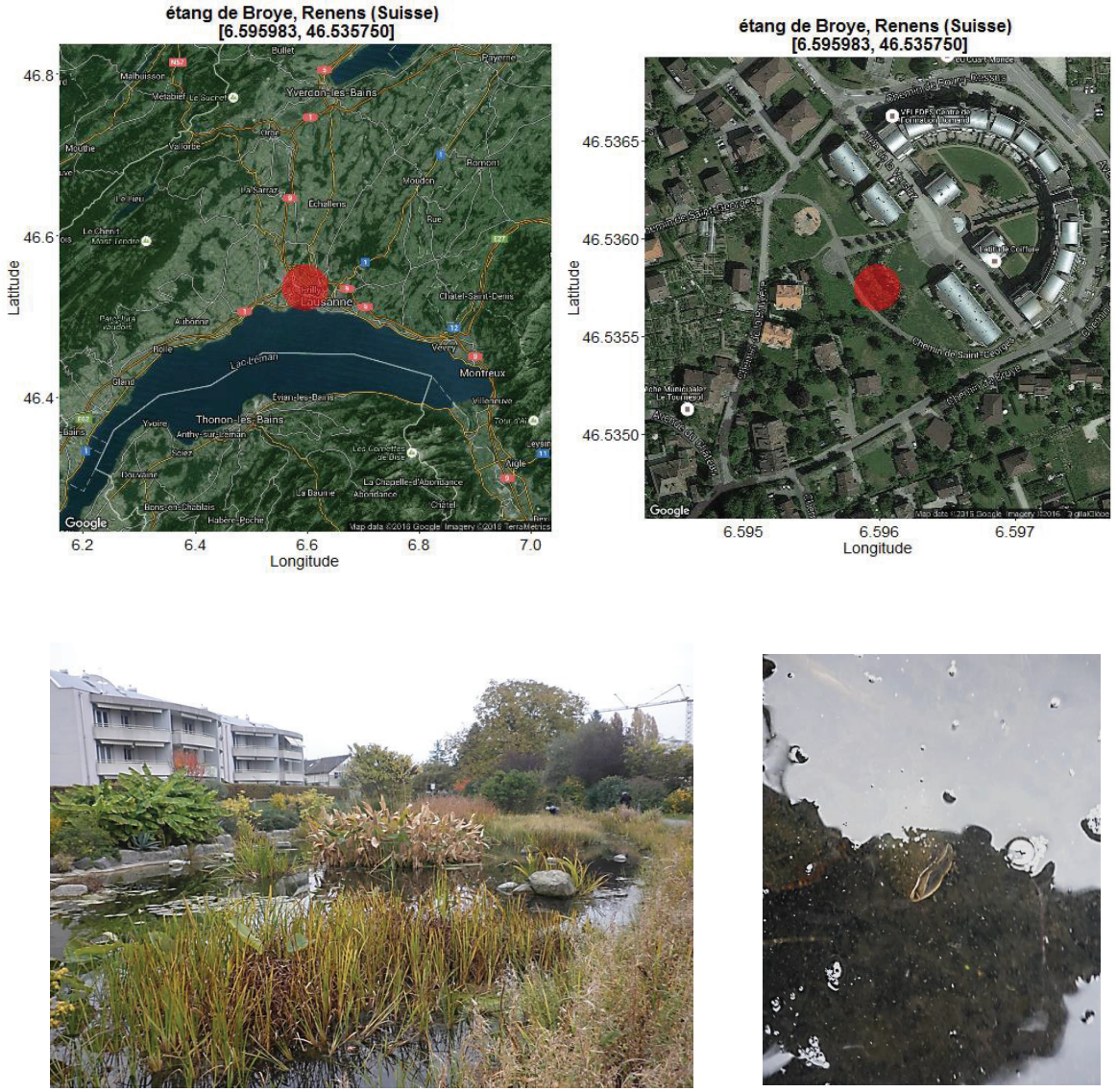


FIGURE 2.5 – Collecte de *Lymnaea stagnalis* en milieu urbain (étang de Broye, Renens, Suisse)

3. Date : 27/10/2015, température=11.7 ˚C, conductivité =222 $\mu S.cm^{-1}$, pH=7.3
4. Une autorisation de la mairie de Renens avait été donnée pour la collecte.

2.1.3 Paramètres biométriques et calibration des organismes

La calibration des organismes dans les diverses expériences s'est faite soit par la taille (longueur de coquille) uniquement, soit par la taille et le poids frais des organismes.

La mesure de **longueur de coquille** pour la calibration des organismes se faisait comme indiqué dans la figure 2.6 avec un double décimètre. Notez qu'un pied à coulisse n'a pas été utilisé dans un souci de minimisation de l'endommagement des coquilles. En effet, elles n'ont pas d'opercule, ce qui rend leur ouverture de coquille très friable et leur apex, très acuminé, est le plus pointu (et donc le plus fragile) de toute la famille *Lymnaeidae* (voir figure 2.2 p. 95).

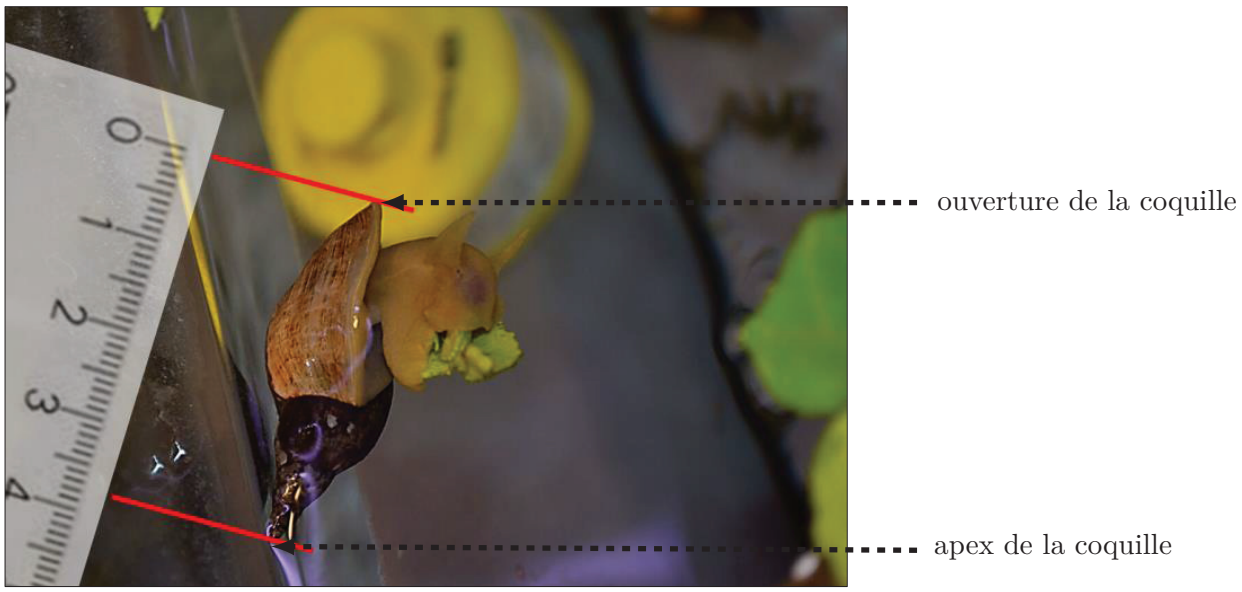


FIGURE 2.6 – mesure de la longueur de coquille pour calibrer les organismes

Puisque plusieurs données biométriques ont été acquises au cours des expériences, celles-ci ont été rassemblées afin d'aider le choix des critères de calibration chez *L. stagnalis* et fournir une vision d'ensemble des corrélations biométriques. Celles-ci sont présentées dans les figures 2.7 (p. 101), 2.8 (p. 102), 2.9 (p. 103), 2.10 (p. 104) et 2.11 (p. 105) qui suivent.

Parmi les traits d'histoire de vie des organismes, la croissance semble pertinente à évaluer pour les stades juvéniles et subadultes. En revanche, au-delà de 15—20 mm, la croissance est ralentie et donc nous pouvons penser que cela rend difficile l'observation de différences très marquées entre plusieurs conditions expérimentales pour une durée de 1—2 mois. Il semble plus pertinent de mesurer la prise de poids frais (voir article 8, p. 307).

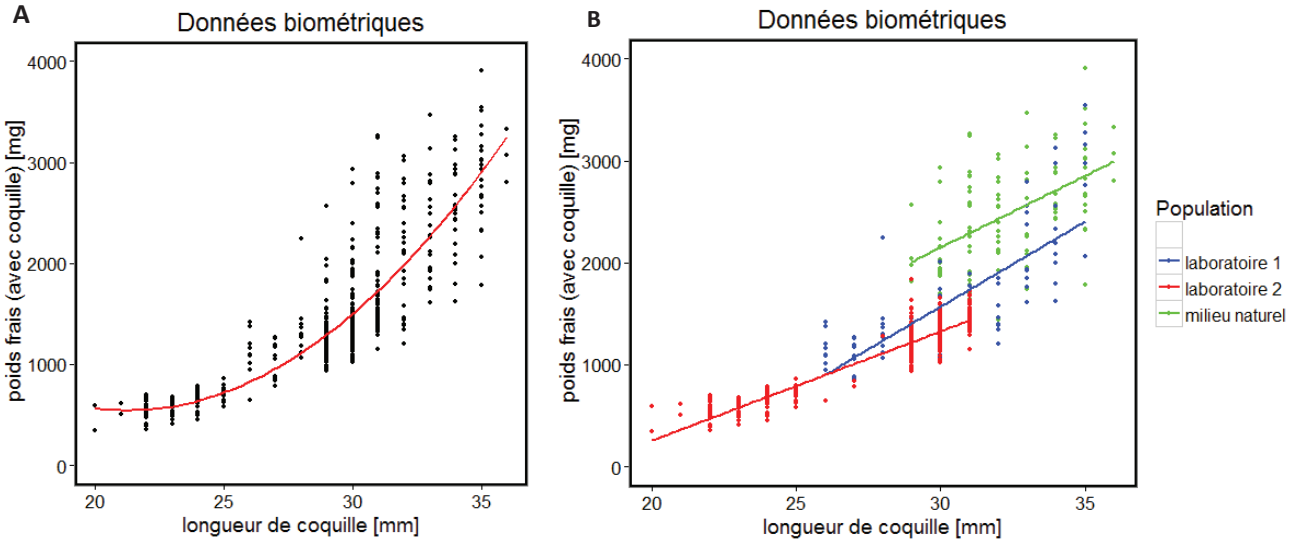


FIGURE 2.7 – Relation longueur de coquille - poids frais des organismes

Ces données ont été acquises lors de trois expériences différentes avec trois populations différentes de *L. stagnalis*. Elles correspondent au poids frais et à la taille des organismes le jour de lancement des expériences respectives avant les expositions aux contaminants. Le graphique B correspond au graphique A mais avec la distinction des différentes populations.

Populations :

- laboratoire 1 = élevages de laboratoire (20±1 °C, eau de forage à renouvellement continu, photopériode 16h/8h, alimentation Tétraphylle *ad libitum*)
- laboratoire 2 = élevages d'un autre laboratoire (20±1 °C, eau de ville déchlorinée, conditions semi-statiques, photopériode 16h/8h, alimentation laitue *ad libitum*)
- milieu naturel = limnées de terrain (rhône, collectées en mai)

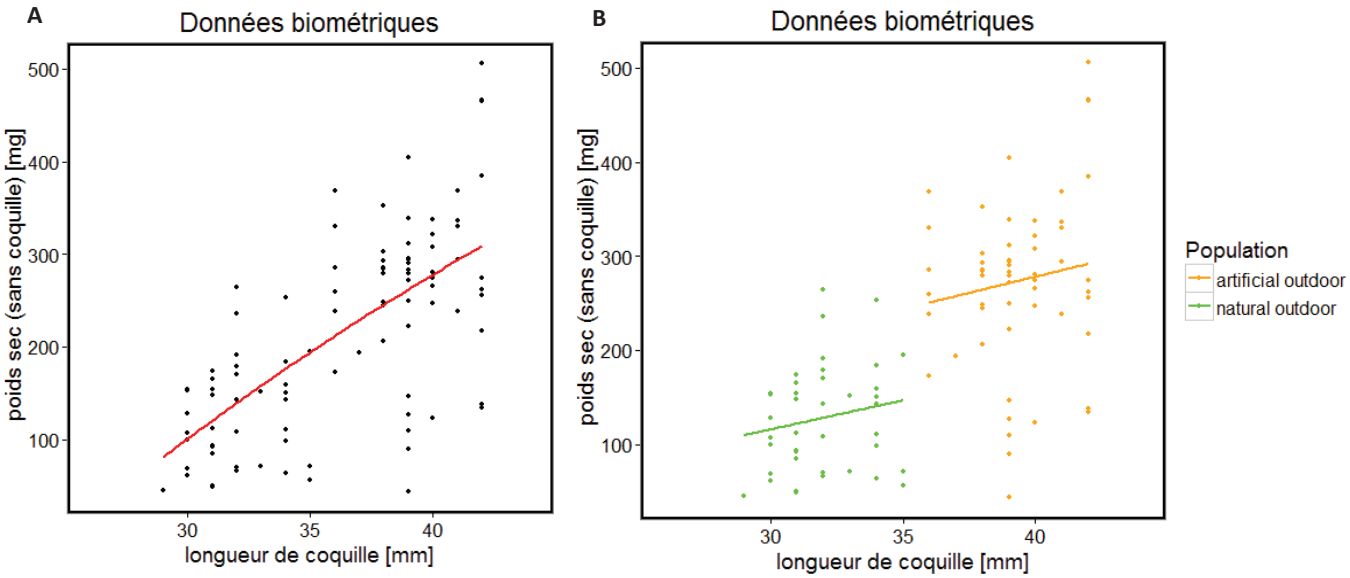


FIGURE 2.8 – Relation longueur de coquille - poids sec des organismes

Le but de ces graphiques est d'apporter des éléments de connaissance sur la corrélation entre la taille des organismes (en début d'expérience, avec leur coquille) et leur poids sec (en fin d'expérience, sans leur coquille).

Ces données biométriques ont été acquises lors de deux expériences réalisées au laboratoire sur des populations collectées sur le terrain : dans une mare (points jaunes) et dans un contre-canal du rhône (points verts). Ces populations ont été exposées à des contaminants au laboratoire, le cadmium (40 jours) et la deltaméthrine (44 jours), respectivement. Brièvement, les conditions au laboratoire étaient les suivantes : eau de forage, renouvellement continu (points verts) ou semi-statique (points jaunes), température 20±1 °C, photopériode 16h/8h de luminosité/obscurité et nourriture *ad libitum* à la laitue.

En fin d'expérience les organismes ont été retirés de leur coquille puis lyophilisés et pesés. Les organismes témoins et exposés aux contaminants ont été mélangés sur ces graphiques car les poids secs ne donnaient pas de différences observables entre les groupes d'exposition (et les tailles correspondent aux mesures en début d'expérience à t=0h, et donc les organismes n'étaient pas encore exposés aux contaminants). Le graphique B correspond au graphique A mais avec la distinction des deux populations. Nous pouvons observer qu'il existe une faible corrélation mais néanmoins les régressions linéaires des deux populations sont parallèles ce qui montre une certaine constance de la variance de ces paramètres biométriques entre les deux populations de terrain.

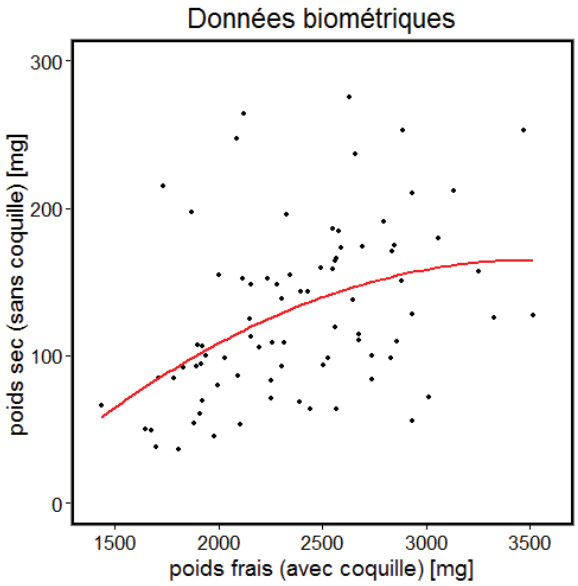


FIGURE 2.9 – Relation poids frais - poids sec des organismes

Le but de ce graphique est de fournir des éléments de connaissance sur la corrélation entre le poids frais des organismes en début d'expérimentation (avec la coquille) et leur poid sec en fin d'expérimentation (sans coquille).

Ce graphique correspond aux données biométriques susmentionnées pour une population collectée sur le terrain et ramenée au laboratoire pour être exposée à la deltaméthrine pendant 44 jours (eau de forage, alimentation *ad libitum* à la laitue, photopériode 16h/8h de luminosité/obscurité). Les données biométriques de ce graphique pour les organismes de groupes témoins et contaminés ont été mélangés car ils ne montraient pas de différence observables séparément.

Nous pouvons observer une grande variabilité dans la corrélation du poids frais (avec coquille) et du poids sec des organismes (sans coquille après 44 jours).

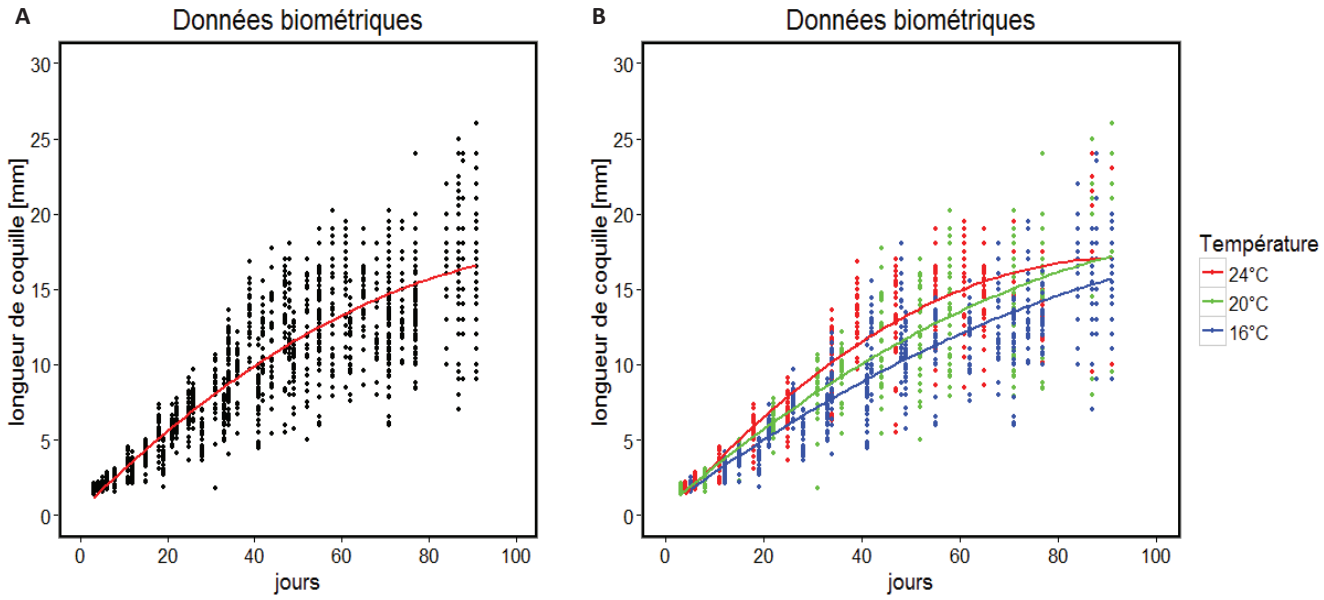


FIGURE 2.10 – Relation longueur de coquille — âge des organismes

Le but de ces graphiques est de fournir des éléments de connaissance biométriques chez *L. stagnalis* en ce qui concerne (i) la corrélation âge—taille des organismes et (ii) l'effet de la tempréature sur la croissance.

Ces données ont été collectées à partir du début d'éclosion d'organismes d'élevages au laboratoire qui n'ont été soumis à aucun contaminant (eau de forage, renouvellement continu, températures 16±1 ° C ou 20±1 ° C ou 24±1 ° C, photopériode de 16h/8h de luminosité/obscurité, nourriture *ad libitum* à la Tétraphylle).

Nous pouvons observer qu'il y a une faible corrélation entre l'âge des individus et leur taille. La variabilité entre l'âge et la taille est d'autant plus élevée que les organismes sont âgés.

Nous pouvons aussi observer que la croissance est d'autant plus élevée que la température est également élevée, ce qui est biologiquement cohérent.

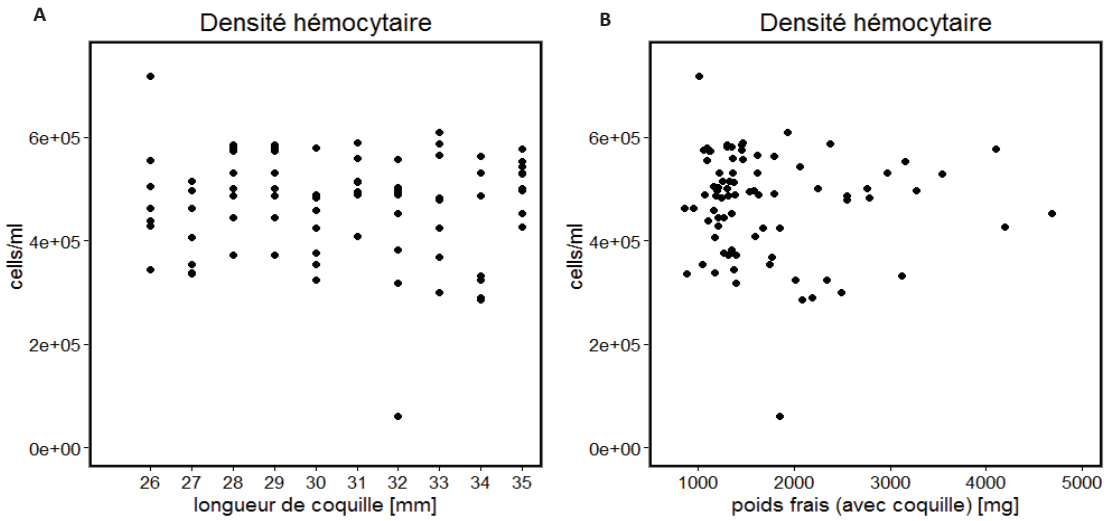


FIGURE 2.11 – Relation biométrie — densité hémocytaire

Le but de ce graphique est de voir la corrélation entre la taille ou le poids frais des organismes, aux gammes de calibration utilisées dans les expériences de ce manuscrit, avec leur densité hémocytaire.

Les organismes ont été collectés dans les élevages du laboratoire (eau de forage, renouvellement continu, température 20±1 ° C, photopériode 16h/8h de luminosité/obscurité).

Nous pouvons observer qu'aux gammes de calibration établies, la densité hémocytaire ne présente pas de corrélation avec le poids frais ou la taille des organismes.

2.1.4 Individualisation des organismes

Lors des diverses expérimentations, les organismes calibrés étaient identifiés individuellement afin de pouvoir les suivre dans le temps au cours d'une même expérience. Deux méthodes ont été employées. La première consistait à sécher la coquille de l'individu puis à écrire un numéro d'identification à l'aide d'un marqueur *waterproof*. La deuxième méthode consistait à sécher la coquille de l'individu puis à déposer une gouttelette de colle ultra glue (cyanoacrylate) sur la coquille puis d'y superposer délicatement une pastille en plastique colorée et numérotée (Ickowicz Apiculture, Bollene, France) comme réalisé par Bouétard *et al.* [2014]; Coutellec *et al.* [2011]. Ces pastilles sont généralement utilisées pour marquer les abeilles. Après 2-3 minutes de séchage à l'air libre[5], la colle est correctement solidifiée, la pastille est fixée et l'individu peut être remis dans l'eau.

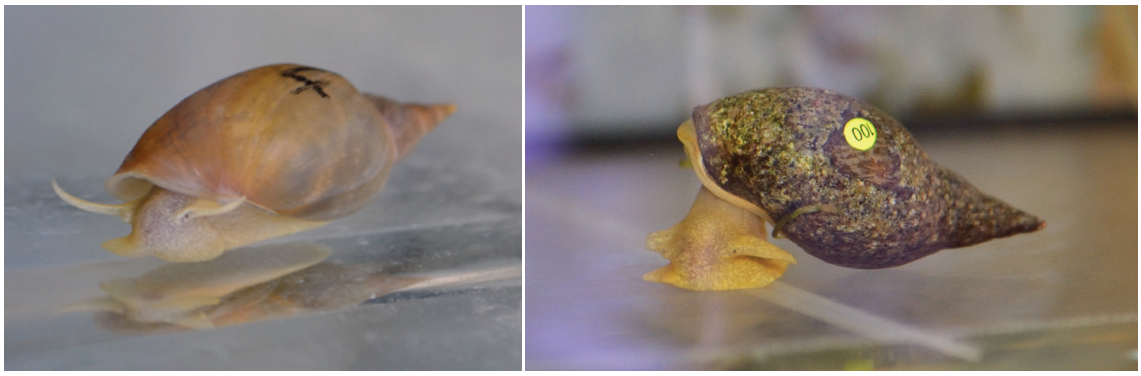


FIGURE 2.12 – Méthodes d'identification individuelle des organismes pour un suivi dans le temps

L'organisme de la photographie de gauche provenait des élevages d'Irstea (32 ±2 mm) alors que l'organisme de droite provenait du Rhône (Briord, 32.5 ± 2.5 mm).

5. *L. stagnalis* étant un organisme pulmoné, nous supposons que cette courte manipulation à l'air libre ne lui génère pas de stress considérable.

2.2 Marqueurs d'immunocompétence

2.2.1 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est un outil privilégié pour mesurer des paramètres à l'échelle cellulaire et avoir des informations sur la taille, la structure et les fluorescences de la particule analysée (voir explications avec la fig. 2.13, p. 109). Les mesures en cytométrie de flux ont été réalisées avec l'appareil Guava easyCyte 6-HT (Millipore). Comme présenté sur la figure 2.14 (p. 110), il comporte deux lasers d'excitation et six photomultiplicateurs (PMT) :

- le PMT FSC (forward scattering), placé dans l'axe du laser, informe sur la taille de la particule
- le PMT SSC (side scattering), mesure la diffraction du laser par la particule. Cette information est liée à la complexité intraparticulaire et donc à la granulométrie de la cellule
- quatre autres PMT dont les longueurs d'ondes des bandes passantes sont indiquées dans la figure 2.15 (p. 110)

La particularité de la technologie des cytomètres en flux Guava réside dans le fait que le capillaire vient prélever l'échantillon directement par aspiration. En effet, contrairement à la plupart des autres cytomètres en flux (*e.g.*, FACS, Acury, etc), il n'existe pas de liquide de gaine pour aligner les particules dans le microcapillaire (figure 2.14 p. 110). Ainsi, la quantité de déchets produits est largement diminuée. La seconde particularité de cette technologie Guava est qu'elle couvre un large champs d'application, de la Recherche en biotechnologie jusqu'à l'utilisation en routine dans l'industrie agroalimentaire. Les cytomètres Guava sont adaptés pour mesurer la concentration cellulaire d'un échantillon biologique, contrairement à la plupart des autres cytomètres en flux.

Démarche qualité :

- L'exactitude de calibration du Guava était vérifiée avant chaque journée de mesure avec le logiciel EasyCheck et selon le protocole d'utilisation du producteur du kit correspondant (Guava easyCheck Kit, Hayward, CA, USA).
- Le cytomètre en flux était révisé annuellement par un technicien Guava.
- Les micropipettes étaient révisées annuellement par l'entreprise Sartorius et elles étaient dédiées au poste de cytométrie.
- L'ensemble des acquisitions avec le Guava ont été réalisées avec le logiciel GuavaSoft 2.7 avec un débit de mesure fixé à 0.59 $\mu l.s^{-1}$.

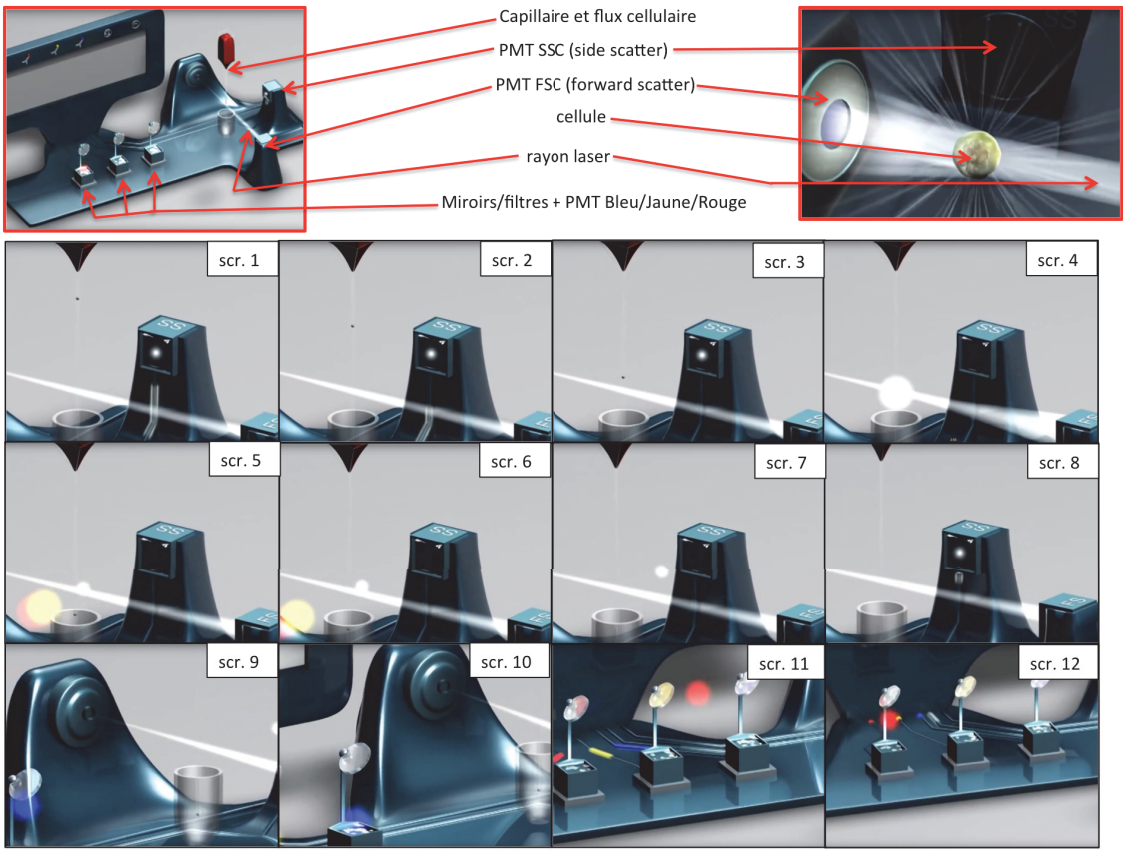


FIGURE 2.13 – Représentation générale et schématique du principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

Cette figure correspond à des captures d'écran (scr. pour *Screenshots* en anglais) réalisés à partir de la vidéo explicative "Citometria de Flujo" créée par Rodrigo Blanco Salado et Alfredo Corell Almuzara (**cliquer ici pour le lien vers la vidéo internet**).
scr. 1 — scr. 4 : La cellule descend dans le flux et passe devant le rayon laser, les rayons du laser sont déviés de manière proportionnelle à la taille de la particule dans l'axe du laser (ombre) et le signal est réceptionné par le PMT FSC.
scr. 5 — scr. 8 : La granularité de la cellule va diffracter le rayon et être lu par le PMT SSC situé sur le côté dans un plan perpendiculaire à l'axe du rayon.
scr. 9 — scr. 12 : En même temps, la fluorescence des particules va être émise et lue par les PMTs Bleu/Jaune/Rouge correspondants avec un jeu de filtres et miroirs. Selon les cytomètres en flux, ces PMTs, filtres et miroirs sont différents et différemment agencés. Chaque PMT enregistre le signal et l'ensemble est compilé dans un fichier unique. Au final, chaque particule est décrite par un signal pour chaque PMT dont l'intensité sera plus ou moins importante selon la présence de fluorochrome(s), la taille de la cellule et sa granulométrie.

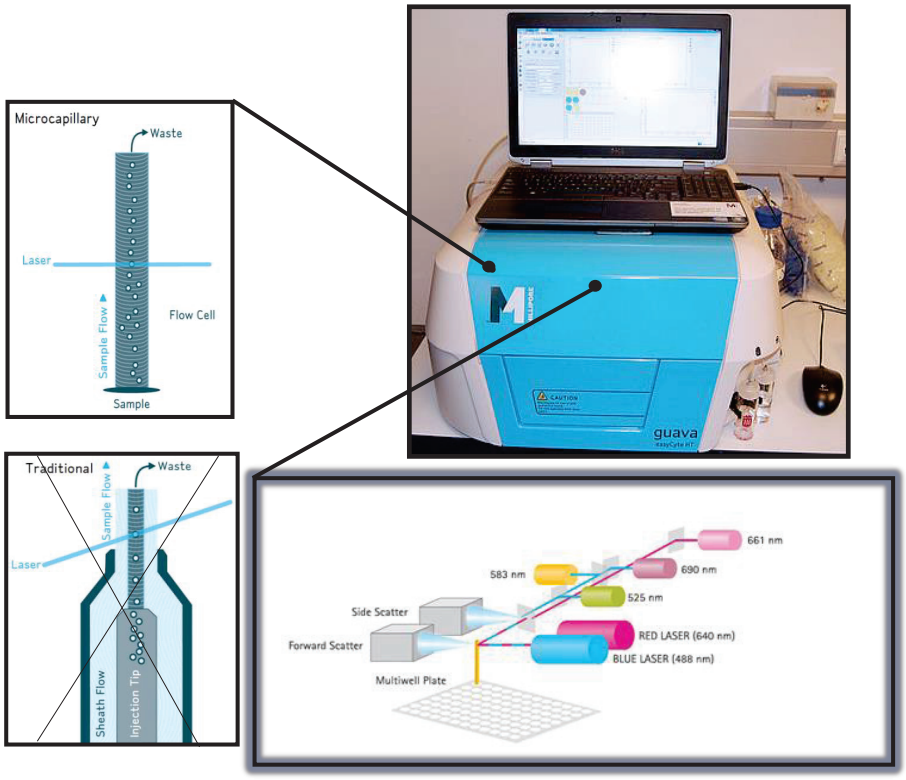


FIGURE 2.14 – Cytomètre en flux *Guava EasyCyte 6-HT multicolors (Merck Millipore)*

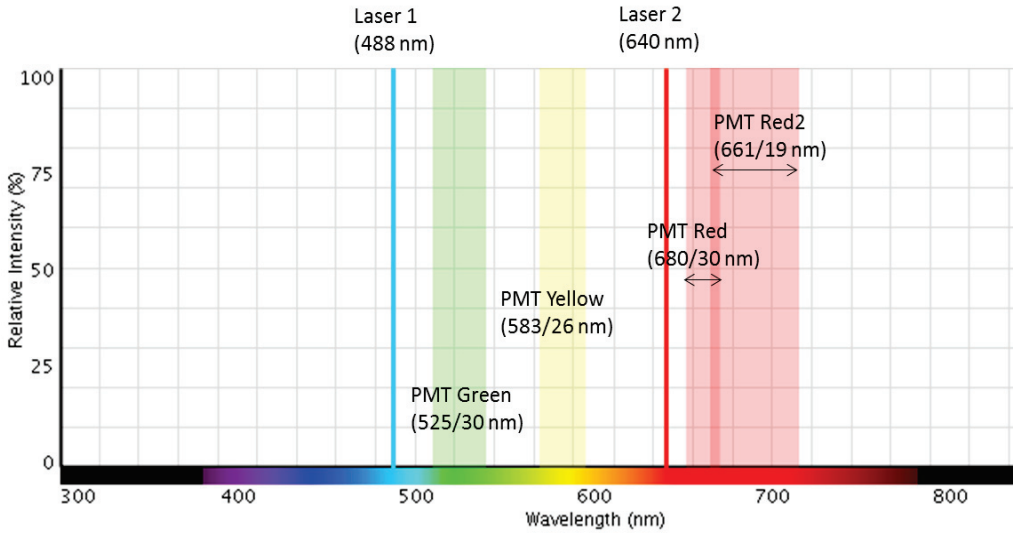


FIGURE 2.15 – Filtres et lasers du cytomètre en flux Guava-6HT

2.2.2 Collecte de l'hémolymphe

La collecte de l'hémolymphe chez *L. stagnalis* peut se réaliser de deux façons. Une **méthode invasive** consiste à prélever de l'hémolymphe directement dans le cœur ou dans les vaisseaux sanguins les plus larges (*e.g.*, ***vena pulmonalis***). Une autre **méthode, non invasive**, consiste à gratter délicatement le pied de l'animal pour déclencher un mécanisme **réflexe de rétraction** dans la coquille et l'expulsion concomitante d'hémolymphe via le **pore hémal** (figure 2.16 p. 111). Ainsi, à l'aide d'une simple micropipette l'hémolymphe peut être collectée de manière non-invasive. Ces deux méthodes ont été décrites par Sminia [1972]. Les critères de validité des deux méthodes se basent sur l'équivalence qualitative de l'hémolymphe collectée : densité hémocytaire et composition ionique. Pour l'ensemble des collectes d'hémolymphe des diverses expérimentations présentées dans ce document, la méthode non invasive a été employée en prenant soin de changer de cône entre deux prélèvements. L'hémolymphe ainsi collectée était mise dans des microtubes en polypropylène à jupe de 500 μl (Dutscher, Dumath, France), dans de la glace afin de minimiser l'adhésion hémocytaire.

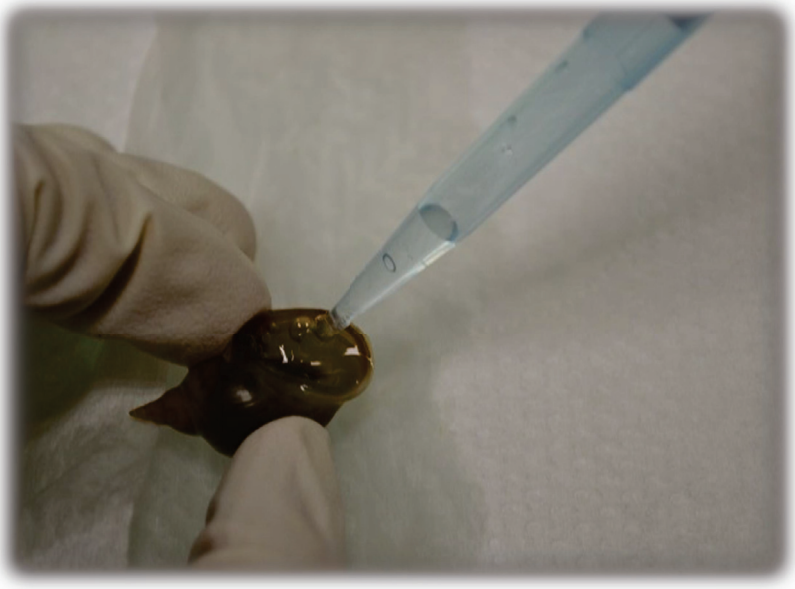


FIGURE 2.16 – Collecte de l'hémolymphe

Remarques :

- Chaque collecte d'hémolymphe — et des marqueurs d'immunocompétence associés — a été réalisée à l'échelle individuelle (*i.e.*, **hémolymphe non mélangée entre individus**).
- L'osmolarité d'un *pool* constitué de l'hémolymphe de 10 limnées a été mesurée à 120 mosm et le pH a été mesuré à 7.9.
- Pour certains des protocoles présentés ci-après, une étape de dilution des échantillons d'hémolymphe était réalisée avec une solution tampon SSB (*snail saline buffer*). Cette solution était préparée au laboratoire avec de l'eau ultrapure puis stérilisée à l'autoclave lorsqu'elle était stockée plusieurs mois. Cette solution n'était pas manipulée en conditions stériles lors de son utilisation (directement sur la paillasse). Les caractéristiques de cette solution, adaptées de Russo & Madec [2007], étaient les suivantes : 5 mM HEPES, 3.7 mM NaOH, 36 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM $CaCl_2$; 145 mosm ; pH= 7.9.

2.2.3 Densités hémocytaires et distributions hémocytaires

2.2.3.1 Mise au point : vérification des éléments nucléés

Principe : Avant d'affiner les méthodes de mesure des futurs marqueurs d'immunocompétence, une étape de vérification était nécessaire. Celle-ci consistait à s'assurer que les réglages de l'appareil et les régions dessinées correspondaient effectivement aux hémocytes. Pour cela, un double marquage SYBR Green—PI a été réalisé :

- Le SYBR Green est un intercalant fluorescent de l'ADN. Ce fluorochrome est lipophile et donc présente la capacité à traverser les membranes biologiques. Ainsi, il va s'intercaler dans l'ADN de toutes les cellules indépendamment de leur statut viable ou non-viable.
- Le PI (*propidium iodide*) est un intercalant fluorescent de l'ADN qui est lipophobe et donc ne présente pas les caractéristiques pour passer les membranes biologiques. Ainsi, le PI ira s'intercaler dans l'ADN des cellules dont la membrane est fortement endommagée ou cassée (*i.e.*, cellules non-viables). Les caractéristiques de fluorescence du SYBR Green et du PI au regard des capacités de mesures du cytomètre Guava sont présentées dans la figure 2.17 (p. 113).

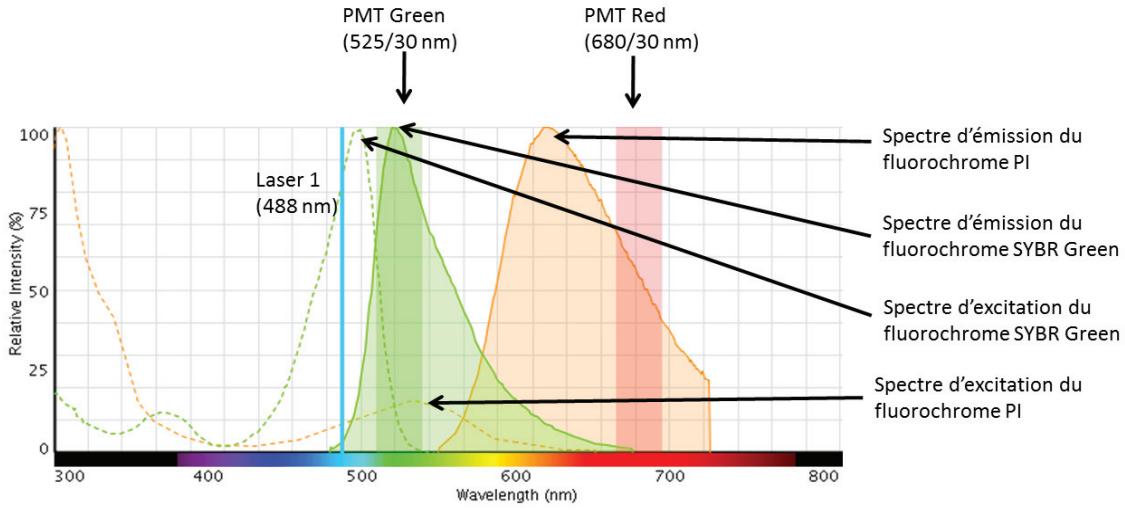


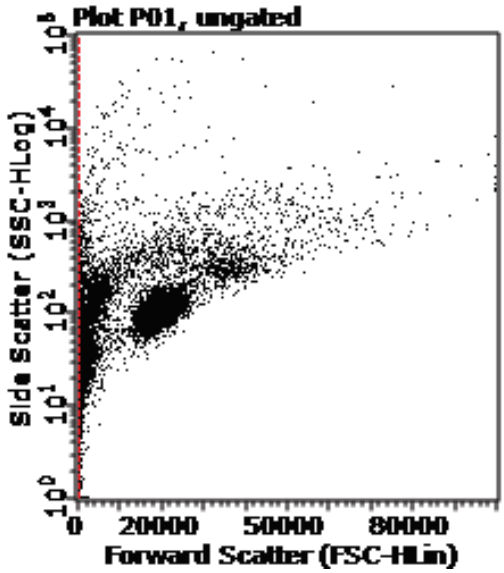
FIGURE 2.17 – Compatibilité d'utilisation des fluorochromes avec le cytomètre Guava 6-HT

Protocole : L'hémolymphe a été collectée sur quelques limnées prises au hasard dans les élevages d'Irstea (30 ±2 mm de longueur). Des volumes de 200 μl ont été transférés dans une microplaque de 96-puits (Greiner, polystyrene, U-bottom, stérile, non traitée pour la culture cellulaire). Deux microlitres d'iodure de propidium (PI) d'une solution stock de 1 $mg.L^{-1}$ étaient ajoutés dans chaque puits. Dix microlitres d'une solution de SYBR Green (1000X, ThermoFisher) ont été ajoutés dans chaque puits. Le contenu des puits a été homogénéisé avec une micropipette multicanaux et la plaque laissée sous agitation lente pendant 10 minutes à l'obscurité. Les réglages du cytomètre en flux étaient ajustés en temps réel avant d'enregistrer les réglages définitifs dont les détails sont présentés dans le tableau (2.2).

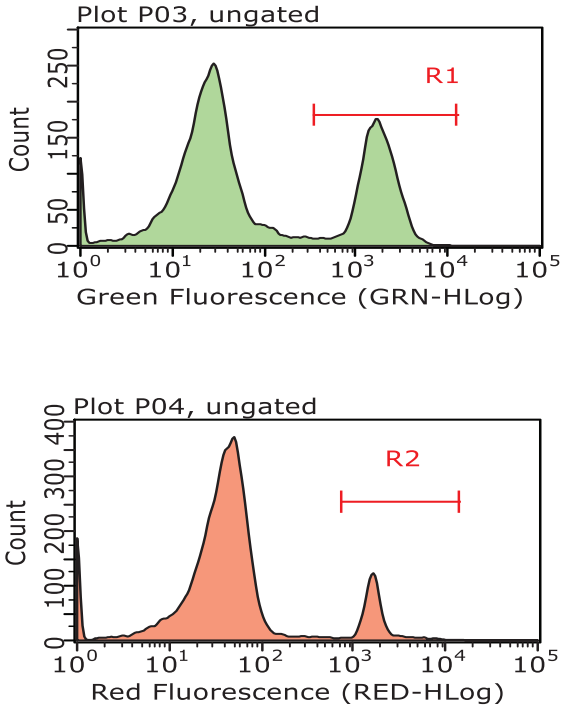
Tableau 2.2 – Réglages du cytomètre en flux

Photomultiplicateur	FSC	SSC	GRN	YEL	RED	RED2	Threshold
voltage	non ajustable	low	high	high	high	low	FSC-H 400
gain	34.9 — 45.3	1.00	8.00	8.00	1.00	1.35	

1. Observation brute des évènements lus par le Guava selon les axes SSC-Hlog-FSCHlin



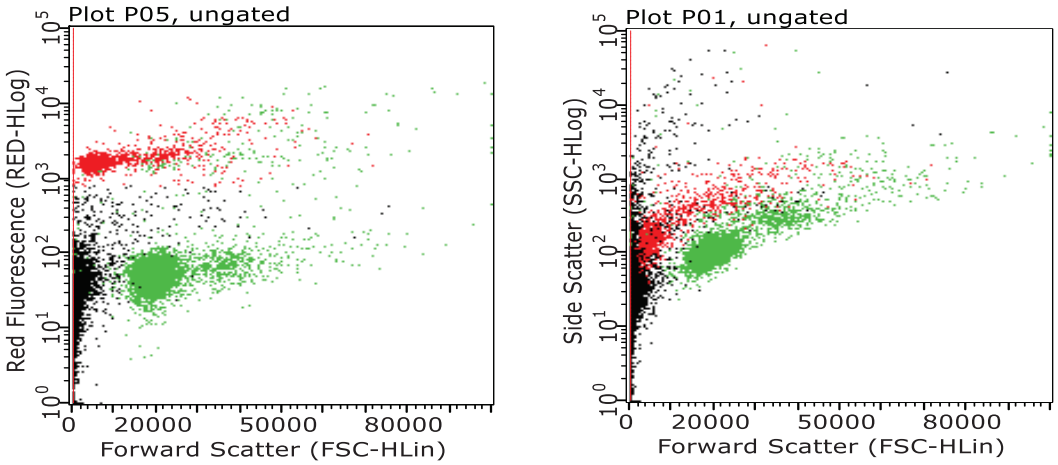
2. Isolation des évènements nucléés



Une double régionalisation est effectuée avec d'une part les évènements à fluorescence positive dans le vert (R1, cellules qui ont intégré le SYBRGreen) et d'autre part les cellules à fluorescence positive dans le PMT rouge (R2, cellules ayant intégré le PI). Les pics de gauche des deux histogrammes correspondent à l'autofluorescence de

particules qui n'ont pas intégré le fluorochrome.

3. Observation de la correspondance des deux régions précédentes (double régionalisation R1 + R2)



Ces résultats montrent que les réglages correspondants du cytomètre en flux permettent de visualiser des évènements nucléés (donc les hémocytes) de *L. stagnalis* : en vert les hémocytes viables et en rouge les hémocytes non-viables.

2.2.3.2 Validation du protocole de mesure de la densité hémocytaire dans l'hémolymphe

Protocole de mesure de la densité hémocytaire : Une fois l'hémolymphe collectée dans les tubes comme expliqué dans les sections précédentes, les densités hémocytaires étaient mesurées par cytométrie en flux. L'acquisition et le calcul se faisaient via le module *Incyte* du logiciel *GuavaSoft 2.7*. Un total de 5000 évènements étaient acquis par échantillon dans la *live-gate* de la figure 2.18 (p. 118) correspondant aux hémocytes circulants. Le cytomètre en flux mesure le volume d'hémolymphe qui a été prélevé afin d'acquérir ces 5000 évènements dans la région correspondante et donc la densité hémocytaire de l'échantillon peut être calculée.

Principe de validation du protocole : Il s'agit de vérifier la précision de mesure de la densité hémocytaire de ce protocole en la comparant avec les densités théoriques de dilutions connues des échantillons.

Validation du protocole : Douze *pools*[6] différents d'hémolymphes ont été constitués à partir de limnées (35 ±2 mm de longueur) provenant des élevages d'Irstea. Les dilutions suivantes ont été réalisées grâce à une solution de tampon SSB : 0.75, 0.5, 0.25 et 0.125. La mesure s'est faite en tubes (polypropylène à jupe de 500 μl, Dutscher, Dumath, France) avec le cytomètre en flux Guava comme expliqué précédemment.

6. *Pool* d'hémolymphe : l'hémolymphe de 4 limnées a été mélangée afin d'avoir suffisamment de volume hémolymphatique pour réaliser les dilutions successives et les lectures correspondantes dans les tubes. En effet, pour plonger dans l'échantillon, le capillaire du cytomètre en flux requiert *a minima* 200 μl lorsque la lecture est faite dans les tubes. Les *pools* ont été réalisés seulement dans ce cas de figure bien particulier de validation de la méthode de mesure de la densité hémocytaire. Ainsi, bien qu'un *pool* corresponde au mélange de plusieurs hémolymphes d'individus, celui-ci constitue *in fine* un seul échantillon (N=1). Dans ce protocole, douze *pools* ont été réalisés et donc N=12, indépendamment du nombre de limnées ponctionnées. Pour les expériences de la suite de ce manuscrit, les hémolymphes n'étaient pas mélangées.

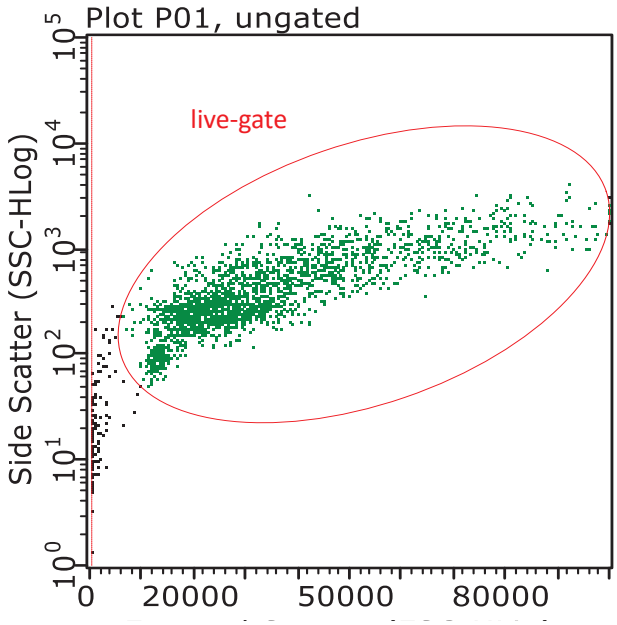


FIGURE 2.18 – Live-gate d'acquisition pour le comptage hémocytaire (cytogramme)

Résultats et discussion : Une bonne linéarité de la densité hémocytaire mesurée par rapport à la densité théorique des dilutions correspondantes a été obtenue (voir figure 2.19). L'ensemble des dilutions a été réalisé avec la même micropipette dont la validité de calibration est révisée annuellement. Les écarts des valeurs observées par rapport aux valeurs attendues correspondent à la somme des incertitudes de mesure de la micropipette, du cytomètre en flux et d'autres facteurs comme par exemple l'adhésion hémocytaire. Ainsi, ce protocole est valide pour mesurer la densité hémocytaire de *L. stagnalis* et les possibles diminutions associées dans le cas d'un suivi individuel au cours du temps.

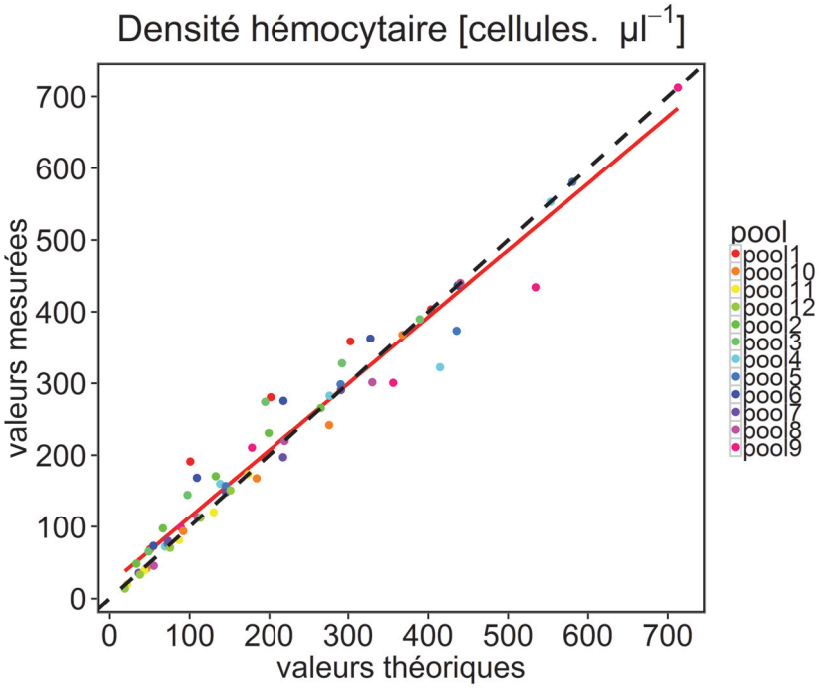


FIGURE 2.19 – Vérification de la précision de comptage des hémocytes

Une vérification complémentaire a été réalisée dans le but de voir si la méthode de détermination de la densité hémocytaire est fiable dans le cas d'une augmentation des densités par rapport au niveau basal qui se situe autour de 500-600 $cellules.\mu l^{-1}$. Pour cela, des billes de 15 microns de diamètres (*i.e.*, proches des diamètres hémocytaires circulants) qui sont conçus pour calibrer les cytomètres (*Thermofisher, Scientific, Flow Cytometry Size Calibration Kit*) ont été diluées dans du SSB pour obtenir des densités théoriques de billes (*i.e.*, trois échantillons "a", "b", et "c" avec des densités initiales croissantes). Des dilutions successives ont été réalisées et les densités mesurées ont été représentées graphiquement en fonction de leurs densités attendues (voir figure 2.20, p. 121).

Une bonne linéarité est obtenue dans la fourchette 125-1800 $billes.\mu l^{-1}$ (fig. 2.20a). Cependant, il semble que la précision de la méthode n'est plus suffisante au-delà de 1800 $billes.\mu l^{-1}$. En effet, les graphiques "b" et "c" (fig. 2.20) montrent une limite de quantification à partir de 1800 $billes.\mu l^{-1}$. Cela est très probablement dû au fait que le capillaire, avec le flux réglé à 0.59 $\mu l.s^{-1}$, sature à partir de cette valeur et donc qu'au-delà les billes ne sont plus comptées comme des évènements "singulets" mais plutôt "doublets" voir plus. Ceci a pour conséquence de sous-estimer la réelle densité de l'échantillon (*i.e.*, deux ou trois évènements seraient comptés pour un seul).

Pour conclure sur ce point, si l'on considère une densité hémocytaire de base à 600 $cellules.\mu l^{-1}$, alors cette méthode de détermination de la densité hémocytaire est précise et permet de détecter (i) une baisse de la densité hémocytaire jusqu'à au moins [7] 50 $cellules.\mu l^{-1}$ et (ii) une augmentation du triple de sa valeur basale (*i.e.*, 1800 $cellules.\mu l^{-1}$).

7. L'exactitude de calibration du cytomètre était vérifiée avant chaque journée de mesure via avec le logiciel EasyCheck et selon le protocole d'utilisation du producteur du kit correspondant (Guava easyCheck Kit, Hayward, CA, USA). Le protocole vérifie la précision de comptage à une valeur fixée de 50 $billes.\mu l^{-1}$

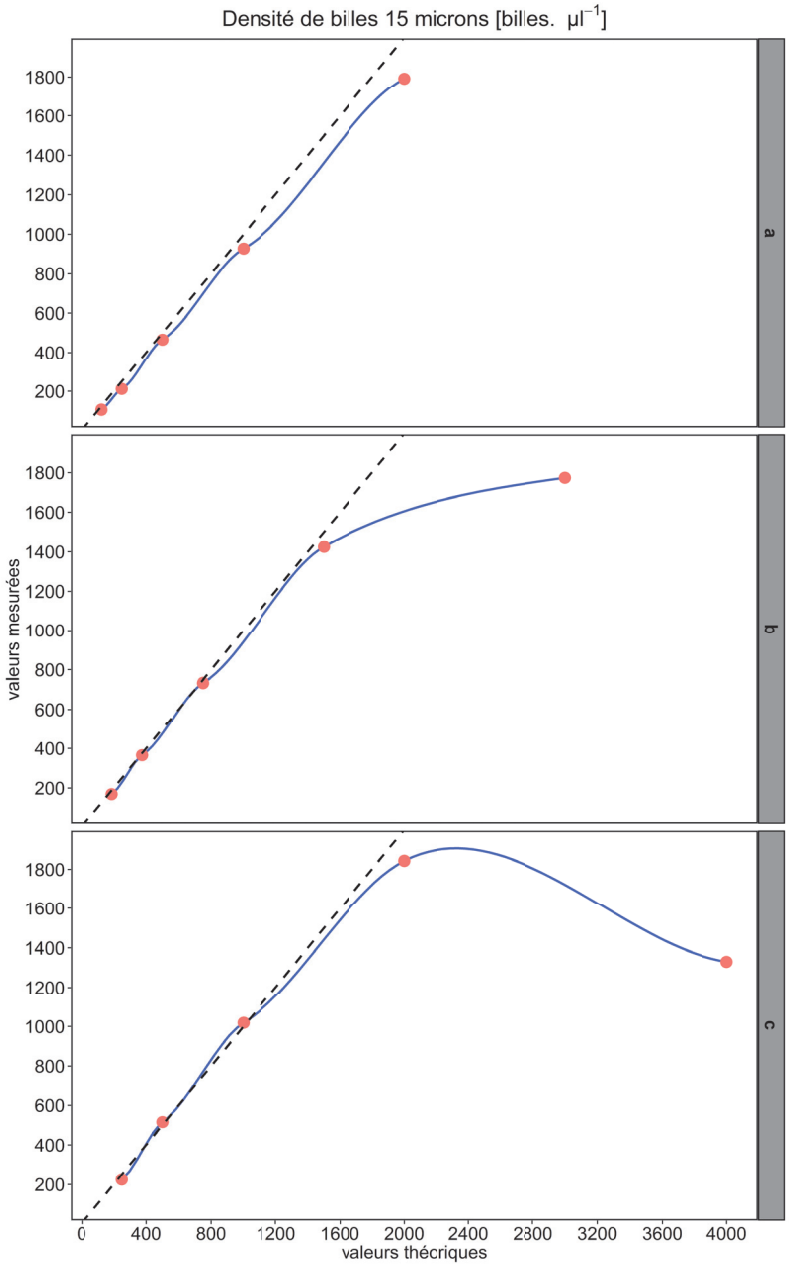
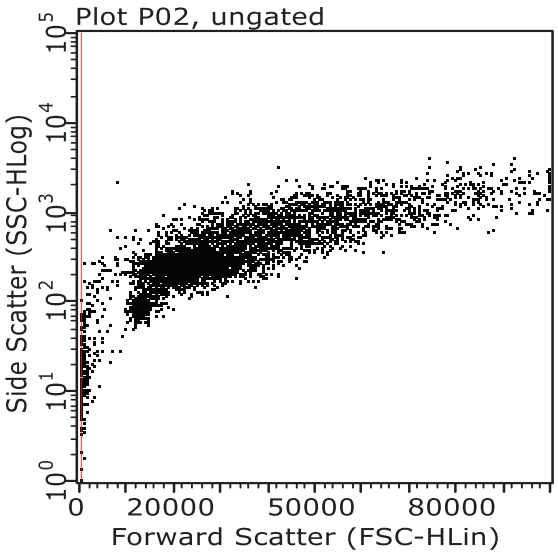


FIGURE 2.20 – Vérification de la précision de comptage et limites si une augmentation de la densité hémocytaire (par rapport au niveau basal ≈ 530 $cellules.\mu l^{-1}$) survient au cours d'une expérimentation

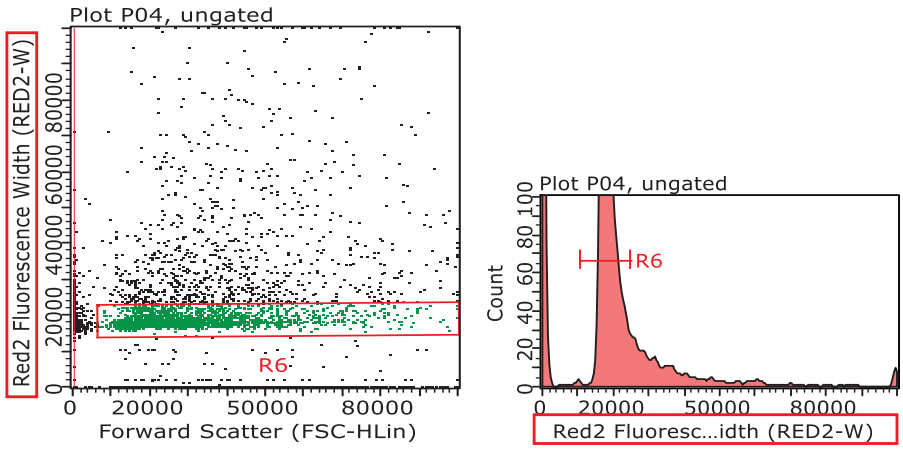
2.2.3.3 Mesure de la distribution hémocytaire (sous-populations)

La distribution hémocytaire est calculée à partir des cytogrammes de l'évaluation de la concentration cellulaire. Pour cela, il faut créer des régions correspondantes aux groupes cellulaires identifiés sur les cytogrammes. Le module Incyte permet de calculer les pourcentages respectifs. Au préalable, et pour l'évaluation de la distribution hémocytaire, les doublets étaient exclus afin d'avoir une information plus précise sur les groupes cellulaires effectifs en s'affranchissant d'artefacts liés à l'agglomération hémocytaire. La procédure expliquée ci-dessous rend compte de la démarche.

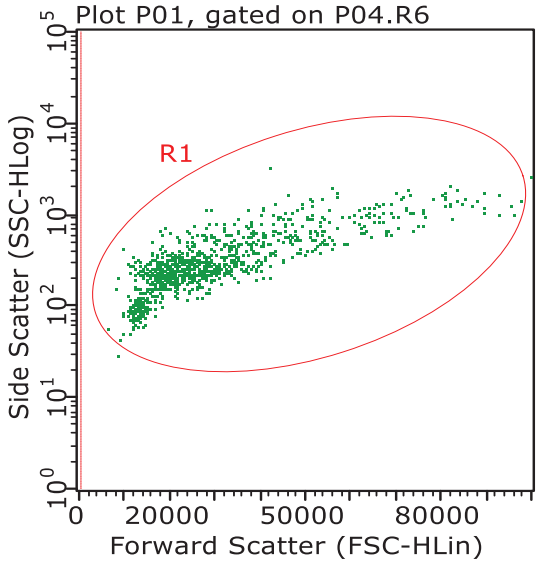
1. Voici le cytogramme sans aucun traitement



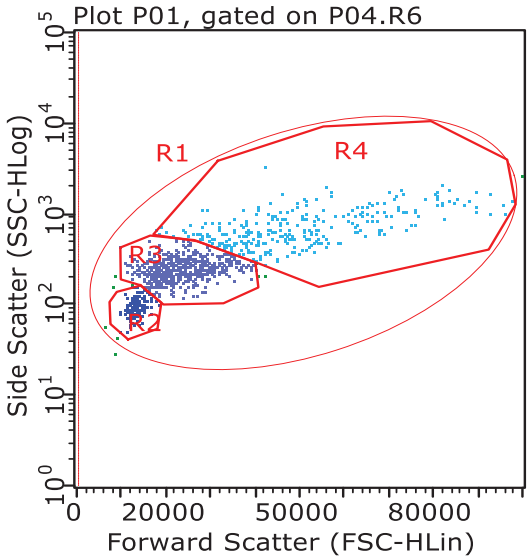
2. Exclusion des doublets : il faut faire une région (ici R6) pour isoler les singulets (*Incyte* ne permet de faire cette analyse qu'avec le PMT Red2, le « W » signifiant « width »). La région sur histogramme ou sur dot plot présentée ci-dessous est équivalente :



3. Sur le cytogramme, il faut représenter les points de R6 (ici= « Plot 01, gated on P04.R6 »)



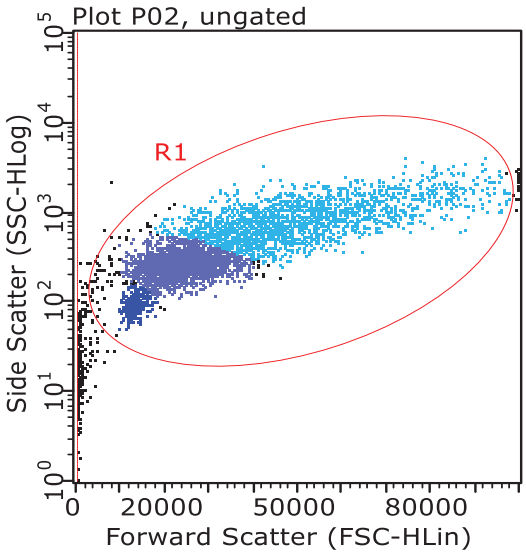
4. Il faut faire les régions correspondantes aux groupes cellulaires à partir du « Plot 01, gated on P04.R6 » :



Avec le logiciel, il est ensuite possible de calculer les pourcentages des groupes respectifs :

- Petits hémocytes (*i.e.*, *round cells*) = % de R2 sur R1
- Hémocytes intermédiaires = % de R3 sur R1
- Hémocytes larges (*i.e.*, *spreading hemocytes*) = % de R4 sur R1

Le cytogramme initial non régionalisé (*i.e.*, *ungated*) mais avec les correspondances en couleur des régions précédentes ressemble à la figure suivante :



2.2.4 Viabilités hémocytaires

2.2.4.1 Protocole de mesure de la viabilité hémocytaire

La viabilité hémocytaire était mesurée en microplaque de 96 puits (Greiner, polystyrene, U-bottom, sterile, non traité pour la culture cellulaire). Chaque puits était ajusté à 50000 hémocytes avec un volume final de 200 μl par puits grâce à l'ajout de solution tampon Snail Saline Buffer (SSB) [5 mM HEPES, 3.7 mM NaOH, 36 mM NaCl, 2mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM $CaCl_2$; 145 mosm ; pH=7.9] pré-chauffée à température ambiante. Deux microlitres d'iodure de propidium (PI) d'une solution stock de 1 mg/ml étaient ajoutés dans chaque puits. Les puits étaient homogénéisés avec une micropipette multicanaux et la plaque laissée sous agitation lente pendant 10 minutes à l'obscurité.

Les mesures étaient acquises dans la région R1 (live-gate) du dot plot (FSC-HLin - RED-HLog) de la figure 2.21 (p. 126). Pour chaque puits, un minimum de 2000 évènements étaient acquis dans cette région. Les cytogrammes étaient visualisables simultanément (dot plot FSC-Hlin – SSC-HLog) (figure 2.21 p. 126). Les points rouges du dot plot de droite correspondent aux hémocytes non viables du dot plot de gauche (PI-positifs). Ainsi, le morphotypage cellulaire observé sur le cytogramme (dot plot de droite) donne une idée de la viabilité hémocytaire de l'échantillon mais une meilleure discrimination de la viabilité est obtenue par observation de la fluorescence du PI des noyaux de cellules non viables. Finallement, le pourcentage de viabilité était obtenu par le calcul du rapport de l'aire sous la courbe des deux histogrammes correspondants à la région R1. Cette opération peut être

réalisée via le logiciel.

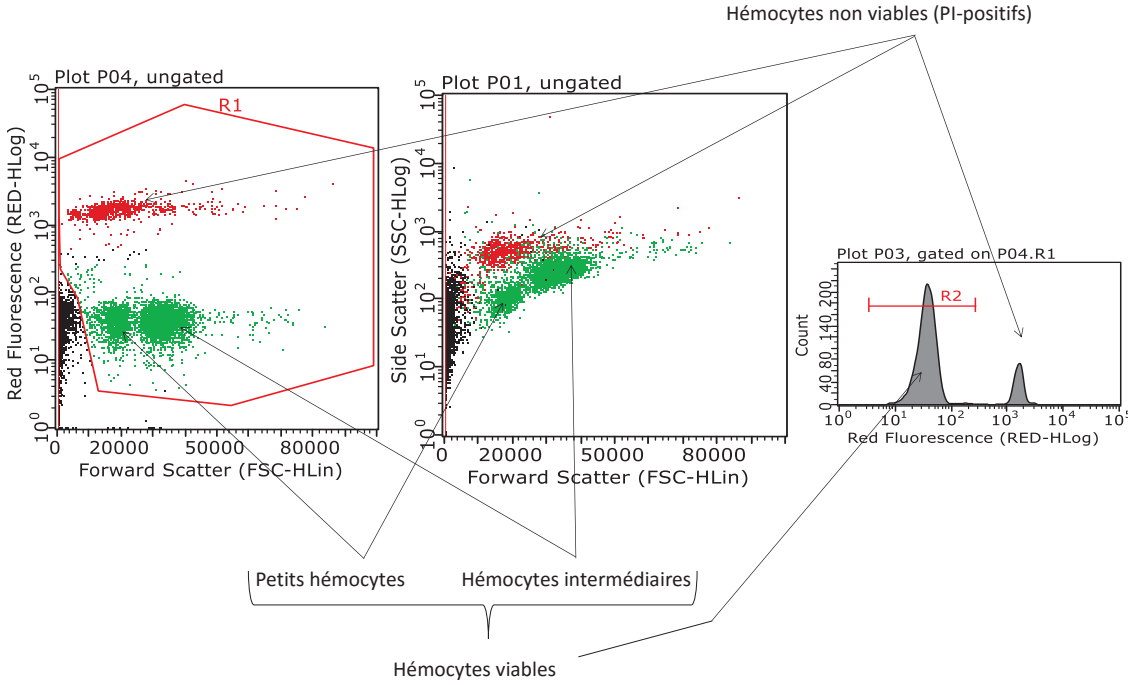


FIGURE 2.21 – Mesure de la viabilité hémocytaire : régions d'acquisition et visualisation des populations

Remarque : La seule exception à ce protocole concerne l'article sur l'Etoposide (chapitre 4). La densité et la viabilité cellulaire ont été mesurées simultanément à l'aide du kit ViaCount (Millipore) et du module correspondant. Cette méthode est plus onéreuse car nécessite le kit spécialement développé par le producteur. En revanche, cette méthode « presse-bouton » est plus rapide car elle permet de mesurer densité et viabilité cellulaire à la fois. Il serait intéressant de comparer les précisions de mesure des différentes techniques sur une même série d'échantillon.

2.2.4.2 Validation du protocole de mesure de la viabilité hémocytaire

Principe : Il s'agit de vérifier qu'une cytotoxicité induite par un xénobiotique de référence (le cadmium) peut être quantifiée — avec une relation dose-réponse — par le protocole de mesure décrit ci-avant.

Validation du protocole : Trois *pools* d'hémolymphe ont été constitués à partir de limnées (30±2 mm de longueur) des élevages d'Irstea (4 limnées pour 1 *pool* d'hémolymphe). Les mesures des densités hémocytaires ont été réalisées comme expliqué dans la partie correspondante ci-avant. L'hémolymphe a été transférée en microplaque (Greiner, polystyrene, U-bottom, stérile, non traité pour la culture cellulaire) avec un ajustement à 50000 cellules par puits. Des dilutions en séries ont été réalisées à partir d'une solution stock de $CdCl_2$ de 1 $g.ml^{-1}$ de SSB. Les dilutions ont été réalisées de manière à obtenir un volume final de 200 μl par puits. Les plaques ont été laissées à l'obscurité sous lente agitation pendant 24h à température ambiante. Ensuite, la viabilité hémocytaire de chaque puits a été mesurée selon le protocole de viabilité présenté précédemment.

Résultats et discussion : La figure 2.22 (p. 128) présente le résultat du test de viabilité. Cette viabilité est ici exprimée en valeurs relatives à la moyenne des témoins après 24h ($\approx$ 50 %) afin de prendre en compte la mortalité hémocytaire *ex vivo* naturelle dans les microplaques. L'obtention d'une courbe dose-réponse témoigne de la possibilité de mesurer la mortalité hémocytaire lors d'une exposition à un polluant toxique grâce à cette méthode de mesure. Par ailleurs, lorsqu'il y a beaucoup de cytotoxicité les régions d'intérêt obtenues avec le cytomètre en flux ont l'aspect de la figure 2.23 (p. 128).

Remarque : Lorsque la viabilité des hémocytes est mesurée sans délai d'attente *ex vivo* considérable (<1h), alors cette viabilité est exprimée en valeurs absolues (% de viabilité), ce qui est le cas pour l'ensemble des expérimentations présentées par la suite. En revanche, une exception a été faite ici car les hémocytes ont été incubés 24h *in vitro* et donc les puits témoins sans cadmium présentaient déjà de la mortalité cellulaire et il semblait plus approprié d'exprimer la viabilité en valeurs relatives au niveau de viabilité des témoins.

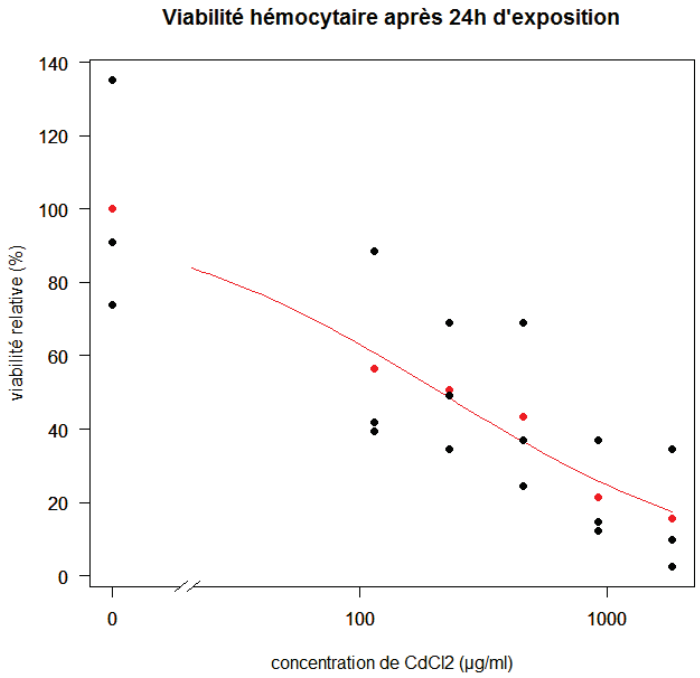


FIGURE 2.22 – Viabilité hémocytaire de *L. stagnalis* après 24h d'exposition *in vitro* au cadmium

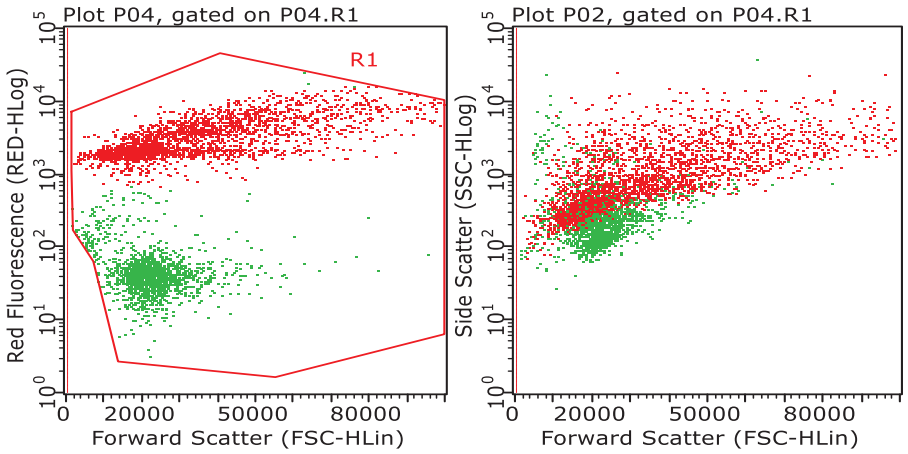


FIGURE 2.23 – *Dot-plots* d'un échantillon hémocytaire de *L. stagnalis* présentant une importante cytotoxicité induite par une exposition *in vitro* au cadmium

2.2.5 Phagocytose

2.2.5.1 Mise au point et mesure

Protocole : L'hémolymphe de chaque individu était collectée comme expliqué ci-avant. Les échantillons étaient dilués à une densité de 250 hémocytes/μl pour un volume final de 200 μl par puits dans une plaque 96-puits (Greiner bio one, traitées pour la culture cellulaire, stériles, F-bottom, polystyrene), ce qui correspond à un ajout de 50 000 hémocytes par puits. Les dilutions se faisaient avec une solution de tampon SSB (voir ci-avant) pré-chauffée à température ambiante. Lorsque la densité hémocytaire de l'échantillon d'hémolymphe était inférieure à 250 cellules/μl, alors 200 μl étaient ajoutés dans le puits, sans dilution.

Ensuite, une quantité de 7.2 $.10^5$ billes fluorescentes (polyscience YG 2.0 μm latex microsphere) était ajoutée dans chaque puits. Le calcul du nombre de billes est basé sur la formule de Brousseau *et al.* [1998b] qui suit, ce qui correspond à un ratio *hémocyte* : *billes* de 1 : 15 lorsque 50 000 hémocytes sont dans le puits :

$$\text{billes par ml} = \frac{6W \times 10^{12}}{\pi \times \partial \times \beta^3}$$

où W= grammes de polymère par ml (0.025 g pour une solution latex de 2.5%)
∂ = densité du polymère ($g.ml^{-1}$) : 1.05 pour du latex
β^3= diamètre des billes de latex (μm)

Chaque échantillon était ensuite homogénéisé avec une micropipette multicanaux. La plaque était protégée de la lumière avec du papier aluminium puis mise sous lente agitation circulaire et horizontale pendant 16h [8].

Ensuite, le surnageant était enlevé et les hémocytes resuspendus avec 200 μl par puits d'une solution de fixation (SSB contenant 0.5% de formaldéhyde (v/v) et 0.2% (w/v) d'azoture de sodium). Chaque plaque était mise à l'obscurité à 4°C jusqu'aux mesures en

8. La durée d'incubation est basée sur le protocole de Gust *et al.* [2013b] où les plaques sont incubées 18h. Pour un début d'incubation dans l'après-midi cela est réalisable, mais pas le matin. Pour 18h d'incubation à partir de — par exemple — 10 :00 am, il faut venir récupérer la microplaque à 4 :00 am le jour suivant. Ainsi, pour une raison pratique, l'évaluation de l'activité de phagocytose de la plupart des autres expériences de ce manuscrit se sont faites avec une incubation des microplaques pendant 24h. Aussi, du fait de la mortalité naturelle des hémocytes, une quantité de 100 000 hémocytes par puit était ajoutée, correspondant à un ratio *hémocytes* : *billes* de 1 : 7 pour l'ajout de 7.2 $.10^5$ billes. Une enceinte thermorégulée à 20°C (Aquatlytic TC serie 140G) accueillait l'ensemble du dispositif afin d'assurer la stabilité de la température et aussi dans un souci de meilleure comparaison des résultats entre des expérimentations réalisées à diverses périodes de l'année.

cytométrie de flux (délai qui n'excédait pas une semaine). Le jour des mesures, le contenu de chaque puits était remis en suspension et bien homogénéisé. Les séries étaient acquises via le module *Incyte* avec les réglages du tableau 2.3.

Tableau 2.3 – Réglages du cytomètre en flux

Photomultiplicateur	FSC	SSC	GRN	YEL	RED	RED2	Threshold
voltage	non ajustable	low	high	high	high	low	FSC-H 400
gain	49.4	1.00	1.00	5.91	1.00	1.35	

Un minimum de 15 000 évènements étaient acquis dans la région R1 (*live-gate*) pour chaque puits. La figure 2.24 correspond à un échantillon contenant seulement des billes (*i.e.*, témoins négatif intraplaque). Il peut être observé que la fenêtre d'acquisition sur la région d'intérêt R1 (*i.e.*, hémocytes) ne prend pas en compte les évènements de billes seules et sont donc exclues de l'analyse. La figure 2.25 page suivante présente l'acquisition d'un puits contenant des hémocytes qui ont été mis en contact avec des billes pendant 24 h. Les couleurs du *dot plot* de droite représentent chaque hémocyte avec le nombre de billes phagocytées :

- bleu : 0 billes phagocytées
- vert : 1 billes phagocytées
- jaune : 2 billes phagocytées
- rouge : au moins 3 billes phagocytées

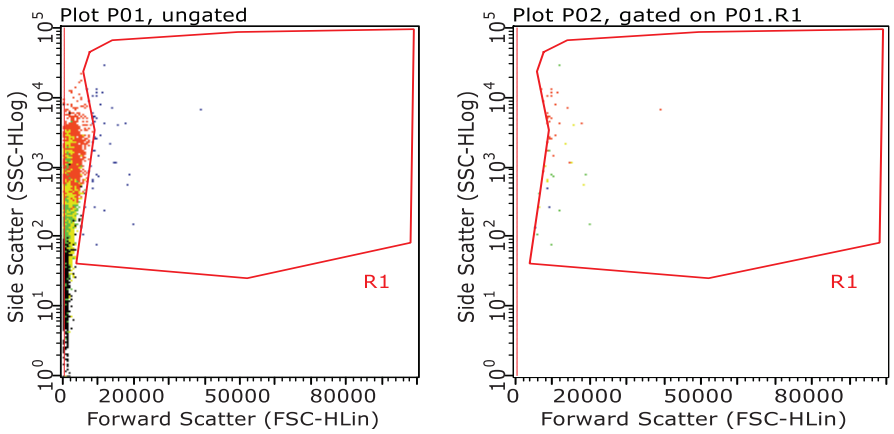


FIGURE 2.24 – Fenêtre d'acquisition des évènements d'un échantillon sans hémocytes mais avec des billes (témoins négatif)

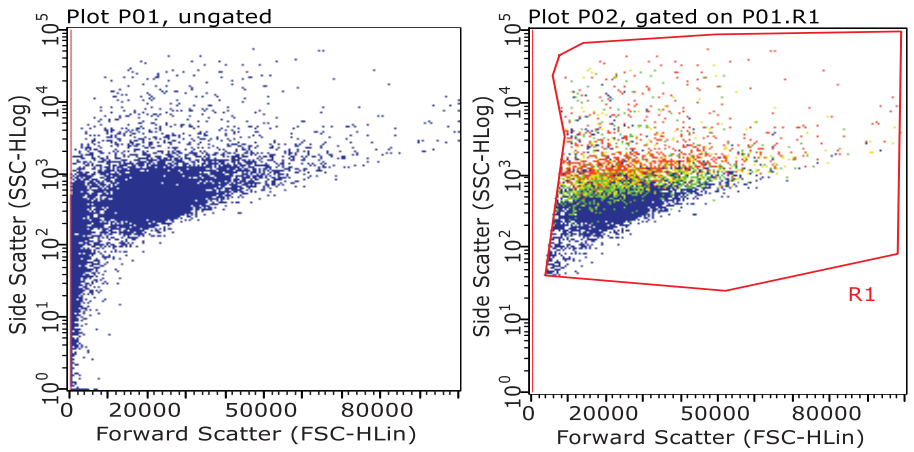


FIGURE 2.25 – Fenêtre d'acquisition des évènements d'un échantillon avec hémocytes et billes

Justification du protocole et discussion : Dans la littérature, il est fréquent de voir des ratios *cellules* : *billes* de 1 : 100 [Bouchard *et al.* , 1999; Fournier *et al.* , 2002], mais ce ratio élevé présente différents inconvénients : (i) les billes peuvent se coller à la surface des cellules, s'agglomérer et brouiller la qualité du signal et (ii) le cytomètre Guava peut saturer lorsqu'il y a trop d'évènements à compter dans un échantillon. C'est pour cette raison qu'un ratio *hémocyte* : *billes* plus faible était visé.

Dans ce protocole, l'ajout de 7.2 $.10^5$ pour 50 000 hémocytes correspondait à un ratio *hémocyte* : *billes* de 1 : 15. Pour les autres expériences du manuscrit, un ajout de 100 000 hémocytes par puits était réalisé afin d'obtenir une meilleure qualité d'échantillon après les 24h d'incubation où de la mortalité cellulaire survient naturellement. La fraction des cellules qui internalisent plus de 7—8 billes est souvent très faible et nous pouvons considérer que dans la majorité des cas, plus de la moitié des cellules ne phagocytent aucune bille. Ainsi, un ajout de 7.2 $.10^5$ pour 100 000 hémocytes permet d'exposer les hémocytes à un excès de billes (car le ratio *hémocyte* : *billes* est de 1 : 7) et cela correspond à un compromis pour ne pas gêner la qualité du signal lorsqu'il y a trop de billes.

Une activité de phagocytose par les hémocytes a été observée chez de nombreux gastéropodes. Il semblerait que les granulocytes ont une activité phagocytaire plus importante que les hyalinocytes et les hémocytes peu ou pas différenciés. Cependant, plus d'études seraient nécessaires pour évaluer l'activité comparée des différentes sous-populations hémocytaires chez *L. stagnalis*. Ainsi, la méthode de mesure des indicateurs de phagocy-

tose présentée ci-avant se contente d'une évaluation globale portant sur l'ensemble des hémocytes d'un organisme. L'activité de phagocytose n'était pas mesurée en temps réel à proprement parler. Elle se faisait sur des cellules fixées qui avaient préalablement été mises en contact avec des microbilles en latex pendant un temps suffisant pour phagocyter. Cependant, les endpoints associés étaient directement liés à une compétence cellulaire dynamique (*i.e.*, fonctionnelle) à engloutir des microparticules. Pour cette raison, il semble justifié de pouvoir parler d'« activité phagocytaire ».

Traitement des résultats : L'histogramme suivant (fig. 2.26) représente la fluorescence mesurée par le PMT Green du cytomètre en flux lorsque l'analyse est limitée à la région d'intérêt R1. Le premier pic sur la gauche correspond à l'autofluorescence des hémocytes (n'ayant rien phagocyté) dans la bande-passante du PMT Green. Chaque pic suivant correspond au nombre de billes phagocytées (relation stochiométrique) : 1er pic = 1 bille, 2ème pic = 2 billes, etc.

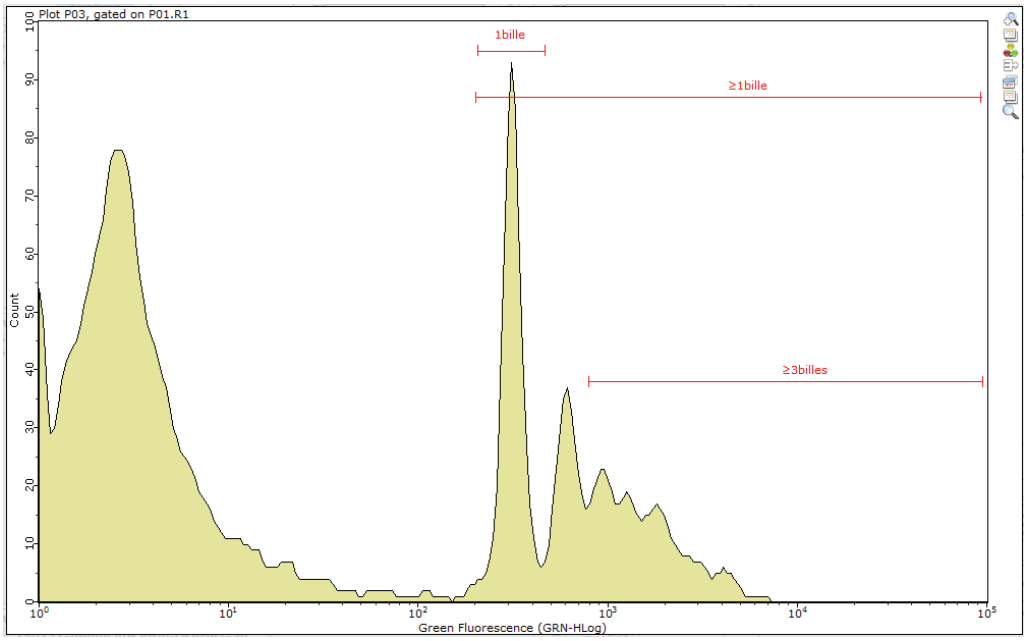


FIGURE 2.26 – Détermination des billes phagocytées

A partir de ces données, plusieurs indicateurs d'activité phagocytaire peuvent être calculés. Le tableau 2.4 suivant résume les calculs qui peuvent être réalisés :

Tableau 2.4 – Post-traitement des acquisitions concernant l'analyse phagocytaire des hémocytes

endpoint	formule	interprétation
capacité de phagocytose (%)	$\left(\frac{\text{évènements} \geq 1 \text{ bille de R1}}{\text{évènements totaux de R1}}\right) \times 100$	Certains auteurs parlent d'immunocapacité. Cet indicateur permet de conclure sur la capacité mécanique des hémocytes à ingérer des microparticules. Il fournit la proportion d'hémocytes qui ont la capacité de phagocyter et donc la proportion d'hémocytes étant des phagocytes.
efficacité de phagocytose (%)	$\left(\frac{\text{évènements} \geq 3 \text{ billes de R1}}{\text{évènements totaux de R1}}\right) \times 100$	Certains auteurs parlent d'immunoefficacité. Cet indicateur permet de voir la part des hémocytes qui sont efficaces (*i.e.*, qui phagocytent au moins 3 billes)
Activité de phagocytose	$\left(\frac{\text{moyenne de fluorescence de R2 dans PMT Green}}{\text{moyenne de fluorescence de R3 dans PMT Green}}\right)$	Nombre moyen de billes phagocytées parmi les hémocytes actifs. Cet indicateur peut être rapproché du précédent dans la mesure où il renseigne sur l'activité globale des hémocytes actifs

2.2.5.2 Validation du protocole et étude de la variabilité naturelle

Principe : Il s'agit de collecter l'hémolymphe d'organismes et d'en étudier (i) la variabilité sans présence de toxique (dite naturelle) et (ii) l'effet d'une inhibition induite de la phagocytose.

Design expérimental : Un total de 18 organismes (30 ± 1 mm de longueur, collectés dans les élevages d'Irstea). Lors de chaque collecte d'hémolymphe, les hémocytes étaient exposés aux billes en latex pendant 16h et la mesure de la phagocytose se faisait comme cela a été présenté dans le protocole ci-avant. Un puits supplémentaire par individu était mis en place. Celui-ci consistait en un puits *témoins négatif* dans lequel un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine et donc un inhibiteur des phénomènes de phagocytose était coincubé. Pour cela, lors de la mise en microplaque et de l'ajustement de 50 000 hémocytes/puits, la cytochalasine B (DMSO, Sigma, Saint-Quentin Fallavier) était ajoutée — trois heures avant les billes en latex — à une concentration de 104 μM (0.1% de DMSO).

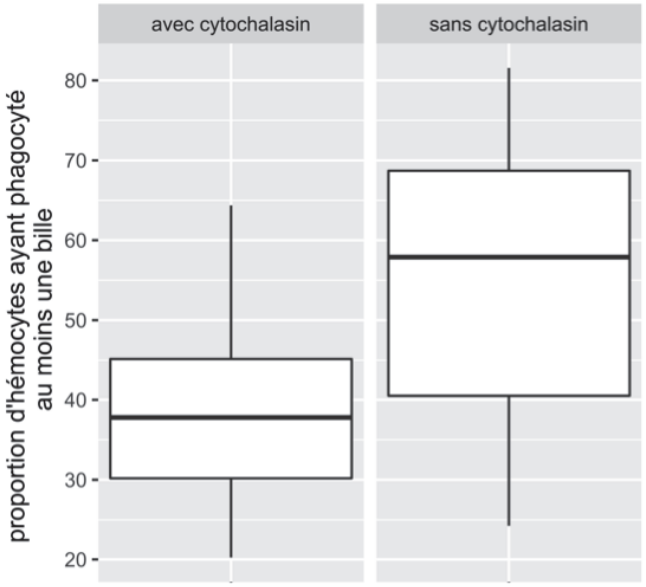


FIGURE 2.27 – Capacité de phagocytose

Résultats et discussion : Une forte variabilité inter-individuelle de la capacité de phagocytose peut être observée (fig. 2.27, p.135). Cette variabilité reflète les conditions dites « normales » d'élevage au laboratoire. L'effet inhibiteur de la cytochalasine B est significatif pour la capacité de phagocytose. Les concentrations en cytochalasine B (104 μM) et de DMSO (0.1% et non pas 0.01% car impossible de concentrer plus la solution mère déjà préparée par le fabricant) sont relativement fortes. Des essais préliminaires à des concentrations moins élevées en DMSO (et donc en cytochalasine B) n'ont pas permis d'observer de diminution des divers *endpoints*. Par ailleurs, la quantité d'hémocytes par individu était insuffisante pour réaliser des groupes témoins de conditions *in vitro* (*e.g.*, témoins DMSO 0.1%).

Selon Araya *et al.* [2009], la fluorescence observée après exposition à la cytochalasine B (10 μg/ml, hémocytes de palourde *Mya arenaria*) correspond aux billes fluorescentes collées à la surface des membranes cellulaires et qui n'ont pas été internalisées dans le compartiment intracellulaire. Elles ne correspondraient donc pas à de la phagocytose. Dans tous les cas, ces résultats montrent que l'évaluation de la capacité et l'efficacité de phagocytose permet de conclure à une immunotoxicité induite par l'exposition *in vitro* à la cytochalasine B. Indépendamment de la nature de la toxicité (cytotoxicité ou toxicité fonctionnelle si inhibition spécifique de la fonction de phagocytose), celle-ci reflète une

baisse de la capacité globale à réaliser la phagocytose et donc une baisse de l'immunocompétence de l'animal. Ainsi, dans le cadre d'une exposition à un xénobiotique *in vivo* sur des organismes entiers, une telle immunotoxicité pourrait être mesurée avec le protocole décrit ci-dessus. Cette immunotoxicité indiquerait une diminution de l'immunocompétence de l'organisme mais serait insuffisante pour envisager la nature et le mode d'action de la toxicité.

2.2.5.3 Confirmation de l'internalisation des billes en latex coincubées avec les hémocytes

Principe et méthode : Il s'agit d'observer les billes en latex après une coincubation de 24h avec les hémocytes en microplaque comme expliqué dans le protocole de mesure de la phagocytose dans la section précédente. En revanche, les cellules n'ont pas été analysées en cytométrie de flux mais une double coloration May Grünwald-Giemsa a été ralisée (voir détails sur la coloration au chapitre 3).

La figure 2.28 est une image de synthèse qui illustre la manière mécanique de "gober" les billes en latex par les hémocytes. Initialement, elle représente un neutrophile qui phagocyte une bactérie (source : oregonstate.edu).

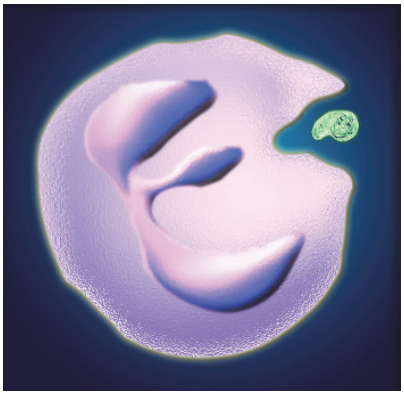


FIGURE 2.28 – Représentation de la phagocytose non-spécifique envers une bactérie ou bille en latex

Résultats et discussion : Les billes en latex semblent internalisées dans les hémocytes (figure 2.29, p. 138). Cependant le plan d'observation ne permet pas de le confirmer car elles pourraient être collées sur le dessus de la membrane plasmatique des hémocytes. Ainsi, il faudrait les observer en microscopie électronique à balayage pour observer la part des billes collées à la surface des hémocytes et en microcopie électronique à transmission pour observer les billes internalisées dans les hémocytes. Il en va de même pour l'observation de bactéries (fig. 2.30, p. 138) qui semblent (i) internalisées dans les hémocytes et (ii) destructurées et donc probablement mortes à l'extérieur des hémocytes (voir figure 2.30, p. 138). Cette image a été obtenue après avoir laissé les hémocytes pendant 24h dans une boite de pétri en conditions non-stériles. Nous pouvons observer le développement de bactéries.

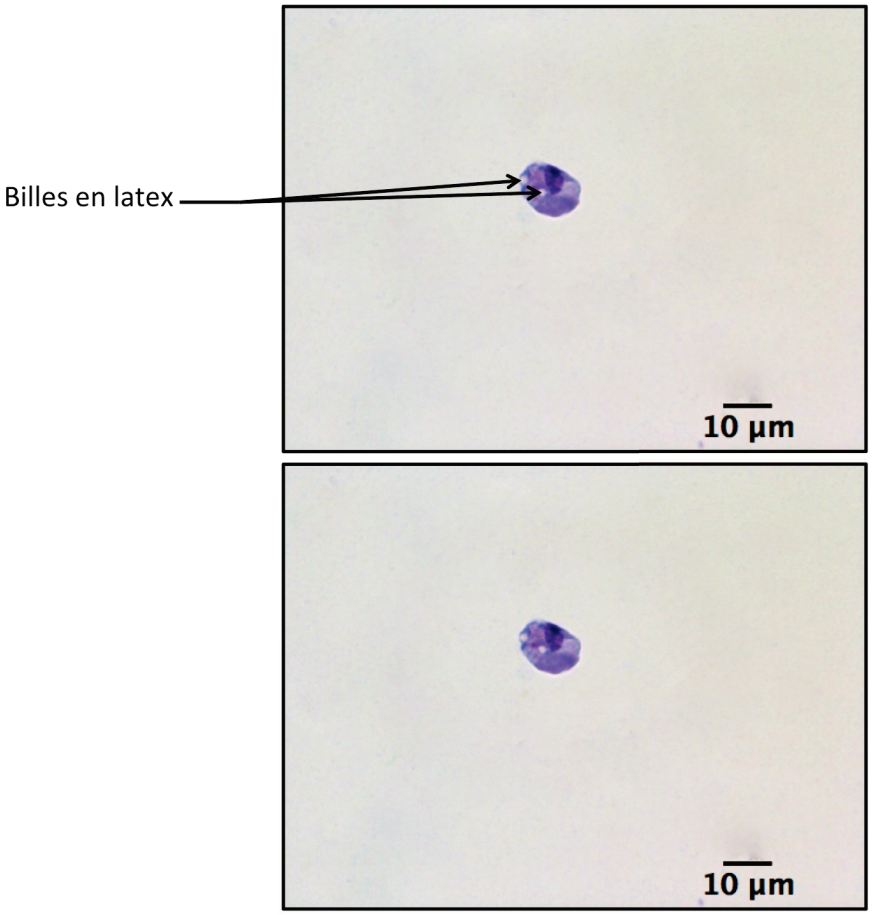


FIGURE 2.29 – billes en latex co-incubées avec des hémocytes et coloration de May-Grünwald-Giemsa

L'image du bas correspond à l'image du haut sans les flèches afin de mieux visualiser la cellule et les billes.

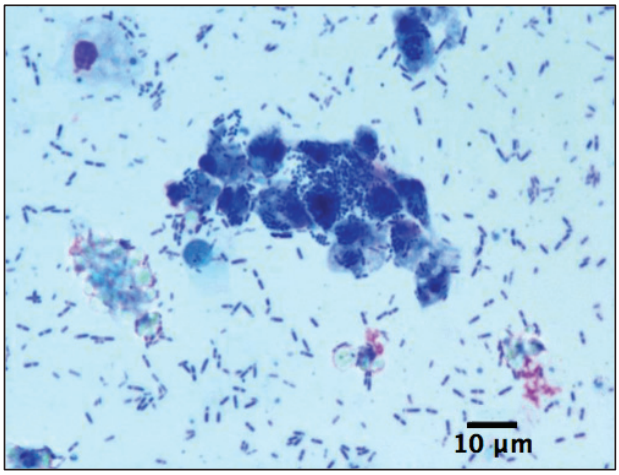


FIGURE 2.30 – Hémocytes, bactéries et coloration de May-Grunwald-Giemsa

2.2.6 Activité oxydative immunocompétente

Fonction biologique : L'activité oxydative immunocompétente des hémocytes a pour but de lutter activement contre des agents infectieux par la production de molécules réactives aux propriétés biocides (ROS pour *reactive oxygen species* et RNS pour *reactive nitrogen species*). Souvent, cette activité est appelée *oxidative burst* ou *respiratory burst* chez les cellules immunitaires d'animaux vertébrés. Cette appellation vient du fait que le phénomène est transitoire et constitue plutôt une « flambée oxydative » ou « flambée respiratoire » car l'oxygène qui alimente la chaine enzymatique correspondante vient en grande partie du métabolisme énergétique mitochondrial. Cependant, chez les animaux invertébrés, les mécanismes semblent différents et moins brefs dans le temps. Il n'est pas consensuellement admis que le phénomène est transitoire chez tous les invertébrés. Le phénomène serait plutôt continu mais inductible. Ainsi, il est préférable de parler d'activité oxydative immunocompétente inductible par des PAMPs. Chez les vertébrés, cette activité est liée au complexe enzymatique NADPH-oxydase. Chez *L. stagnalis*, Adema *et al.* [1993] ont affirmé que cette activité est probablement liée à des enzymes de la famille NADPH-oxydase. Plus de preuves sont nécessaires pour confirmer la nature des enzymes impliquées dans cette activité oxydative immunocompétente chez *L. stagnalis*.

Avant-propos sur la méthode de mesure : La mesure de cette activité peut se faire selon différentes méthodes et de manière plus ou moins spécifique. Elle peut se faire en cytométrie de flux ; l'avantage étant de pouvoir isoler une partie des hémocytes (*e.g.*, granulocytes) pour déterminer leur pouvoir oxydant sur la sonde fluorescente utilisée. L'inconvénient est que la mesure se fait échantillon par échantillon. Ainsi, il est difficile d'acquérir plusieurs temps de mesure sur un seul échantillon dès lors qu'il y a beaucoup d'échantillons. En effet, la cytométrie en flux n'est pas du tout adaptée pour mesurer une activité enzymatique et il y a donc davantage d'inconvénients que d'avantages à l'utiliser dans ce cas de figure. Pour ces raisons, il a été décidé de mettre au point la mesure de l'activité oxydative par spectrofluorimétrie. Cela permet de suivre une cinétique plus aisément et de multiplier les échantillons (*e.g.*, triplicats).

Remarque : dans le cadre d'une utilisation en écotoxicologie, l'étude de l'activité oxydative des hémocytes et de leur capacité de réponse à une immunostimulation me parait

pertinente en tant que marqueur d'immunocompétence. Ainsi, l'étude de cette mesure doit s'envisager sous la forme « Quelle capacité oxydative (biocide) par équivalent-μl d'hémolymphe l'animal est-il capable de fournir face à une hypothétique invasion de microorganisme ? ». Nous ne nous intéressons pas à du « stress oxydatif » mais à une « capacité de défense à fournir une activité oxydative ». Enfin, cette activité est liée à un mécanisme enzymatique mais lorsque nous parlons ici d'activité oxydative ou de cinétique oxydative, il ne faut pas l'entendre sous la forme d'activité enzymatique au sens de vitesse enzymatique de Michaelis-Menten. Ces raisons justifient les méthodes de mesure et de traitement des résultats employés pour cet immunomarqueur. En particulier, il ne nous semblait pas pertinent de normaliser par la quantité de protéines totales. Nous pensons plus informatif d'exprimer l'activité oxydative comme la capacité à oxyder la sonde (*i.e.*, la quantité de matière du produit d'oxydation du H_2DCFDA qui est le DCF) par minute et par équivalent-μl d'hémolymphe par animal.

Méthodologie : Le protocole a été validé et la variabilité en « conditions normales » (*i.e.*, conditions d'élevages sans toxiques) des organismes soumis à une collecte répétée d'hémolymphe (3 collectes à 48h d'intervalle) a été étudiée. Une note technique a été rédigée à ce propos avec l'explication détaillée de la méthode (**voir article 3 du chapitre 3**).

2.2.7 Phénol oxydase

Fonction biologique : L'activité phénol oxydase est impliquée dans plusieurs processus de protection (physique, chimique ou biologique) via la formation *in fine* de mélanine (*e.g.*, protection contre les UVs, protection contre les microorganismes, protection contre certains produits chimiques). Dans le cadre du système immunitaire des invertébrés, il a été démontré chez de nombreuses espèces que cette activité est fortement impliquée dans l'efficacité de destruction des pathogènes. L'hémolymphe (notamment les hémocytes) a la capacité de produire une activité phénol oxydase et ainsi de permettre la formation d'une capsule de mélanine autour des microorganismes. De cette manière, ces derniers voient leur motilité stoppée. Les hémocytes peuvent plus facilement les phagocyter.

Avant-propos sur la méthode de mesure : Le même raisonnement que pour la mesure de l'activité oxydative a été mené. Nous nous intéressons ici à un marqueur d'im-

munocompétence c'est-à-dire, en l'occurrence, à la capacité hémolymphatique de l'animal à fournir la/les activités enzymatiques nécessaires pour la formation de mélanine. La sonde utilisée est le L-DOPA qui est enzymatiquement transformée en quinone puis non-enzymatiquement polymérisée en mélanine. L'absorbance à 480 nm permet de rendre compte de la formation de mélanine. Il est très largement décrit dans la littérature que la conversion en quinone est réalisée en grande partie par les enzymes de la famille des phénol oxydases. Cependant d'autres enzymes auraient la capacité à permettre la formation de mélanine (*e.g.*, hémocyanines, carboxylases, etc) à partir de ce même substrat. Ainsi, ce test est peu spécifique d'où notamment l'appellation en anglais de *phenol-oxidase-like activity*. La méthode présentée ci-dessous est librement adaptée de Seppälä & Leicht [2013].

Design expérimental : Le protocole a été validé sur 7 limnées (30 ±2 mm de longueur) prises au hasard dans les élevages du laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea.

Protocole de mesure : L'hémolymphe de chaque individu est déposée sur une plaque 96 puits (Greiner bio one, traitées pour la culture cellulaire, stériles, F-bottom, polystyrene) en triplicat (50 μl par puits), puis 50 μl d'une solution de L-DOPA (5 mg/ml de SSB) — qui est préparée extemporanément — est ajoutée dans chaque puits. La plaque est mise sous agitation modérée, à l'abri de la lumière, pendant 30 secondes puis l'absorbance à 480 nm est mesurée toutes les 5 minutes pendant 1 heure au moyen du spectrofluorimètre TECAN. Le détail des réglages est présenté dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 – Réglages du spectrofluorimètre pour mesurer l'activité *phenol-oxidase-like* ou activité phénol-oxydase non-spécifique

Measurement mode	Absorbance
Wavelength	480 nm
Number of flashes	1
Plate definition file	GRE96ft
Number of kinetic cycles	9
Kinetic interval	300 s
Shake duration (Orbital Normal)	3s

Résultats et discussion : La comparaison entre les échantillons d'hémolymphe et les témoins négatifs sans hémolymphe montre une claire induction de l'activité phénol-oxydase non spécifique (PO). Il y a peu de variabilité entre triplicats de plaque. Cette méthode

est donc valide pour mesurer l'activité de PO non spécifique comme marqueur d'immunocompétence chez *L. stagnalis*.

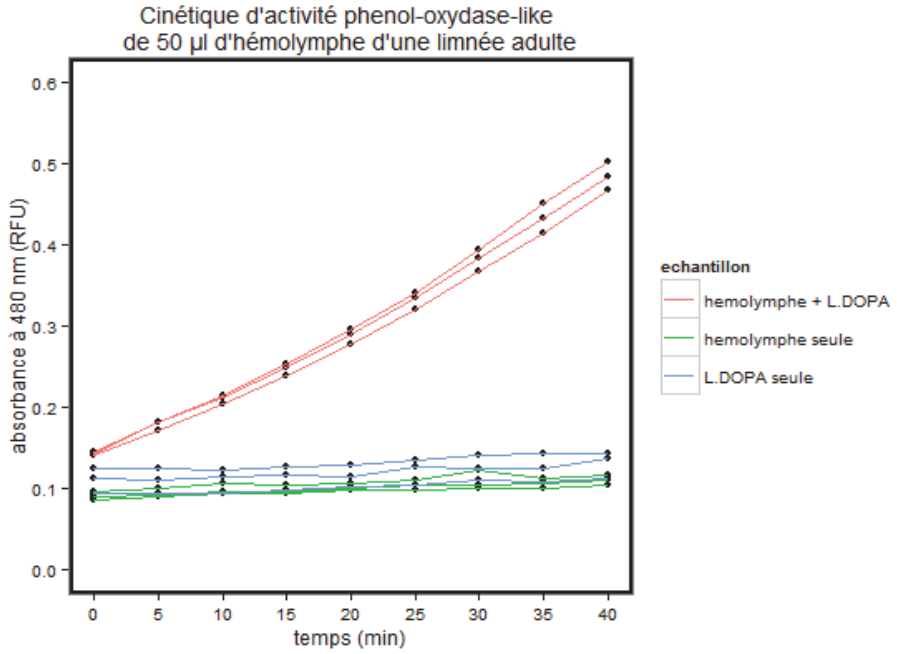


FIGURE 2.31 – Cinétique d'activité PO de 50 μl d'hémolymphe d'une limnée adulte

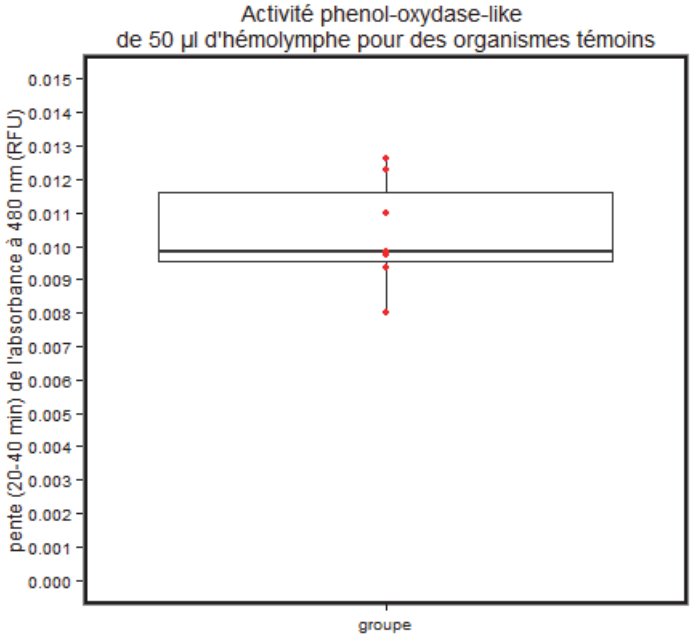


FIGURE 2.32 – Activité PO pour des organismes témoins

2.3 Analyses statistiques

2.3.1 Choix des représentations graphiques

Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel R [R, 2016]. Certains graphiques ont été réalisés avec le package *ggplot2* [Wickham, 2009] dans l'environnement du logiciel R.

Les suivis individuels dans le temps des marqueurs d'immunocompétence ont été représentés directement avec les points de mesure par individu et à chaque jour de mesure afin de percevoir correctement la variabilité des données brutes. Ce type de représentation permet de montrer au mieux les variabilités inter et intra-individuelles (dans le temps) des biomarqueurs. Souvent dans les articles, les représentations se font par moyenne de jour de mesure et donc l'information sur l'évolution de la valeur du biomarqueur par individu n'est pas représentée. Les barres d'erreur associées sont aussi souvent des écart-types (ET) mais il faut garder à l'esprit que la moyenne ± ET ne représente que 68% de la distribution des données si celle-ci suit une loi normale. Ainsi, en deçà d'environ 20—30 points de mesures il est souvent préférable de représenter directement les données brutes (points de mesure). Au delà, d'autres types de représentations peuvent être considérées afin d'améliorer la lisibilité, au détriment de l'information sur l'évolution dans le temps pour un individu.

Des exceptions ont été faites pour les analyses de biomarqueurs fonctionnels car toutes les études n'avaient pas plusieurs points de mesure (*e.g.*, un seul jour de mesure) par individu pour ces *endpoints*. Ainsi, pour ces marqueurs (phagocytose, activité phénoloxydase et activité oxydative), des boites à moustache (*i.e.*, *boxplots*) ont été réalisées [9] car elles permettent une bonne représentation de la distribution des données : les valeurs extrêmes (minimum et maximum), le premier et le troisième quartile et la médiane.

9. à l'exception de l'article sur l'Etoposide car au moment de rédiger cette courte communication le choix ne s'est pas porté sur les *boites à moustaches*

2.3.2 Modèles linéaires mixtes

2.3.2.1 Présentation

Des LMEMs (*linear mixed-effect models*) ont été utilisés pour analyser les jeux de données acquis sur les marqueurs d'immunocompétence. Ce choix a été fait car les LMEMs sont des outils statistiques puissants (au sens de la fiabilité de l'implication respective des différents effets modélisés), flexibles et qui permettent de bien comprendre les tendances d'un jeu de données plus ou moins complexe (*e.g.*, données appariées) où plusieurs types d'effets co-existent. Dans l'introduction de leur livre "*Mixed effect Models in S and S-Plus*", Pinheiro et Bates (2000) posent le contexte pour utiliser ce genre d'outils :

« *Mixed-effects models provide a flexible and powerful tool for the analysis of grouped data, which arise in many areas as diverse as agriculture, biology, economics, manufacturing, and geophysics. Examples of grouped data include longitudinal data, repeated mesures, blocked designs, and multilevel data. The increasing popularity of mixed-effects models is explained by the flexibility they offer in modeling the within-group correlation often present in grouped data, by the handling of balanced and unbalanced data in an unified framework, and by the availability of reliable and efficient software for fitting them.* »

Ainsi, ces outils statistiques sont appropriés pour décrire les données collectées sur les marqueurs d'immunocompétence et quantifier les divers effets respectifs dans les études correspondantes de ce manuscrit. Par exemple, le suivi individuel d'un marqueur dans le temps peut être analysé avec les LMEMs en incluant un effet fixe du jour de mesure et un effet aléatoire de l'individu.

Les modèles sont dits « mixtes » car ils incluent des effets fixes et des effets aléatoires. Les **effets fixes** sont les effets qui « ne bougent pas » et dont on considère qu'ils seraient les mêmes si l'expérience devait être répétée aux quatre coins de la planète (donc prédictibles). Quelques exemples courants d'effets fixes sont illustrés avec l'*effet du temps* (*e.g.*, mesure au jour 0, 10 et 20), l'*effet de la concentration d'un polluant* (*e.g.*, 0, 1, 10, 100) ou d'une autre *condition expérimentale* (*e.g.*, « groupe avec éclairage », « groupe sans éclairage »). Dans les cas cités (temps ou concentration), la variable peut être introduite dans un modèle comme une variable qualitative ou quantitative, suivant que sa relation avec la variable à expliquer peut être ou non considérée comme linéaire. Les **effets aléatoires** correspondent à des effets non maitrisés qui sont considérés comme fluctuants d'une expérience à l'autre, donc non prédictible pour une nouvelle expérience : effet aléatoire « limnée » (*i.e.*, effet

des caractéristiques aléatoires de chaque *individu* qui serait nécessairement différent si un nouveau échantillonnage d'une cohorte serait faite pour une nouvelle expérience) ou l'effet aléatoire des *réplicats* d'une même condition expérimentale (*e.g.*, effet « réplicat d'aquarium »).

2.3.2.2 Interprétations et seuils de significativités

Les analyses se sont faites avec le logiciel R [R, 2016] et la fonction *lmer* du package lme4 [Bates *et al.* , 2014]. Le choix de la construction des différents modèles est justifié dans chaque article de ce manuscrit dans la partie *Matériels et méthodes* correspondante.

Souvent dans les articles en biologie, un seuil de significativité statistique est fixé avec la valeur de $p < 0.05$ pour le test correspondant. Pour plusieurs raisons, de nombreux statisticiens suggèrent de ne pas se focaliser uniquement sur ce critère. Les conclusions ne doivent pas être dichotomiques. Par exemple, Wasserstein [2016] mentionne :

« Practices that reduces data analysis or scientific inference to mechanical « bright-line » rules (such as "$p \leq 0.05$") for justifying scientific claims or conclusions can lead to erroneous beliefs and poor decision making . A conclusion does not immediately become "true" on one side of the divide and "false" on the other."

De surcroît, la $p-value$ associée à un facteur fixe n'est pas facilement calculable dans un modèle mixte [Bates *et al.* , 2014].

Il est notamment encouragé de s'intéresser aux intervalles de confiance et de comprendre les tendances et les effets impliqués dans la description de la variable expliquée [Gardner & Altman, 1986; Wasserstein, 2016]. Dans les LMEMs présentés dans ce manuscrit, un effet fixe a été jugé statistiquement significatif lorsque l'**intervalle de confiance à 95% de son coefficient de régression ne contenait pas la valeur « 0 »**.

Il a été décidé de s'appuyer — en complément — sur des seuils de significativité statistiques. Dans la majorité des cas, si la valeur « 0 » n'est pas incluse dans l'intervalle de confiance à 95% du coefficient de régression d'un effet fixe, alors la valeur de t correspondante est $t \geq |2|$. Ainsi, ce critère était aussi jugé dans la décision et la description de la significativité statistique des effets fixes. En revanche, il n'est pas possible d'établir d'équivalence « générale » entre les valeurs de t et les valeurs de p car cela dépendra du degré de liberté associé à chaque analyse. Lorsque la valeur de t est de $|1.6—1.99|$, alors un effet peut être suspecté et cela est discuté lorsque de tels cas sont apparus dans les études de ce manuscrit.

Enfin, les LMEMs font l'hypothèse que les effets aléatoires de données groupées suivent

des distributions Gaussiennes de variance constante. Ainsi, chaque modèle a été validé après l'observation de la distribution normale des effets aléatoires et l'observation de leurs graphiques *quantile-quantile* et leurs graphiques des *résidus*. Ces graphiques sont présentés dans la partie *supplementary data* placée à la fin de chaque article correspondant.

Quelques développement méthodologiques viennent d'être présentés pour disposer d'une approche multibiomarqueurs pour l'évaluation de l'immunocompétence chez *L. stagnalis*. Avant de l'utiliser dans un contexte de contamination, il est nécessaire d'acquérir plus de connaissances sur la **variabilité** normale (sans toxiques) des paramètres évalués. Un point fort de ce modèle animal est la possibilité de collecter l'hémolymphe de manière peu invasive (et répétée) par stimulation mécanique du réflexe de rétraction des organismes. Les analyses peuvent se faire à l'échelle individuelle sur des adultes car ils expulsent suffisamment d'hémolymphe. Ainsi, l'immunocompétence peut être suivie dans le temps et pour chaque individu. Cependant, des **collectes répétées** peuvent générer un stress chez les organismes et avoir des conséquences sur leur **survie et paramètres hémocytaires**. Vraisemblablement, l'intervalle de temps entre plusieurs collectes est déterminant. Il y a peu de documentation à ce propos chez les mollusques aquatiques. Le chapitre suivant vise à évaluer l'effet de collectes répétées sur des paramètres hémocytaires non fonctionnels (densité et viabilité) et fonctionnels (activité oxydative immunocompétente stimulée aux particules de zymosane).
Par ailleurs, nous venons de voir dans le chapitre 2 que les marqueurs immunitaires qui seront étudiés dans les chapitres suivants se focalisent uniquement sur les hémocytes. Ainsi, bien que des études aient été menées en parasitologie, il me semble nécessaire de maitriser et pousser les connaissances que nous avons sur la **structure/ultrastructure des hémocytes chez *L. stagnalis***. Cela représente une finalité en soi. Par ailleurs, cela peut servir à proposer des analyses dans le cadre d'une étude histopathologique dans un contexte de contamination environnementale. Cela peut également ouvrir des pistes de recherches futures dans la connaissance de ces structures et/ou explorer la possibilité d'utilisation de nouveaux biomarqueurs hémocytaires. Il reste beaucoup à découvrir. C'est dans ce contexte que le chapitre suivant s'inscrit.

Chapitre 3

Les hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* : variabilités, effets de collectes répétées, effets de fréquences de collectes et connaissance structurales

Sommaire

3.1 Contexte et objectifs 149

3.2 Article 2 : Analyse des hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* : Caractérisation et effets de prélèvements répétés 152

3.3 Article 3 : Recommandations pour l'analyse de l'activité oxydative immunocompétente liée aux hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* 176

3.4 Résultats complémentaires sur les caractérisations hémocytaires 184

3.4.1 Distributions hémocytaires 184

3.4.2 Images complémentaires 185

3.1 Contexte et objectifs

L'ensemble des marqueurs d'immunocompétence qui seront évalués dans un contexte de contamination chimique concernent l'analyse des hémocytes. Au préalable, il est primordiale de s'assurer de la **bonne connaissance de ces cellules sans présence de contaminants**. Un avantage du modèle *L. stagnalis* pour son utilisation en immunotoxicologie environnementale est que l'hémolymphe peut être collectée de manière non-invasive par stimulus mécanique de son pied, déclenchant ainsi son réflexe de rétraction et l'expulsion concomitante d'hémolymphe par le pore hémal. Ainsi, des prélèvements répétés dans le temps peuvent être réalisés à l'échelle individuelle. Cependant, nous ne savons pas dans quelle mesure ces prélèvements répétés ne sont pas invasifs ou n'ont pas d'effet sur les paramètres immunitaires. La présence d'effet pourrait notamment dépendre de la **fréquence de collecte**, c'est-à-dire de l'intervalle de temps entre les prélèvements répétés. Les fréquences de collectes peuvent impacter la survie des organismes et les paramètres hémocytaires. Les hémocytes constituent la base des défenses immunitaires chez *L. stagnalis*. Ainsi, leur densité et viabilité vont constituer leur **immunocapacité**. Ces collectes peuvent affecter l'immunocapacité des organismes ou bien des paramètres fonctionnels hémocytaires qui vont déterminer l'**efficacité immunitaire**. Ce chapitre présente des études sur ces questionnements. Par ailleurs, une **caractérisation hémocytaire** est présentée. Une clarification concernant la possibilité de distinguer plusieurs types cellulaires (cellules rondes, hyalinocytes ou granulocytes) ou un seul type cellulaire avec des sous-populations était nécessaire. Les différences entre cellules sont-elles suffisantes pour les quantifier de manière robuste en cytométrie de flux ? en microscopie ? Existe-t-il des **structures/ultrastuctures** dont il serait pertinent d'envisager des développements de biomarqueurs ?

Pour résumer, ce chapitre fournit des éléments de réponse aux questions 3 (effets de prélèvements répétés), 4 (étude de la variabilité) et 5 (caractérisation hémocytaire), et donc les aspects suivants seront abordés :

- l'effet de fréquences de prélèvement de l'hémolymphe sur la densité et viabilité hémocytaire (article 2)
- l'effet de prélèvement répété à un intervalle de temps fixé par l'expérience précédente sur un paramètre fonctionnel des hémocytes (*i.e.*, l'activité oxydative immunocompétente, article 3)
- la variabilité hémocytaire : intra vs inter individuelle et la détermination de valeurs de référence
- la caractérisation hémocytaire en cytométrie de flux (cytogrammes) et l'observation des hémocytes en microscopie photonique
- la caractérisation des hémocytes en microscopie électronique à transmission et à balayage

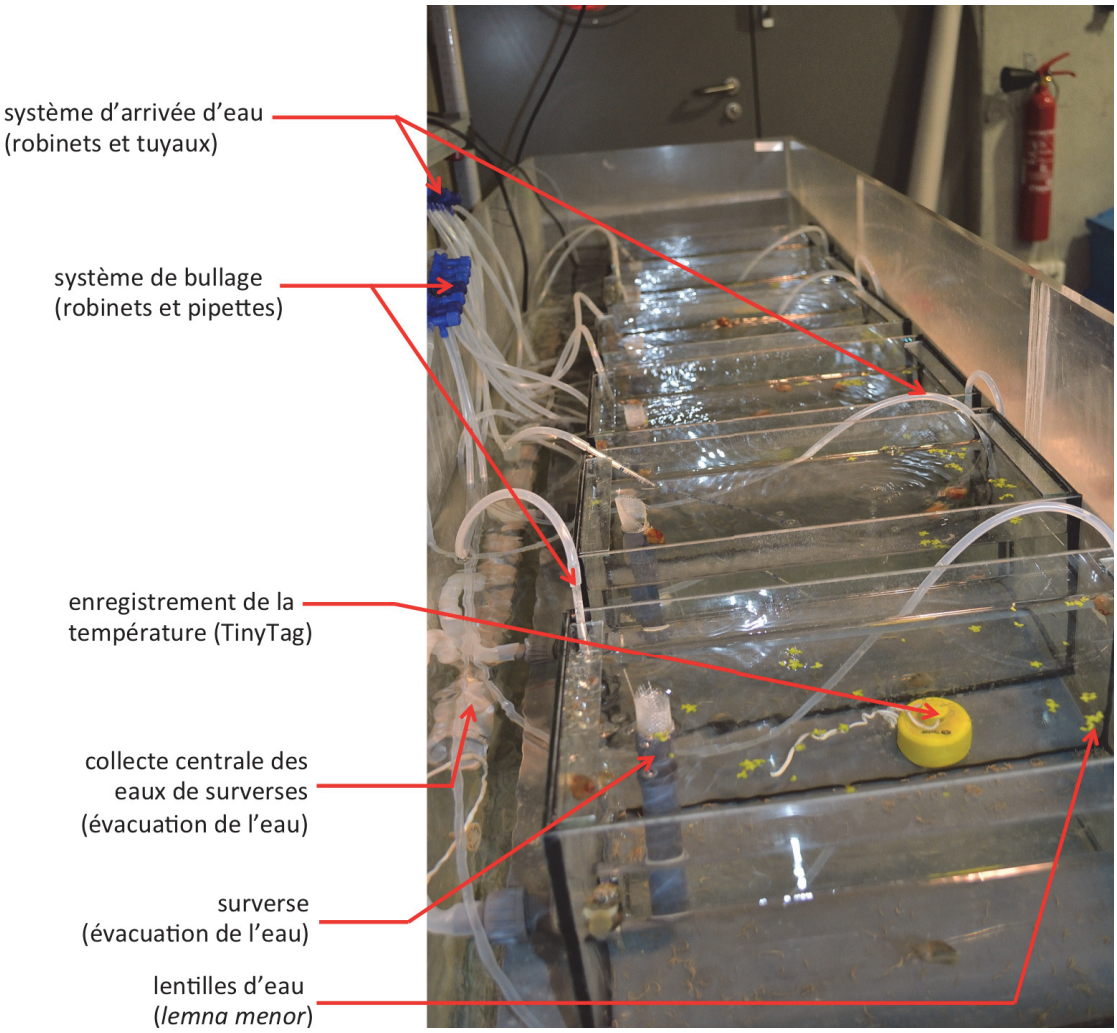


FIGURE 3.1 – Schéma du dispositif expérimental mis en place pour les expériences en renouvellement continu présentées dans ce chapitre n ° 3

3.2 Article 2 : Analyse des hémocytes chez *Lymnaea stagnalis* : Caractérisation et effets de prélèvements répétés

(publié dans *Fish and Shellfish Immunology*)

Type : *full-length article*

Résumé de l'article

Introduction et objectifs : La première partie de l'étude a pour but de tester l'hypothèse selon laquelle l'hémolymphe de *Lymnaea stagnalis* peut être collectée de manière répétée — indépendemment du temps d'intervalle — à une échelle individuelle sans impact sur la survie ou l'immunocapacité des organismes, qui est définie comme la densité et la viabilité hémocytaire. La deuxième partie de l'étude se focalise sur la caractérisation hémocytaire afin d'améliorer les connaissances structurelles et de mieux comprendre la possibilité de discrimination structurelle des hémocytes en vue d'une application dans un contexte écotoxicologique.

Matériel et méthodes : Les organismes ont été collectés dans les élevages du laboratoire (taille 32 mm±2) et mis en aquarium avec un système à renouvellement continu (voir fig. 3.1, p. 151). Quatre groupes ont été établis. Chaque groupe était soumis à un prélèvement répété de leur hémolymphe à une fréquence différente : 1/24h, 1/48h, 1/72h et 1/96h. À chaque collecte, la densité et la viabilité hémocytaire était mesurée en cytométrie de flux. Ainsi, un suivi individuel au cours du temps de ces paramètres hémocytaires a été réalisé. La survie des organismes était vérifiée chaque jour. Les jeux de données hémocytaires ont été analysés avec l'utilisation de modèles linéaires à effets mixtes.

Pour les caractérisations hémocytaires en microscopie photonique, des frottis hémolymphatiques ont été réalisés puis une double coloration de May Grünwald-Giemsa a été appliquée. Pour les caractérisations hémocytaires en microscopie électronique (à transmission et à balayage), l'analyse s'est faite à partir de *pools* d'hémolymphe avec une fixation et post-fixation au tétroxyde d'osmium et les échantillons ont été contrastés à l'acétate d'uranyle et à l'acétate de plomb.

Résultats : Aucun effet significatif n'a été détecté sur la survie des organismes lorsque des collectes répétées d'hémolymphe ont été réalisées à des fréquences allant de 1/96h jus-

qu'à 1/24h. La fréquence de collecte hémolymphatique n'a pas eu d'effets statistiquement significatifs sur la densité hémocytaire, mais la viabilité hémocytaire a été significativement augmentée à une fréquence de 1/24h. Par ailleurs, une augmentation légère mais significative de la densité hémocytaire a été observée mais celle-ci est indépendante des groupes de fréquences de collectes : il s'agit d'un effet « jour ». La variabilité intra et inter-individuelle peut être évaluée avec les modèles linéaires à effets mixtes et cette étude suggère qu'elles sont de même ordre de grandeur concernant leur immunocapacité.

Un seul type d'hémocyte a été observé. Dans leur *free-floating* statut, les hémocytes sont ovoïdes ou parfaitement sphériques. Ils peuvent présenter des filipodes et structures en forme de voile plus ou moins développées. Deux ultrastructures particulières ont été observées et décrites. La première correspond à une structure massive dans l'espace périnucléaire (ou parfois cytosolique) dont l'aspect est dense. La deuxième correspond à une structure avec un arrangement fibrillaire enchevêtré par blocs de centaines de filaments et de manière isotropique (non-unidirectionnelle).

Conclusion : Ces résultats supportent l'idée que *L. stagnalis* est un modèle de gastéropode d'eau douce qui est prometteur en immunotoxicologie environnementale. Une évaluation au cours du temps des paramètres hémocytaires peut être réalisée à l'échelle individuelle et cette méthode de collecte mécanique de l'hémolymphe est relativement peu invasive. Nous recommandons de laisser un intervalle de temps d'au moins 48h entre deux collectes successives pour l'évaluation de la densité et viabilité hémocytaire. Les modèles linéaires à effets mixtes permettent de prendre en compte l'effet « jour » et d'autres effets fixes, tels que la présence d'un contaminant à une concentration connue et des effets aléatoires liés aux animaux.

Les deux ultrastructures décrites méritent plus de recherches afin de connaitre leur nature et possible rôle dans l'immunocompétence des organismes.

Mots-clés : collectes répétées, fréquence de collecte, densité hémocytaire, viabilité hémocytaire, cytométrie en flux, survie, modèles linéaires mixtes, microscopie électronique

En physique la **fréquence** est l'inverse de la **période** : $f = 1/T$ où f signifie « fréquence » et T est la « période ». Dans l'article ci-après, la période pourrait correspondre à l'**intervalle de temps** considéré constant entre les prélèvements répétés d'hémolymphe. Ainsi, une fréquence élevée correspond à une période réduite c'est-à-dire un intervalle de temps répété et constant qui est faible (*e.g.*, une collecte par 24h) alors qu'une fréquence de collecte basse correspond à un intervalle de temps répété et constant qui est élevé. Le terme *fréquence* est justifié lorsque plus de deux (voire trois) collectes successives sont espacées par un même temps d'intervalle. Le terme *temps d'intervalle* est justifié lorsqu'on se focalise sur deux collectes successives.

Fish & Shellfish Immunology 57 (2016) 116–126

Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

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

Full length article

Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: Characterization and effects of repeated hemolymph collections

Paul Boisseaux [a], Marie-Laure Delignette-Muller [b, c], Khédidja Abbaci [a], Hélène Thomas [d], Jeanne Garric [a, *]

[a] Irstea, UR MALY, Centre de Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua, BP 32108, 69616 Villeurbanne Cedex, France
[b] Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France
[c] Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France
[d] LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Avenue Michel Crépeau, 17 042 La Rochelle, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 May 2016
Received in revised form
19 July 2016
Accepted 7 August 2016
Available online 10 August 2016

Keywords:
Repeated collections
Frequency of collection
Hemocyte density
Hemocyte viability
Flow cytometry
Snail survival
Linear mixed-effect models
Electron microscopy

ABSTRACT

The first part of the study was devoted to test the hypothesis according to which the hemolymph of *Lymnaea stagnalis* can be collected repeatedly – regardless the time-intervals – at an individual scale without impact on survival nor immunocapacity defined as the hemocyte density and viability. No significant effects on snail survival were observed when repeated hemolymph samplings were performed at frequencies ranging from 96 h up to 24 h. The frequency of hemolymph sampling had no significant effects on hemocyte density but the hemocyte viability was slightly increased for the 24 h frequency group. Hence, we recommend setting the frequency lower than 48 h after two consecutive samplings for further assessment of hemocyte density and viability. Furthermore, a slight "day" effect was observed on snail immunocapacity. These results support the idea that *L. stagnalis* is a promising gastropod model in environmental immunotoxicology. A time-course analysis of individual hemocytes parameters can be evaluated with a relative confidence in the non-detrimental effect of the sampling. Linear mixed-effect models allow taking the "day" effect into account and so the possible effect of an environmental factor (i.e. xenobiotic exposures) can be analyzed. Statistical inferences indicated that the inter-individual variability for these hemocyte endpoints were on the same order of magnitude than intra-individual variability. The second part of the study was devoted to provide greater insights into the structure/ultrastructure of hemocytes in *L. stagnalis*. Only one type of hemocyte has been observed. The hemocytes in their free-floating status showed ovoid or spherical shapes. Some hemocytes exerted filopodia and structures shaped like sailboats. Their ultrastructure showed signs of intense cellular activity. Two peculiar organelles were observed. One corresponds to a massive perinuclear structure of dense aspect. The other corresponds to a structure with fibrillary arrangements. These two structures deserve further investigation in order to understand their nature, function and importance in the snails' immunocompetence.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lymnaea stagnalis is a freshwater pulmonated snail species (Basommatophora, Gastropod). They live in lentic ecosystems (ponds, lakes and land shores) characterized by low water flow. In natural environments, they are under continuous multistress pressures (e.g., chemical and microbiological). The immune system plays a pivotal role in clearing pathogens and parasites. It is the primary barrier into the internal body. As such, the capacity to purge an intruder efficiently (i.e., immunocompetence) is considered as an important fitness determinant [33]. It will determine the vulnerability of the snail to contracting infectious diseases with possible consequences at the population level. The rise of chemical pollutants in surface waters that may directly or indirectly impact the immune system of *L. stagnalis* has often been reported and is a growing concern [6,15,16,29,30].

As an invertebrate, *L. stagnalis* possesses a quasi-specific innate-

* Corresponding author.
E-mail address: jeanne.garric@irstea.fr (J. Garric).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.007
1050-4648/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

like immune system [27] and it has an open circulatory system. The circulating immunocompetent cells (hemocytes) are adherent and mobile blood cells bearing self-deformation. Visually they resemble human macrophages [43]. These cells encompass many physiological functions such as transport of nutrients, shell/tissue repair, "clearance" of the lymph (apoptotic/necrotic cells, metabolites, debris, etc.) and destruction of pathogens. They are known to carry out phagocytosis, NADPH-oxidative activity [1], phenol-oxidase-like activity [35], encapsulation [9,39], pathogen recognition via specific receptors (e.g., TLR4) [15], and release of opsonins (e.g., lectins) [19] and cytokines [8,15].

In environmental immunotoxicology, *L. stagnalis* is a promising model to assess the effect of chemical pressure on the immune defences of gastropods. Two techniques to collect the hemolymph have been described: one invasive (bleeding from the vena pulmonis or directly from the heart) and one noninvasive (extrusion via the hemal pore after mechanical stimulus of the snail retraction reflex). Both methods have been validated in *L. stagnalis* given that they meet quality criteria of hemolymph samples (i.e., ionic composition and cell density) [38]. The hemolymph can be easily collected mechanically several times on one snail in a noninvasive manner. The volume of hemolymph collected on adults provides a sufficient quantity for an individual approach (i.e., samples not pooled) and several immune biomarkers can be measured at a time. Hence, individual snails' immunocompetence can be evaluated over time.

The hematopoiesis machinery in *L. stagnalis* remains poorly known, despite the conclusions that no hematopoietic organ has been identified and that hemocytes have an active division activity [37,43]. However, the effects of repeated hemolymph samplings and the variability of immune biomarkers has not been thoroughly studied. The hemocyte density and hemocyte viability of an animal will constitute the building blocks of its own immune capacity. Hence, the rationale of the first part of this study was to respond to the framing questions. (i) Does repeated hemolymph collection affect the snail's survival at frequencies ranging from 96 h to 24 h? (ii) Does it affect the hemocyte density and viability? (iii) How can these data sets be best described (e.g., intraindividual vs interindividual variability of hemocyte density/viability)?

Commonly, hemocytes from mollusks are divided into three types: round cells or blast-like cells, hyalinocytes (with a hyaline structure) and granulocytes (containing small cytoplasmic granules) [11,18]. Structural differences have been correlated with functional differences [7,42]. For instance, granulocytes can be more active (e.g., phagocytosis and enzymatic activities) than hyalinocytes [20,22]. To date, only one author has reported hemocyte ultrastructural observations in *L. stagnalis* [36] and a few have published on their cellular aspect [25,43,2,31,32]. How are hemocytes in *L. stagnalis* structured? How can they be classified? Hence, the second part of this study attempts to provide greater insight into the structure/ultrastructure of hemocytes from *L. stagnalis* observed in microscopy.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design and parameters

A total of 72 calibrated adult snails (32 ± 2 mm shell length) were taken from the breeding stock of our laboratory. They were certified to be free of parasites (i.e., assessment of sporocyst emission: *Xiphidiocercaria*, *Echinostoma*, *Diplostomum*). Snails were disposed randomly in their respective condition with six organisms per aquarium replicate (i.e., 18 snails per group). The term "group" utilized in the following sections is defined as the frequency with which the hemolymph was collected. Four groups were established with three replicates per group. The replicates were randomly assigned to the groups. The "24 h" group corresponded to hemolymph collected every 24 h. The hemolymph from the snails in this group was sampled ten consecutive times in total, whereas those from the "48 h", "72 h" and "96 h" groups were collected five times. Consequently, the experiments lasted 9 days, 8 days, 12 days and 16 days for the "24 h", "48 h", "72 h" and "96 h" conditions, respectively.

In total, twelve 15-L glass tanks were set up and filled with 13.7 L of clean groundwater using a continuous water inlet and a sewage outflow pipe disposal. Each water body was renewed four times per 24-h period and oxygenated with pump-connected glass tubes. Temperature (20 ± 1 °C) was controlled and monitored every hour using TinyTag recorders (Aquatic 2 model). Snail mortality was followed daily and dead snails were removed. Water quality parameters were measured daily from four random aquaria (temperature, conductivity, dissolved oxygen, NH_3, NO_2^-, pH). Neon tube lightings at 900 lux were set up with a 16 h/8 h (light/dark) photoperiod. Organisms were fed daily *ad libitum* with shredded Tetraphyll©, 30 $mg.\ day^{-1}.\ organism^{-1}$. Approximately ten floating leaves of the freshwater plant *lemna minor* were added to each tank as an *ad libitum* feeding indicator (at least one per aquarium had to be present every day). These experimental parameters were chosen because they were the closest to the conditions of the breeding stock from our laboratory thus minimizing experimental stress.

2.2. Flow cytometry: hemocyte density, distribution and viability

Flow cytometry measurements were performed on the Guava easyCyte™ 6-HT apparatus (™Millipore). Every acquisition was run with the Incyte module from the GuavaSoft 2.7 software at a flow rate of 0.59 $\mu l\ s^{-1}$. Note that the accuracy of the counts was regularly verified using the manufacturer's calibration protocol (Guava easyCheck Kit, Hayward, CA, USA).

The mechanical hemolymph collection was carried out as described by Sminia (1972) [36]. By tickling the foot sole of the snail with the tip of a micropipette, a reflex mechanism is triggered. The snail retracts into its shell and the hemolymph is extruded through the hemal pore. The hemolymph was then gently collected individually (i.e., samples were not pooled) with a micropipette. Samples were kept in 500 µl conical skirted polypropylene tubes (Dutscher, Dumath, France) and placed in ice until measurement to minimize cellular adhesion. No extra solution was added (i.e., no anti-agglutinating factor) in order to be the closest to their free-floating physiological status for cytogram visualizations.

First, cells were gated by size (forward scattering) (FSC) and complexity (side scattering) (SSC). Doublets were not excluded from overall hemocyte density measurements in order to limit underestimations. A total of 5000 events were acquired in this live-gate. After acquisition, three regions corresponding to the hemocyte subpopulations were established using the aforementioned software to determine their relative proportions (data not shown). For hemocyte viability measurements, cells were first adjusted to 50 000 $cells.\ well^{-1}$ with a final volume of 200 µl using SSB (Snail Saline Buffer) [5 mM HEPES, 3.7 mM NaOH, 36 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM $CaCl_2$; 145 mosm; pH = 7.9], prewarmed at room temperature, on a 96-well plate (Greiner, polystyrene, U-bottom, sterile, not treated for cell culture). Two microliters of propidium iodide (PI) 1 $mg\ ml^{-1}$ (Sigma) was added to each well. To (i) homogenize PI dispersion and (ii) prevent hemocyte sedimentation, samples were pipetted up and down after PI addition, the plate was shielded from light and placed on a shaker under slow agitation for 10 min and the flow cytometer was set to mix samples for 3 s before each acquisition. PI is a lipophobic fluorescent DNA-intercalating agent. It is impermeable to the plasma membrane

and stains only dead or damaged cells. Cells were visualized on FSC (log)/SSC (log) dot plots and were live-gated by size (FSC) and RED fluorescence. A total of 5000 events were acquired in this gate. Hemocyte viability was calculated as the percentage of PI-negative cells of this region.

2.3. Light microscopy

Ten microliters of hemolymph was deposited on silane-coated glass slides, gently and manually overlaid, left to dry at room temperature and post-fixed in methanol. Then, double coloration was performed by successively immerging the slides in May-Grünwald (RAL Diagnostics) solution and Giemsa solution (RAL Diagnostics). Buffer solution for hematology (pH 7) was used for intermediate washing steps. Next, glass slides were briefly placed in ethanol for 10 s and butanol for 5 min. All glass slides were then placed in HistoChoice solution for at least 10 min before mounting the glass slides with coverslips using mounting medium for slides (Richard-Allan Scientific). The prepared samples were then analyzed with a Leica microscope equipped with a Nikon eclipse 80i camera connected to the NIS-Elements D (version 4.12.00) software.

2.4. Transmission and scanning electron microscopy

For transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) only, hemolymphs from ten adult snails (32 ± 2 mm shell length) were pooled. First, the samples were filtered through a sterile 100-μm nylon mesh (BD Falcon cell strainer) to remove any tissue debris that may impede the resuspension of the cell pellet. They were fixed at room temperature in SSB-buffered glutaraldehyde (1%) first for 15 min and then for 45 min. Next, they were washed three times in SSB. Between each washing step, samples were centrifuged at 600*g* for 10 min in 50-mL conical falcon; supernatants were discarded and cells resuspended with new buffer. Samples were kept at 4 °C until post-fixation. TEM samples were post-fixed in osmium tetroxide (1%) for 1 h and followed successive ethylic (30–100%) and propylene oxide (100%) dehydrations. They were included in epoxy resin (Epon) and left to polymerize at 56 °C for 72 h. Ultrathin sections were made with an ultramicrotome (UC7 Leica), manually contrasted with uranyl acetate (7% in methanol) and lead citrate. Observations were made on a Philips CM120 transmission electron microscope operated at 80 kV. For SEM, samples were deposited on Thermanox® coverslips coated with poly-L-lysine and then post-fixed in osmium tetroxide (1%) for 1 h. The samples were critical point-dried (Balzers), metalized with copper (15 nm) on a BalTec MED020 sputtering and then observed with a Hitachi S800 scanning electron microscope operated at 15 kV.

2.5. Statistical analysis (graphs and inferences)

Cytogram dot plots and histograms as well as the hemocyte density and percentage of viable hemocytes were obtained from the GuavaSoft 2.7 software. The rest of the statistical analysis was performed with the R software [40]. The survival plot was obtained using the *survival* package [41] after pooling the replicates corresponding to the same group. Data were right-censored (because all the organisms did not die during the experiment), with a censoring time differing from one group to another (due to different durations of the experiments). The logrank test was run to enquire about statistically significant differences among the four survival curves. The graphs of hemocyte densities and hemocyte viabilities were obtained using the *ggplot2* package [45]. Regarding the data acquired on hemocyte density and viability, linear mixed-effect models were fitted using the *lmer* function from the *lme4* package [5]. Beforehand, we applied a logit transformation to the hemocyte viability expressed in proportion to normalize its distribution. To explain the hemocyte density and the logit transformed viability, linear mixed-effect models were first built with two fixed factors, the group and the cell waiting time, one covariate, the day, and two nested random factors, the snail and the replicate (aquarium). The impact of the group was only considered in an interaction term with the day, as there cannot be any impact of the group upon starting the experiment (i.e., day 0), but a group effect over time (i.e., interaction of respective effects). The "cell waiting time" factor corresponds to whether the hemolymph samples had waited more than 1 h before the measurement of respective endpoints by the flow cytometer (factor with two modalities: "yes" or "no"). All samples from the same group were analyzed within the same series (and so the modality was the same for all samples in each group on a specific day). This factor was taken into account because some hemolymph samples had waited in their tubes more than others, which may constitute experimental bias. Homoscedasticity of residuals and normality of residuals and of random effects distributions were visually verified using plots of residuals and quantile-quantile plots of residuals and random effects (supplementary materials). For each of the two variables hemocyte density and viability, the model was simplified by removing the effects that did not appear significant (supplementary materials).

3. Results

The survival rates of snails in the groups were plotted (Fig. 1). The logrank test showed a nonsignificant difference between the groups and observation of the survival curves did not show any obvious trend: the lower survival rates were observed for the two extreme frequencies of hemolymph collection (24 h and 96 h groups). Therefore, we assumed that the frequency of hemolymph collection up to 24 h for 10 consecutive days did not affect the snail survival compared to lower frequencies of collection down to 96 h for five consecutive times. The latter was initially considered as the control group in which the hypothetical invasiveness of repeated samplings was the lowest.

3.1. Hemocyte densities

Flow cytometry evidenced three clusters of hemocytes (Fig. 2). They differed in size and granulometry. The separation of intermediate and large cells on dot plots was close and sometimes they overlapped each other, whereas small cells were clearly separated. The cluster observations were confirmed by visualization on two other flow cytometers by two other operators (supplementary material). In all groups of hemolymph collection frequency, the proportion of hemocyte subpopulations was approximately 18%, 42% and 40% for small, intermediate and large cells, respectively. Since the clusters often overlapped each other, no quantitative comparisons were established.

Fig. 3 shows the hemocyte density from each snail at the successive measurement days in the respective groups of decreasing frequency sampling. Variability between snails (i.e., interindividual variability) and within snails (i.e., intraindividual variability over time) can be observed. Values observed for the 48 h group at day 0 and day 6, and for the 96 h group at day 0 are much lower than other values from other days and groups. However, an experimental artifact was highly suspected at these specific days. Indeed, they coincided exactly with the hemolymph samples having waited for more than 1 h in the polypropylene tubes before reading in the flow cytometer. This was not the case for other samples. For this reason, they were coded as "yes" in the binary variable "cell waiting

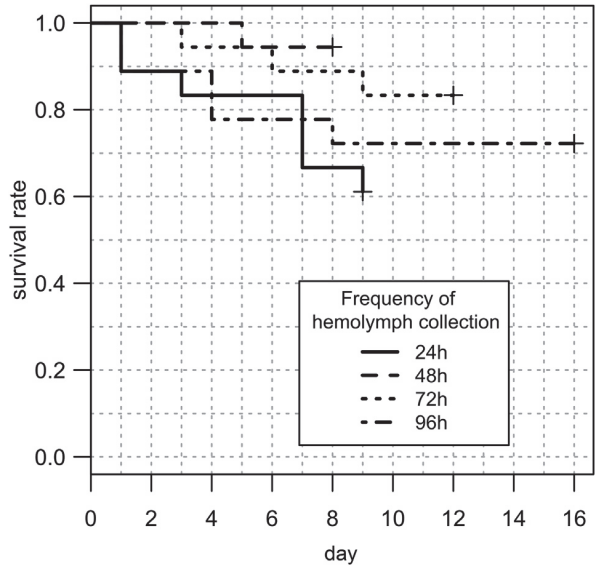


Fig. 1. Snail survival. This graph represents the survival curves of snails in the respective groups of hemolymph collection frequencies (i.e., 24 h, 48 h, 72 h and 96 h). Data are right-censored, with different censoring times for the four groups.

time" implemented in the model.

The model calculated a mean estimate of hemocyte density of 516.1 *cells*. μl^{-1} (with a 95% confidence interval (CI) of [482.1; 550.1]) (see Table 1 in supplementary materials). No significant interaction between the day and the group was observed and so this was removed from the model. Hence, no significant impact of the group (i.e., frequency of hemolymph collection) was observed on hemocyte density. Concerning the "day" covariate, a slight positive linear correlation with hemocyte density was detected with a regression coefficient of *4.4 cells*. μl^{-1} day^{-1} (95% CI of [1.1; 7.6]). The fixed "cell waiting time" effect had a significantly important impact on the hemocyte density, estimated at −192.7 *cells*. μl^{-1} (95% CI [−234.2; −151.2]. It can be concluded that it is important to take into account the laps of time between hemolymph sample collection and flow cytometer measurement. Hence, we suggest (i) limiting time between hemolymph collection and flow cytometry measurements and (ii) randomizing samples so not all from one treatment are analyzed at the same time. The hemocyte adhesion was likely involved in the observed phenomenon. Regarding the random effects, given that the inter-replicate standard deviation (SD) was estimated at 0, it was removed from the initial model. The inter-snail variability (SD, 106.6 *cells*. μl^{-1}) was on the same order of magnitude as intra-snail variability (SD, 113.8 *cells*. μl^{-1}).

3.2. Hemocyte viability

Fig. 4 displays the cytograms obtained with the flow cytometer for one sample of hemolymph after staining with propidium iodide (PI). It is worth noting that with this technique viable hemocytes could be quantified by their corresponding cluster visualized simultaneously in the cytogram. Although the PI-staining discrimination provides precise estimation of hemocyte viability, a rough idea of hemocyte viability could be given by direct analysis of cytograms.

Fig. 5 shows hemocyte viability from each snail at the successive measurement days in the respective groups of decreasing frequency samplings. Interindividual variability and intraindividual variability over time was observed.

The mean (i.e., intercept) of the logit-transformed viability model was estimated at 1.84 (95% CI, [1.59; 2.08] (see Table 2 in supplementary material). This mean estimate actually corresponds to 86% cell viability (95% CI, [83; 88]]. The "day" had a positive linear effect on cell viability. The model analysis suggested an interaction between the days and the groups and so it was retained in the model. Only the 24 h group had a significant positive effect on hemocyte viability along with the days (0.07 *logit(viability)*. day^{-1}). See Table 2 in supplementary materials for further detail. The fixed "cell waiting time" effect had an important negative effect. It can be concluded that the most important parameter

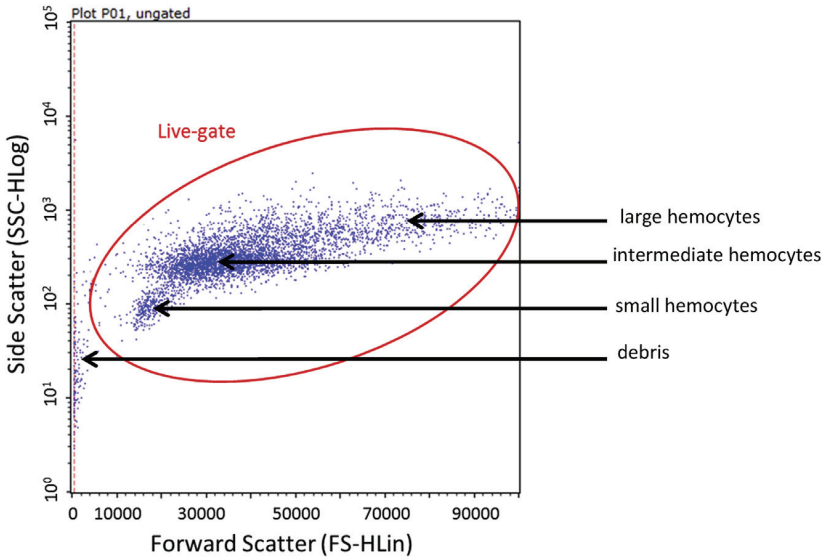


Fig. 2. Flow cytometric determination of hemocyte subpopulations in *Lymnaea stagnalis*. The dot plot represents the cytogram of hemocytes from one individual *L. stagnalis* snail observed by flow cytometry. The live-gate corresponds to the region of interest taken into account for hemocyte density measurements. Three clusters of hemocyte morphotypes are distinguished, which correspond to hemocyte subpopulations. They differ by internal complexity [i.e., SSC] and by size [i.e., FSC]. Hence, flow cytometry hemocyte density quantification can be simultaneously coupled by a qualitative approach of hemocyte subpopulation classification into small, intermediate and large cells.

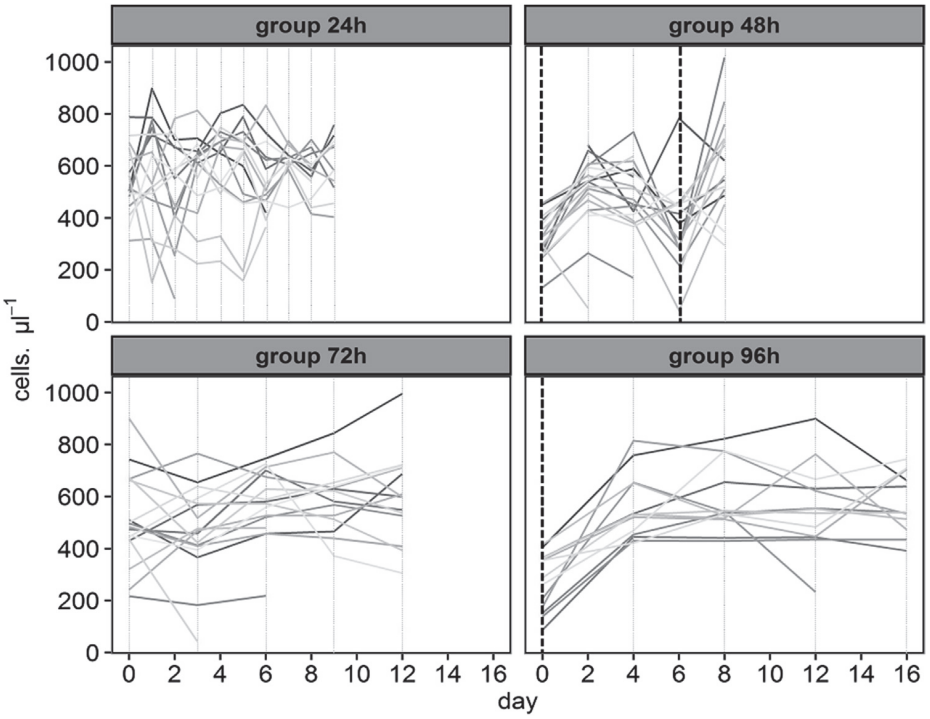


Fig. 3. Individual hemocyte density in the groups over time. Each solid line represents the individual snail's hemocyte density over time. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) uninterpretable flow cytometric data or (iii) the snail did not extrude hemolymph (i.e., no retraction reflex). The vertical grey dashed lines correspond to the days of hemocyte density quantification in the respective groups of hemolymph collection frequency (i.e., 24 h, 48 h, 72 h and 96 h). Ten consecutive samplings were done for the 24 h group and five samplings for the 48 h, 72 h and 96 h groups. The black and bold vertical dashed lines (48 h and 96 h groups) indicate samples having waited more than 1 h before quantification by the flow cytometer.

to take into account when describing the trend over time of hemocyte viability in these experiments, in the respective groups, was the laps of time between hemolymph collection and the flow cytometer measurement. Hemocyte adhesion was likely involved in the phenomenon observed. Indeed, only viable cells would adhere and consequently the nonviable cells remaining in the sample resuspended by the flow cytometer were overestimated. Regarding the random effects, the nested "replicate" effect (i.e., aquarium) in the "snail" effect had sufficient variability (SD, 0.24) to be computed by the model. Hence, it was retained in the model. Finally, the interindividual variability of hemocyte viability (SD, 0.62) was on the same order of magnitude as the intraindividual variability (SD, 0.66).

3.3. Light microscopy

Hemocytes had a fusiform or stellar shape, which exerted up to five pseudopods. They reached a maximum of 75 µm in length. Pseudopods are slender and tapering, typical of filopodia (Fig. 6A). Photonic images identified only one type of hemocyte population (Fig. 6B). Morphological differences consisted in cytoplasmic length and nucleus lobulations. In pooled samples, hemocyte subtypes were not distinguished. Photonic images taken after cell sorting (data not shown) did not show clear differences in the hemocyte populations in comparison with samples that were not cell-sorted. Hemocytes ranged from 8 to 12 µm. They were mono- or polylobulated (up to four nuclear lobulations). Contiguous lobules were connected by single and thin cannula. In the cytoplasm, no clear blue/purple/pink structures were observed. Hence, they cannot be classified as basophilic or acidophilic but are neutrophilic. Cytoplasms were transparent with tiny, barely perceptible, greyish granules. It was difficult to classify them as typical granulocytes. As hyalinocyte/granulocyte distinction lies in granulation continuum, they were closer to hyalinocytes than granulocytes but not totally exempt of granules. Comparison with human blood cells revealed resemblance with neutrophilic polynuclear cells and macrophages/monocytes. Complementary images are available in the supplementary materials.

3.4. Electron microscopy

The cell ultrastructure showed signs of intense cellular activity (Fig. 7B). Polylobulations of the nucleus were observed (Fig. 7 A). The nucleus contained most abundantly clear euchromatin, while heterochromatin is smaller and irregularly scattered (Fig. 7A, C, D). The Golgi apparatus was well developed (Fig. 7B). Granules and vesicles of different sizes were abundant in the cytoplasm; they indicate possible numerous cell trafficking pathways (i.e., intracellular biomolecule dynamics), cell reserves and/or cell secretions (Fig. 7B). These were clear and dense, structurally homogeneous or heterogeneous. Indeed, some granules exhibited central blackness with peripheral white circling belts. Many structures had a glossy white color, likely corresponding to glycogen reserves.

Two interesting organelles were depicted. First, a massive structure with a dense aspect was observed in the vast majority of hemocytes (Fig. 7A, D). Many times, they were observed in the perinuclear regions (i.e., between the double nuclear membranes) (Fig. 7D). Vesicles sprouting out from the internal nuclear membrane were observed. These structures filled intracellular compartments, occupying a vast cytosolic space. The nature of these structures (possibly proteic) is unknown and the apparent dynamic communication of this structure with the nucleus is intriguing. The

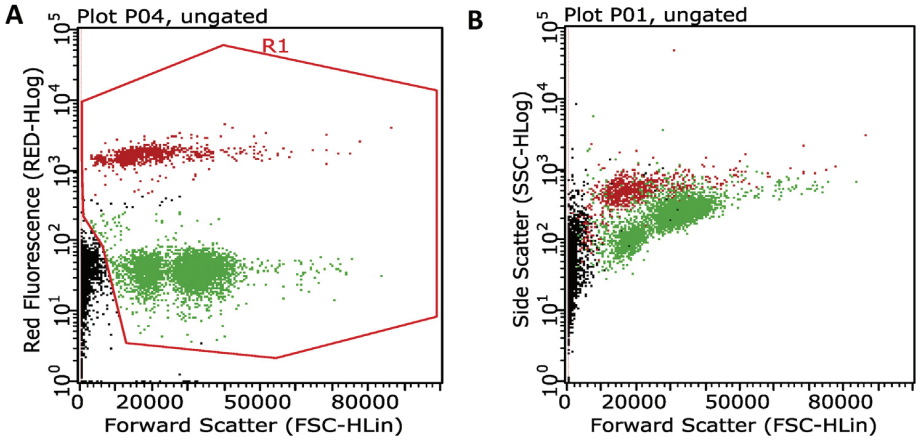


Fig. 4. Flow cytometry dot plots for hemocyte viability. These two graphs are an example of the output obtained from one hemolymph sample measurement observed simultaneously on different photomultiplicators from the flow cytometer. The red dots correspond to PI-positive cells and therefore to nonviable hemocytes; green dots are the PI-negative cells, i.e., viable hemocytes (graphs A and B). The percentage of viability is calculated from the PI-negative histogram (not shown) which is gated on R1 where the region of interest (hemocytes) is clearly discriminated. Graph B shows the simultaneous cytogram of hemocytes and the nonviable cells form a cluster somewhat overlapping the viable cell clusters. It would be possible to quantify hemocyte viability by looking directly at this cytogram (non-viable hemocytes adopt different size-structure), although accuracy would be lower than with PI. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

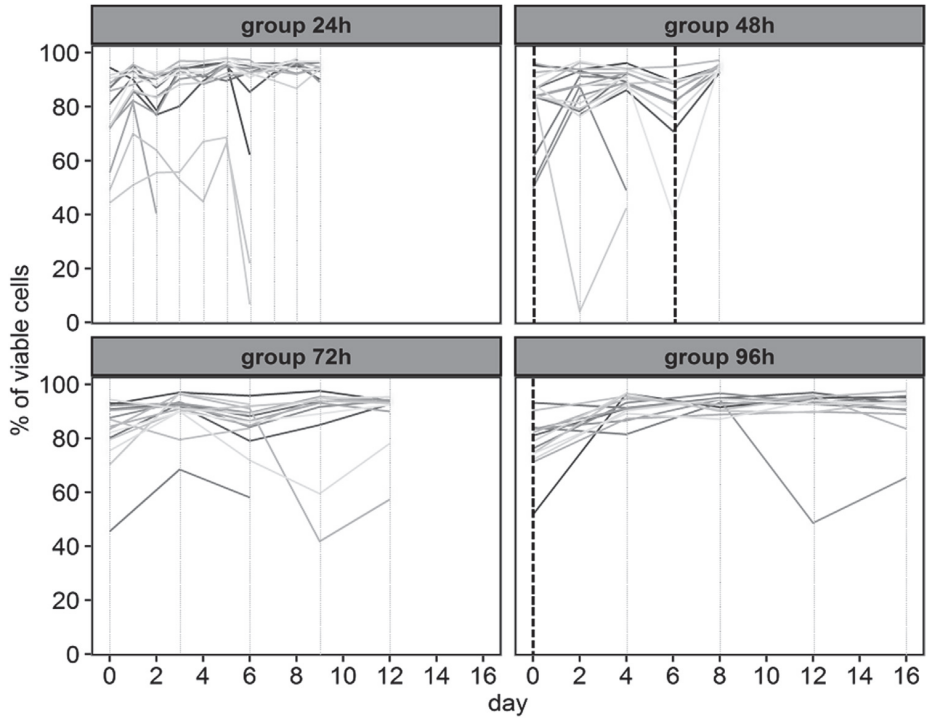


Fig. 5. Individual hemocyte viability in the groups over time. Each solid line represents the individual snail's hemocyte viability over time. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) uninterpretable flow cytometric data or (iii) the snail did not extrude hemolymph (i.e., no retraction reflex). The vertical dashed and grey lines correspond to the days of hemocyte viability quantification in the respective groups of hemolymph collection frequency (i.e., 24 h, 48 h, 72 h and 96 h). Ten consecutive samplings were done for the 24 h group and five samplings for the 48 h, 72 h and 96 h groups. The black and bold vertical dashed lines (48 h and 96 h groups) indicate samples having waited more than 1 h before quantification by the flow cytometer.

cellular function of this structure is unknown. To our knowledge, this structure has never been described in *L. stagnalis* or other molluscan species. The second interesting structure observed was a large organelle with a spectacular fibrillary arrangement (Fig. 7C), called lysosomal-like structures by Sminia (1972) [36]. Fibres are assembled in groups of hundreds and seem randomly arranged. To our knowledge, such a structure has not been described in the literature on molluscan hemocytes, other than [36] mention.

Hemocytes in their free-floating status were ovoid or spherically shaped (Fig. 8A). At high magnification, the hemocyte surface showed nonuniform and disorganized crumples from which filopodia protrusions emerged. The latter seemed to sense their surrounding microenvironment. All hemocytes had structures shaped like sailboats (Fig. 8 A, B). They were thin and seemed to adhere to

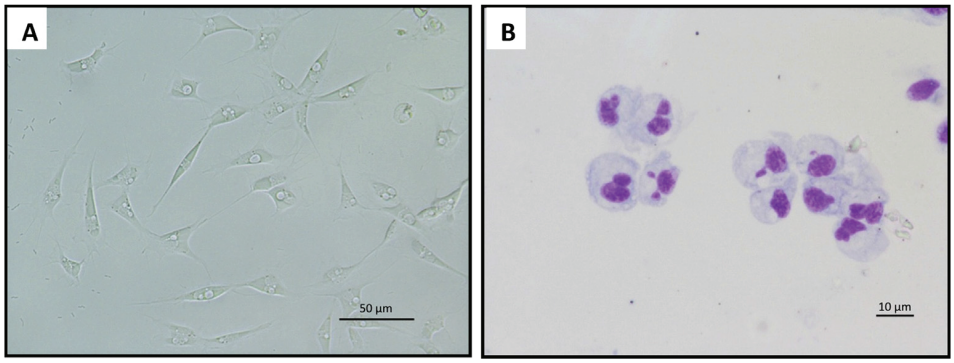


Fig. 6. Hemocytes from L. *stagnalis* observed in photonic microscopy. A: Hemocytes (without any coloration) observed 24 h after addition on a petri dish. The formation of pseudopods and intercellular connections occurred. B: Hemocytes observed after a double May Grünwald-Giemsa coloration performed straightforwardly after collection.

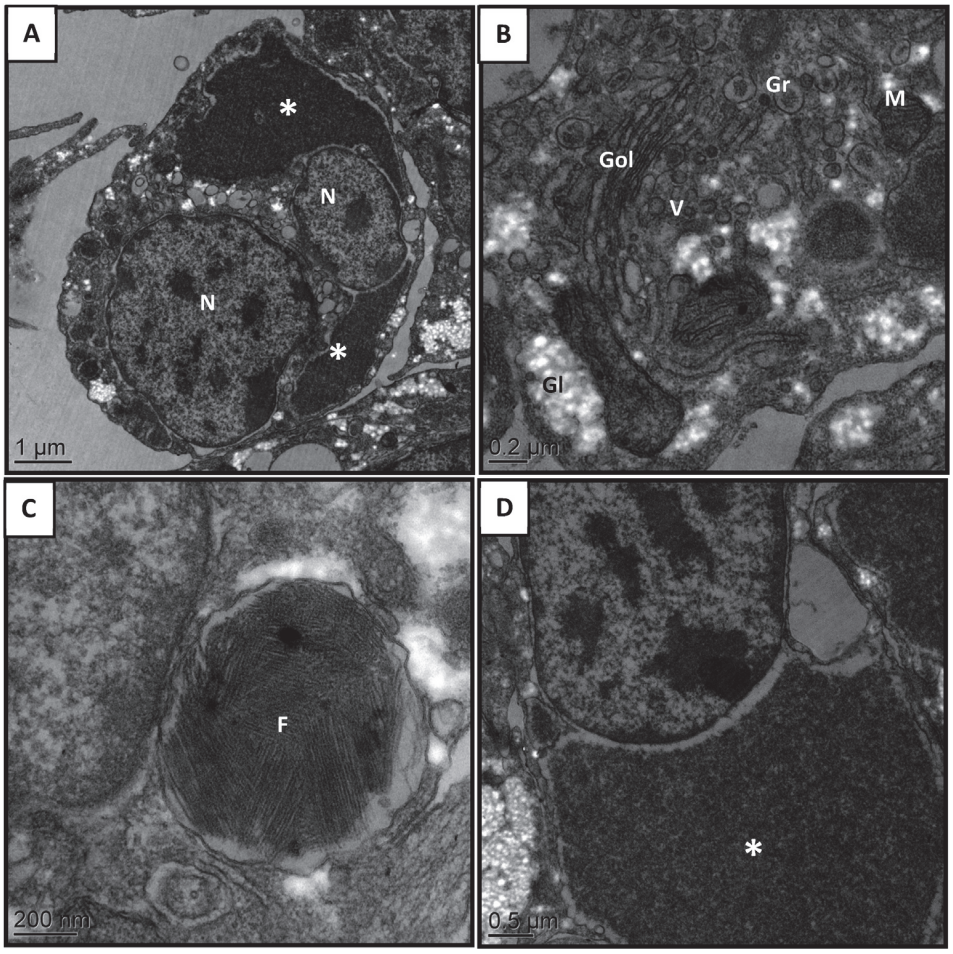


Fig. 7. Hemocytes from L. *stagnalis* observed in transmission electron microscopy. A: The nucleus (N) exerted polylobulations. Unknown structures (*) occupied great cytosolic space. B: Signs of intense cellular activity and cell trafficking were observed with the presence of mitochondria (M), Golgi apparatus (Gol), vesicles (V) and granules (G). The glossy white structures are likely glycogen (Gl). C: Several fibrillary structures (F) were present in all hemocytes. D: Massive unknown structures (*) were observed in the perinuclear region.

the surrounding substrates (e.g., hemocytes in the vicinity). In a few hemocytes, these structures were highly developed, crisscrossed and multilayered (Fig. 8B).

We invite the reader to examine Figs. 14 and 15 in the supplementary materials for further electron microscopy images.

4. Discussion

4.1. Cytograms

Flow cytometry made it possible to observe three clusters from

the hemocyte cytogram of *L. stagnalis*. Light microscopy reported tiny differences in cytoplasmic sizes. The nuclei were mono- or polylobulated and this must be involved in the side-scattered signal output analyzed by the flow cytometer. Hence, in the cytograms, the clusters between "intermediate" and "large" hemocytes may mainly correspond to nucleus lobulation instead of the cytoplasm granulation gradient. The hemocyte types and lineages from mollusks has been discussed for decades. It remains poorly understood in *L. stagnalis*. This type of cytogram with somewhat overlapping clusters with the conjunction of microscopy observations are consistent with the hemocyte "differentiation/maturation continuum" assumption [42]. All hemocytes could originate from a single cell lineage and then mature progressively, thereby constituting the clusters and small differences observed in microscopy. Further investigations are required to confirm this and finally unveil the cell machinery of hemocytes' lifespan in *L. stagnalis*. With the flow cytometry technique utilized herein, it is possible to distinguish the nonviable from the viable hemocytes only by their morphotype observation (differences in size structures). Thus, as a first approach, cytogram visualization will give insight into hemocyte status without need to use PI discrimination. However, the independent analysis of cell viability with the use of PI coloration gives more precise results.

4.2. Effect of repeated samplings

In the present study, no significant effects of the group of hemolymph sampling frequency from 96 h to 48 h was observed, on either snail survival or snail immune capacity (i.e., hemocyte density and viability). However, one can still hypothesize a different trend if the experiment had been continued for a longer period (e.g., 2 months). Hemocyte density was not affected by frequency up to 24-h intervals in hemolymph collection. Hence, the hemocyte renewal turnover is quicker than 24 h as long as we assume that the volume of hemolymph is not affected. However, since the total volume of hemolymph per snail at each sampling time was not determined, this cannot be affirmed. More investigation in this respect would be valuable since hematopoiesis in *L. stagnalis* remains insufficiently understood. Notably, the effect of sampling frequencies higher than 24 h would constitute a starting point for further investigation. In contrast, a slight increase of hemocyte viability was observed for a 24-h hemolymph collection frequency along with the ten consecutive samplings. This can be the result of an overstimulation of the hemocyte renewal machinery. If the hemocyte lifespan is reduced, then maturation until cell mortality may also be reduced, leading to an increase in hemocyte viability. This remains sheer speculation. Observing the normality assumption of the snail random effect within the viability model, few outliers were observed (Fig. 12C in supplementary materials), but they do not seem to correspond only to snails that died during the experiment (i.e., red dots on the graph). A complementary analysis was performed by plotting hemocyte viability from snails that died during the experiment. Some had low hemocyte viability – from day 0 or at a later day – but not all of them. Hence, if we remove snails from the data set for which hemocyte viability at day 0 is low (e.g., lower than an arbitrary threshold of 70%), then the snail calibration may be improved. By doing this and with the present data set, we removed snails that died but no snails that survived. Consequently, the batch of snails selected for the experiment would have better homogeneity in terms of their initial health condition. This method was tested and the conclusions on the effects observed using lmer modeling remained the same.

Nevertheless, the quality of hemocytes other than viability may still be affected (e.g., enzymatic activities, phagocytic activity, etc.). Moreover, the hemocyte trends toward repeated samplings may differ with the presence of xenobiotics (e.g., antagonistic/synergistic effects). The total harmlessness of repeated hemolymph samplings when the frequency is considered low enough for long periods with the presence of xenobiotics is not ascertained. It may be considered as a negligible effect as long as the frequency is set below a 24-h frequency for a reasonable period. In this respect, it would still be very useful to enquire about the trends under chronic

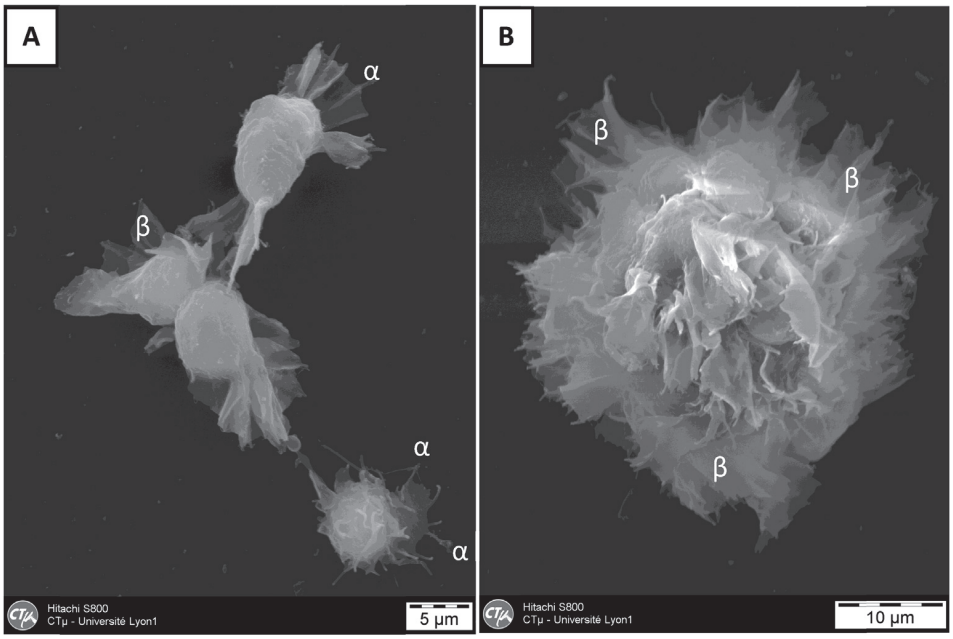


Fig. 8. Hemocytes from L. *stagnalis* observed in scanning electron microscopy. A: Hemocytes in their free-floating status were ovoid or spherically shaped. They developed filopodia (α) and β-structures, likely involved in the exploration of their microenvironment. B: Some hemocytes developed several β structures crisscrossed (i.e., sailboat-like structures).

samplings. In the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, repeated hemolymph samplings had no significant effect on hemocyte density for organisms collected in the field with intervals of 1–3 months. However, in the laboratory, hemolymph collection once a month resulted in significant hemocyte density reduction. Hence, some authors suggest minimizing the frequency of blood sampling. The method employed may be the cause of the results observed (via the posterior adductor muscle using a 25-gauge needle) [14]. In the present study, the hemolymph was withdrawn from *L. stagnalis* by a mechanical stimulation of the snail retraction reflex. It is the least harmful technique to collect hemolymph in this species. The hemolymph extraction via the vena pulmonalis or from the heart would likely lead to dissimilar results. Malham et al. (1998) [23] investigated the effect of repeated blood extraction in the octopus *Eledone cirrhosa* (bleeding with 21-gauge, 1.5-in. needle). Considering the frequency of hemolymph collection set at 24 h over a period of 10 days, two phases were observed. First, hemocyte density increased within 24 h. Second, hemocyte density decreased gradually from the 3rd day to the 10th. Plus, hemocytes exerting cytoplasmic granules accounted most of the variation. Copper –an essential hemocyanin cofactor in the hemolymph – was significantly reduced throughout the sampling period. Similarly Gustafson et al. (2005) [17], evaluated the invasiveness of a specific blood sampling technique by the adductor sinus in the bivalve *Elliptio complanata* and the possible cumulative effect of the number of samplings (with 3-month recovery) on growth and survival. No significant effects were observed.

4.3. Variability of hemocyte density and hemocyte viability

On the whole, the hemocyte density/viability variability was considerable. This may be attributed to snail calibration criteria. In this experiment, snails were calibrated by size. The homogeneity of dry weights was verified at the end of the experiment, and the batch of snails selected for the experimentation was quite homogeneously distributed (Fig. 16 in supplementary data). However, they were not calibrated by age. This was done on purpose in order to capture the variability of the biomarkers, even though information is unknown when snails are sampled from the field. However, one can assume age is a source of considerable interindividual variability. Dikkeboom et al. (1984) [10] observed a lower hemocyte density in juveniles *L. stagnalis* (around 300 *cells*. μl^{-1}) than in young adults (1000 *cells*. μl^{-1}) and older adults (3000 *cells*. μl^{-1}). Furthermore, genetic polymorphism resulting from different populations of *L. stagnalis* collected in the field have revealed great differences in hemocyte parameters (e.g., hemocyte density and phenol-oxidase activity) that were also highly affected depending on food presence or absence [47]. This study suggested that snail populations had an effect on overall hemocyte parameter variability in *L. stagnalis*. In our opinion, there are not sufficient studies available at the present time to understand the effects – and their relative importance – of the population and the snail calibration biometrics (i.e., age, weight, shell length) in a perspective of environmental immunotoxicological use of this species for biomonitoring purposes. Furthermore, the reliable use of immune markers in ecotoxicology lies in the understanding of confounding factors that can impact the biomarker mean/variability, which is not accountable for chemical contamination. For example, seasonal changes and reproduction periods are believed to be important sources of hemocyte variation in bivalves [12]. A field investigation conducted on *Ruditapes philippinarum* revealed a positive correlation of hemocyte density with the change in temperature [13]. In contrast, no differences were found regarding the effect of food and temperature on hemocyte density and viability in oysters, *Crassostrea virginica* [4]. The individual metabolic condition was likely to be a major source of variability compared to ambient conditions such as temperature and food (quality vs quantity). In *L. stagnalis* Seppälä and Jokela (2011) [34], and Leicht et al. (2013) [21] evaluated the effects of temperature on immune parameters under different scenarios. Temperature seemed to be an important abiotic factor impacting hemocyte density over the long term. Functional activities of hemocytes were affected when the temperature varied, even for short-term temperature shifts. Among biotic factors, parasites are believed to have a substantial effect on the immune traits of animals [24], particularly in *L. stagnalis*, which is known to host a myriad of parasites [44]. For instance, the parasite *Trichobilharzia ocellata* has been reported to induce an important increase in hemocyte density over a period of 8 weeks in *L. stagnalis* [3]. Similarly [28], found an increase of the total hemocyte counts from *Lymnaea palustris* upon infection with the trematode parasite *Metaleptocephalis* sp. H.

4.4. Microscopy images

Regarding the image obtained by light microscopy, the double May Grünwald-Giemsa colorations did not allow us to visualize proper granulations in the hemocytes. Only one type of hemocyte (i.e., one hemocyte population) is present with possibly a slight gradient in size structure, barely perceptible in the present study. Since the pseudopods of *L. stagnalis* hemocytes are well developed, they are good candidates for primary and plausibly for secondary cell culture [46]. Immunocompetent assays - for possible use in environmental immunotoxicology - such as cell motility video-tracking could be developed as it has been done on *Mytilus edulis* [26].

The electron micrographs unveiled the presence of dense and small granules (200–300 nm). Their relatively small size could explain why no granules are observed in light microscopy with May Grünwald-Giemsa colorations. The first abundant organelle depicted needs investigations to gain insight into their nature and cellular function. Their perinuclear formation is surprising. To the best of our knowledge, this type of structure has not been reported in any other mollusk hemocytes. On the other hand, the lysosomal-like structures were already observed by Sminia (1972) [36]. As far as we know, lysosomes with such fibres are unique of *L. stagnalis*. They have not been reported in any other molluscan species. Their fibrillary organization may confer a special role such as in motility, but this remains speculative. More studies are required to confirm their appellation of "lysosome-like structures" and to enquire about their cellular function. Since both of these structures are very abundant, they open doors for further investigations to help understand their cellular function and by extension their possible role in immunocompetence. All hemocytes were not strictly spherical but adopted an ovoid shape. They are spreading cells that exert high plasticity and so their shape description is accountable only as free-floating cells (circulating cells). They differentially developed pseudopods being rather filopodia. The differences between hemocytes may be due to cell maturation, physiological status and/or their *ex vivo* environment before fixation. Structures that look like sailboats may attach to substrates, explore the cellular microenvironment and play a role in wound healing, for example. Together with the pseudodpods, they are likely involved in microbe trapping. Sminia (1974) [37] studied hematopoiesis in *L. stagnalis*. No hematopoietic organ was found and it was suggested that hemocytes originated from the connective tissue and then could divide throughout their physiological lifespan. In fact, hematopoiesis in *L. stagnalis* remains poorly understood. More studies in this direction would be very beneficial in the future, not only for general comprehension of the *L. stagnalis* immune system, but also to provide biological tools to evaluate the possible impact of

xenobiotics at the root of the hemocyte synthesis.

5. Conclusion

The present study strengthens the possibility of using *L. stagnalis* in long-term immunotoxicology studies. Repeated hemolymph collections, among varying frequency of collection, had no significant effect on snail survival. A slight positive effect of repeated hemolymph collections on hemocyte density and viability was observed. However, it was independent of the sampling frequency group tested from 48 h to 96 h. Linear mixed-effect modeling appears useful in this context so that the "day" and "snail" effects on hemocyte endpoints over time can be taken into account and the possible effect of a particular condition (i.e., xenobiotic exposure) can be analyzed for further ecotoxicological studies. Over two consecutive samplings, we recommend reducing the frequency to lower than 48 h for further assessment of hemocyte density and viability. However, at such frequencies, the hemolymph collection may still affect functional aspects of hemocytes (i.e. enzymes). The method employed herein requires a straightforward measurement of biomarkers by the flow cytometer after hemolymph collection because rapid and considerable cellular adhesion likely occurs. Nevertheless, the advantage of this method is that it provides a relatively time-efficient quantitative assessment of hemocyte parameters coupled simultaneously with preliminary qualitative (i.e., cytograms) information. In the present study, the mean estimate of hemocyte density was 516 *cells.* μl^{-1} (95% CI, 482; 550) and for hemocyte viability 86% (95% CI, 83; 89). The comparison of values obtained on other populations of *L. stagnalis* and with different calibration criteria will upgrade the knowledge of these hemocyte endpoint variabilities in order to define reference values. Regarding the structure of hemocytes, only one hemocyte population was found. The ultrastructure explorations depicted two organelles that deserve further investigation in order to understand their nature and most importantly their possible function in immunocompetence.

Acknowledgments

Electron micrographs were done at the "Centre des microstructures – Lyon 1". The Rhône-Alpes region provided financial support to Paul Boisseaux in a PhD fellowship program (ARC 3 Environnement). We also extend our thanks to the helpful comments of the anonymous reviewers.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.007.

References

[1] C. Adema, E. van Deutekom-Mulder, W. van der Knaap, T. Sminia, NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod Lymnaea stagnalis, J. Leukoc. Biol. 54 (1993) 379–383.
[2] C.M. Adema, A. Mohandas, W.P. Van der Knaap, T. Sminia, Separation of Lymnaea stagnalis hemocytes by density gradient centrifugation, Dev. Comp. Immunol. 18 (1994) 25–31.
[3] R.I. Amen, J.M. Tijnagel, W.P. van der Knaap, E.A. Meuleman, E.S. de Lange-de Klerk, T. Sminia, Effects of Trichobilharzia ocellata on hemocytes of Lymnaea stagnalis, Dev. Comp. Immunol. 15 (1991) 105–115.
[4] K.A. Ashton-Alcox, S.E. Ford, Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study, Tissue Cell 30 (1998) 195–204.
[5] D. Bates, M. Maechler, B. Bolker, S. Walker, Fitting Linear Mixed-effects Models Using {lme4}, vol. 67, 2015, pp. 1–48.
[6] P. Boisseaux, M. Gust, S. Betoulle, J. Garric, Short-term immunotoxic effects of an anti-cancer drug (Etoposide) on the freshwater pondsnail Lymnaea stagnalis, J. Xenobiotics 4 (2014).
[7] T.C. Cheng, A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences, Invertebr. blood (1984) 111–146.
[8] M. De Jong-Brink, How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts, Adv. Parasitol. 35 (1994) 177–256.
[9] R. Dikkeboom, C. Bayne, W.W. van der Knaap, J.G.H. Tijnagel, Possible role of reactive forms of oxygen in *in vitro* killing of Schistosoma mansoni sporocysts by hemocytes of Lymnaea stagnalis, Parasitol. Res. 75 (1988) 148–154.
[10] R. Dikkeboom, W.P. van der Knaap, E.A. Meuleman, T. Sminia, Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail Lymnaea stagnalis, Cell Tissue Res. 238 (1984) 43–47.
[11] L. Donaghy, B.-K. Kim, H.-K. Hong, H.-S. Park, K.-S. Choi, Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, Crassostrea ariakensis, Fish Shellfish Immunol. 27 (2009) 296–301.
[12] M.B. Duchemin, M. Fournier, M. Auffret, Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg), Aquaculture 264 (2007) 73–81.
[13] J. Flye-Sainte-Marie, P. Soudant, C. Lambert, N. Le Goïc, M. Goncalvez, M.-A. Travers, C. Paillard, F. Jean, Variability of the hemocyte parameters of Ruditapes philippinarum in the field during an annual cycle, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 377 (2009) 1–11.
[14] S.E. Ford, C. Paillard, Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, Ruditapes philippinarum, Fish shellfish Immunol. 23 (2007) 280–291.
[15] M. Gust, M. Fortier, J. Garric, M. Fournier, F. Gagne, Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail Lymnaea stagnalis, Sci. Total Environ. 445–446 (2013a) 210–218.
[16] M. Gust, M. Fortier, J. Garric, M. Fournier, F. Gagne, Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail Lymnaea stagnalis, Aquat. Toxicol. 126 (2013b) 393–403.
[17] L.L. Gustafson, M.K. Stoskopf, A.E. Bogan, W. Showers, T.J. Kwak, S. Hanlon, J.F. Levine, Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in Elliptio complanata, a freshwater bivalve (Mollusca: Unionidae), Dis. aquatic Org. 65 (2005) 159.
[18] P.M. Hine, The inter-relationships of bivalve haemocytes, Fish Shellfish Immunol. 9 (1999) 367–385.
[19] P. Horak, R. Deme, Lectins and saccharides in Lymnaea stagnalis haemocyte recognition, Comp. Haematol. Int. 8 (1998) 210–218.
[20] R.P. Kuchel, D.A. Raftos, D. Birch, N. Vella, Haemocyte morphology and function in the akoya pearl oyster, pinctada imbricata, J. Invertebr. Pathol. 105 (2010) 36–48.
[21] K. Leicht, J. Jokela, O. Seppälä, An experimental heat wave changes immune defense and life history traits in a freshwater snail, Ecol. Evol. 3 (2013) 4861–4871.
[22] H. Mahilini, A. Rajendran, Categorization of hemocytes of three gastropod species< i> Trachea vittata</i>(Muller),< i> Pila globosa</i>(Swainson) and< i> Indoplanorbis exustus</i>(Dehays), J. Invertebr. Pathol. 97 (2008) 20–26.
[23] S. Malham, C. Coulson, N. Runham, Effects of repeated sampling on the haemocytes and haemolymph of Eledone cirrhosa (Lam.), Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 121 (1998) 431–440.
[24] L. Minguez, T. Buronfosse, J.N. Beisel, L. Giamberini, Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination, Environ. Pollut. 162 (2012) 234–240.
[25] A. Mohandas, C. Adema, W. Van der Knaap, T. Sminia, The effect of haemolymph extraction on distribution of lysosomal enzymes in Lymnaea stagnalis haemocytes: a cytochemical study, Comp. Haematol. Int. 2 (1992) 61–67.
[26] D. Rioult, J.M. Lebel, F. Le Foll, Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (Mytilus edulis) hemocytes *in vitro*, Cytotechnology 65 (2013) 749–758.
[27] A.F. Rowley, A. Powell, Invertebrate immune systems–specific, quasi-specific, or nonspecific? J. Immunol. 179 (2007) 7209–7214.
[28] J. Russo, L. Lagadic, Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail Lymnaea palustris (Gastropoda, Pulmonata), Cell Biol. Toxicol. 16 (2000) 15–30.
[29] J. Russo, L. Lagadic, Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail Lymnaea stagnalis (Gastropoda, Pulmonata), Environ. Pollut. 127 (2004) 303–311.
[30] J. Russo, L. Madec, Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, Lymnaea stagnalis, to a toxicant, Cell Tissue Res. 328 (2007) 431–441.
[31] J. Russo, L. Madec, M. Brehélin, Effect of a toxicant on phagocytosis pathways in the freshwater snail Lymnaea stagnalis, Cell Tissue Res. 333 (2008) 147–158.
[32] J. Russo, L. Madec, M. Brehélin, Haemocyte lysosomal fragility facing an environmental reality: a toxicological perspective with atrazine and Lymnaea stagnalis (Gastropoda, Pulmonata) as a test case, Ecotoxicol. Environ. Saf. 72 (2009) 1719–1726.
[33] H. Segner, A.M. MöLLER, M. Wenger, A. Casanova-Nakayama, Fish immunotoxicology: research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology, Interdiscip. Stud. Environ. Chem. 6 (2012) 1–5.
[34] O. Seppälä, J. Jokela, Immune defence under extreme ambient temperature, Biol. Lett. 7 (2011) 119–122.

[35] O. Seppälä, K. Leicht, Activation of the immune defence of the freshwater snail Lymnaea stagnalis by different immune elicitors, J. Exp. Biol. 216 (2013) 2902–2907.
[36] T. Sminia, Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate Lymnaea stagnalis studied by electron microscopy and enzyme histochemistry, Z. für Zellforsch. Mikrosk. Anat. 130 (1972) 497–526.
[37] T. Sminia, Haematopoiesis in the freshwater snail Lymnaea stagnalis studied by electron microscopy and autoradiography, Cell Tissue Res. 150 (1974) 443–454.
[38] T. Sminia, Gastropods, in: N.A. Ratcliffe, A.F. Rowley (Eds.), Invertebrate Blood Cells, 1, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1981, pp. 191–232.
[39] T. Sminia, E. Borghart-Reinders, A. Van de Linde, Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail Lymnaea stagnalis, Cell tissue Res. 153 (1974) 307–326.
[40] R.C. Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. http://www.R-project.org/.
[41] T.M. Therneau, A Package for Survival Analysis in S, 2015.
[42] M.A. Travers, P. Mirella da Silva, N. Le Goic, D. Marie, A. Donval, S. Huchette, M. Koken, C. Paillard, Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (Haliotis tuberculata) haemocytes, Fish. Shellfish Immunol. 24 (2008) 400–411.
[43] W. Van der Knaap, C. Adema, T. Sminia, Invertebrate blood cells: morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail Lymnaea stagnalis, Comp. Haematol. Int. 3 (1993) 20–26.
[44] W.P.W. van der Knaap, E.S. Loker, Immune mechanisms in trematode-snail interactions, Parasitol. Today 6 (1990) 175–182.
[45] H. Wickham, ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, 2009.
[46] T. Yoshino, U. Bickham, C. Bayne, Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines, Can. J. zool. 91 (2013) 391–404.
[47] O. Seppälä, J. Jokela, Maintenance of genetic variation in immune defense of a freshwater snail: role of environmental heterogeneity, Evolution 64 (8) (2010) 2397–2407.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1 : Details of the model retained* to describe the hemocyte density datasets

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	108.2	85.1	131.3	-
	Residuals [intra-individual effect]	114.0	104.9	123.1	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	516.1	482.1	550.1	29.8
	day	4.4	1.1	7.6	2.6
	cell.waiting.time: "yes"	-192.7	-234.2	-151.2	-9.1

***R Formula: lmer(density ~ day + cell.waiting.time + (1 | snail))**

Table 2: Details of the model retained* to describe the hemocyte viability datasets

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	0.63	0.49	0.78	-
	Replicate [inter aquarium effect]	0.24	0.00	0.49	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.66	0.61	0.72	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	1.84	1.59	2.08	14.63
	day	0.04	0.01	0.07	2.78
	Interaction Day : group 24h	0.07	0.02	0.12	3.02
	Interaction Day : group 48h	0.03	-0.02	0.09	1.22
	Interaction Day : group 72h	-0.01	-0,05	0.03	-0.50
	cell.waiting.time: “yes”	-0.55	-0.81	-0.27	-4.09

***R Formula: lmer(viability.logit ~ day + group:day + cell.waiting.time + (1 | replicate/snail))**

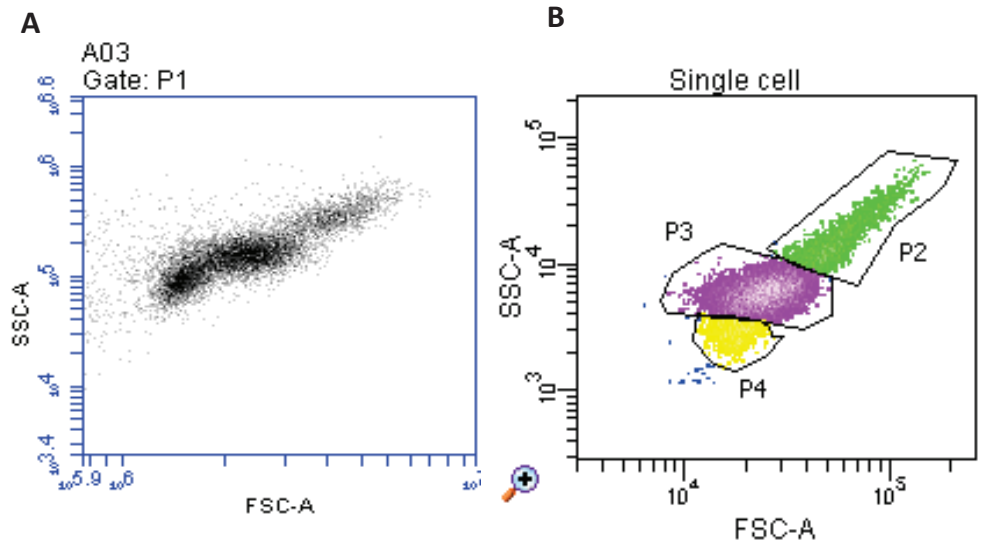


Fig. 9: Cytograms of hemocytes from *L. stagnalis* obtained with different flow cytometers

A: Cytogram obtained using an Accury flow cytometer

B: Cytogram obtained using a FACSDiva Version 6.2 flow cytometer.

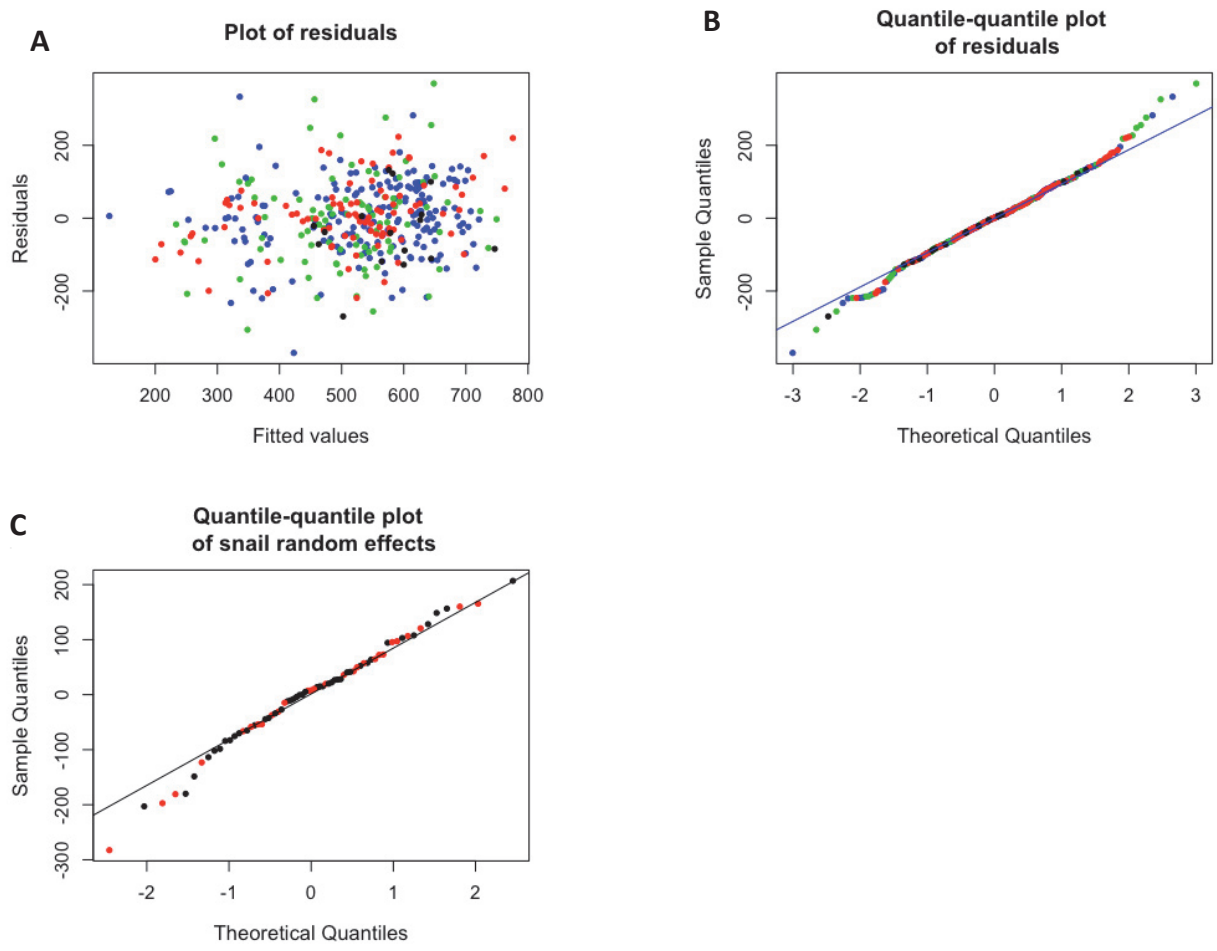


Figure 10 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte density model

A: Colors correspond to groups. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colours correspond to groups. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: Red dots correspond to snails that died at some point during the experiment. The normal distribution assumption of snail random effects is reasonable. The scarce outlayer dots are not all red and so the snail vital prognostic is unlikely the reason of their deviation from normality.

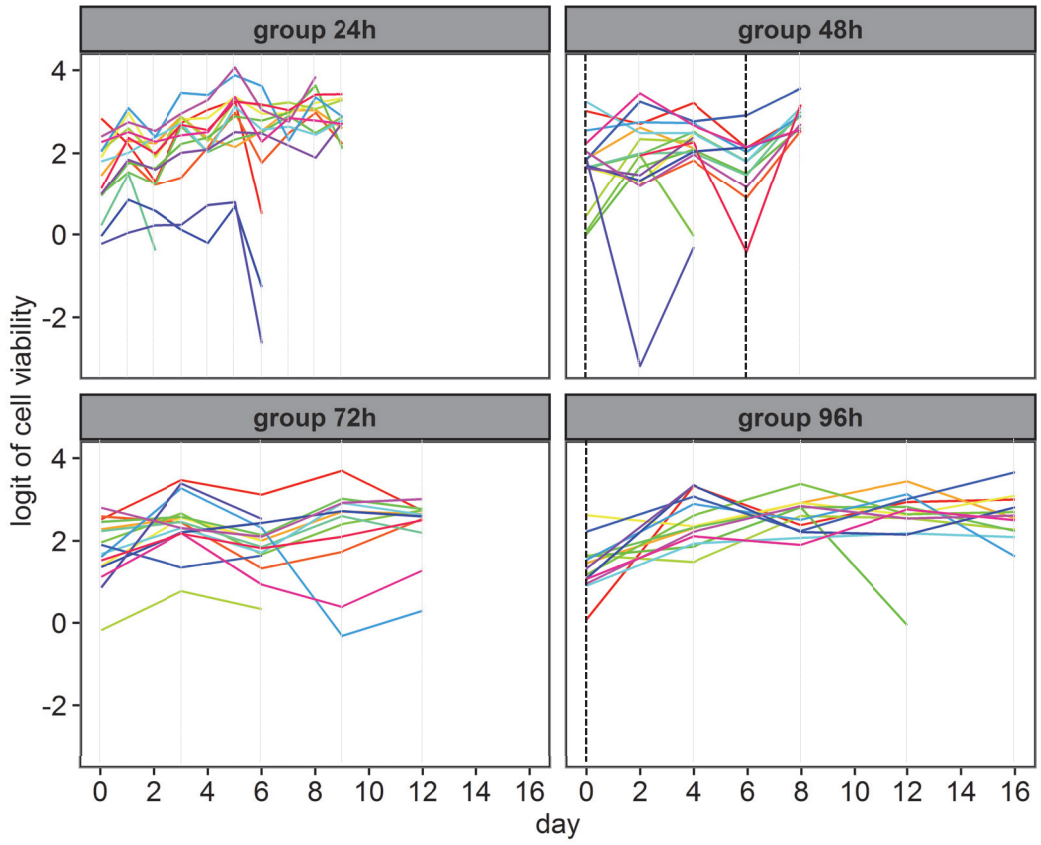


Figure 11: Evolution of individual hemocyte viability into the groups (logit transformed values)

Each solid line represents the individual snail time-course evolution of its hemocyte viability. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) not interpretable flow cytometric data or (iii) snail that did not extrude hemolymph (i.e. no retraction reflex). The vertical dashed and grey lines correspond to the days of hemocyte viability quantification into the respective groups of hemolymph collection frequency (i.e. 24h, 48h, 72h and 96h). 10 consecutive samplings have been performed for the "24h group" and 5 samplings for the 48h, 72h and 96h groups. The black and bold vertical dashed lines (groups 48h and 96h) indicate samples having waited more than one hour before quantification by the flow cytometer.

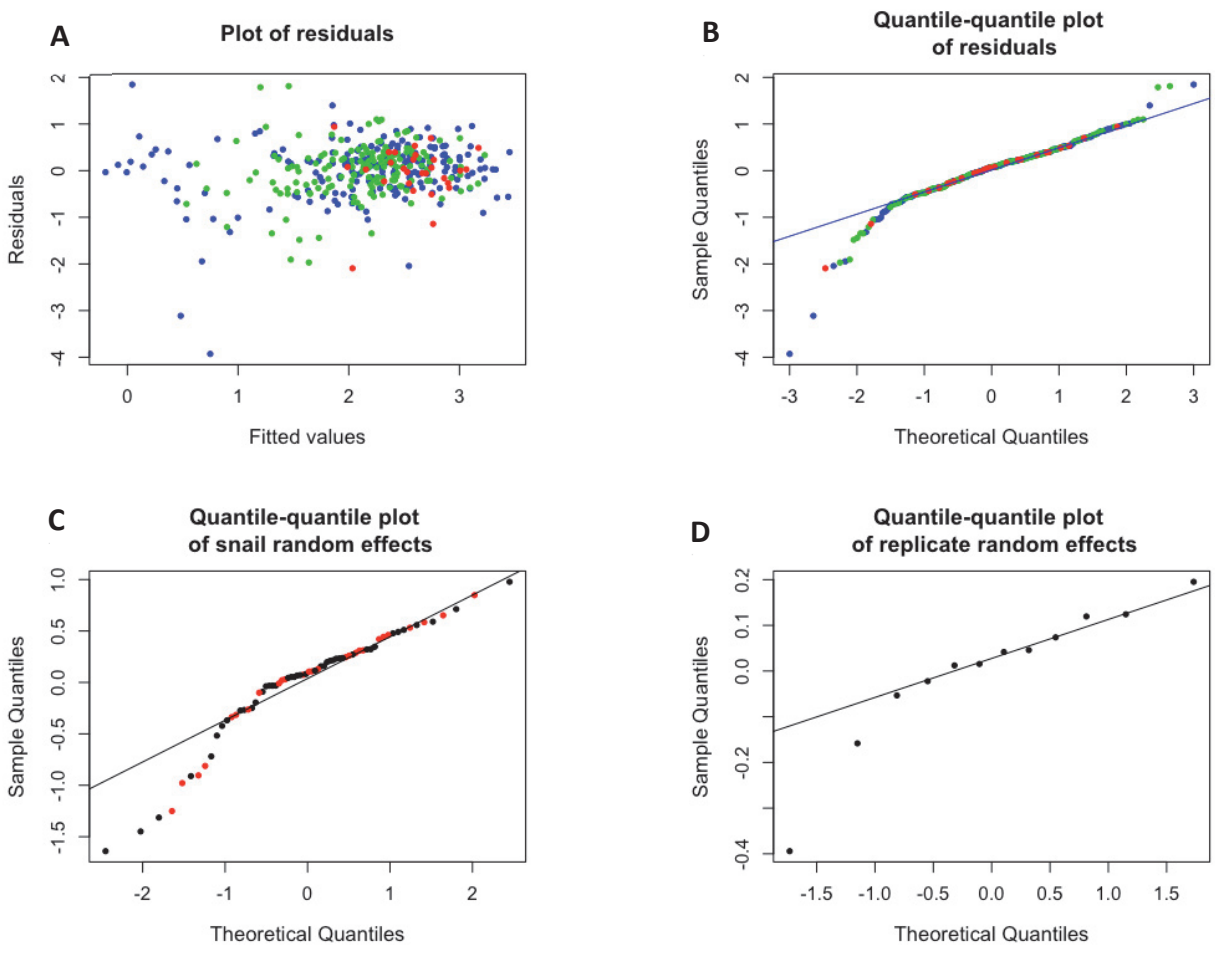


Figure 12 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte viability model

A: Colors correspond to groups. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colours correspond to groups. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: Red dots correspond to snails that died at some point during the experiment. The normal distribution assumption of snail random effects is reasonable. The scarce outlier dots are not all red and so the snail vital prognostic is unlikely the reason of their deviation from normality. D: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable, except for one replicate.

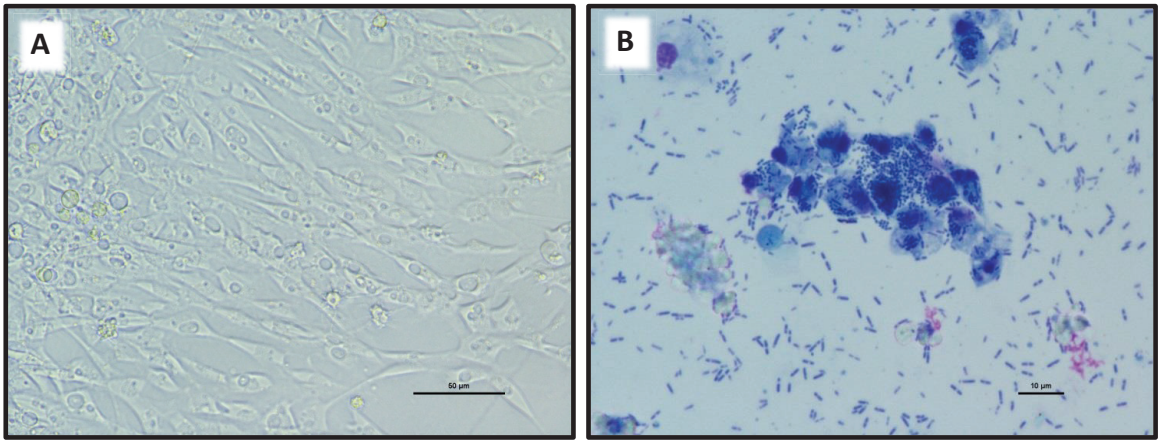


Figure 13 : Hemocytes from *L. stagnalis* observed in photonic microscopy

A: Hemocytes observed 24h after addition onto a petri dish. They were fusiform and they arranged themselves parallel each other's.
B: Hemocytes observed 24h after addition onto a petri dish and using a double May Grünwald-Giemsa coloration. Bacteria developed because the plate was let overnight in a non-sterile environment. Products of bacteria destruction can be observed around few hemocytes. Some bacteria seemed to be present within hemocytes.

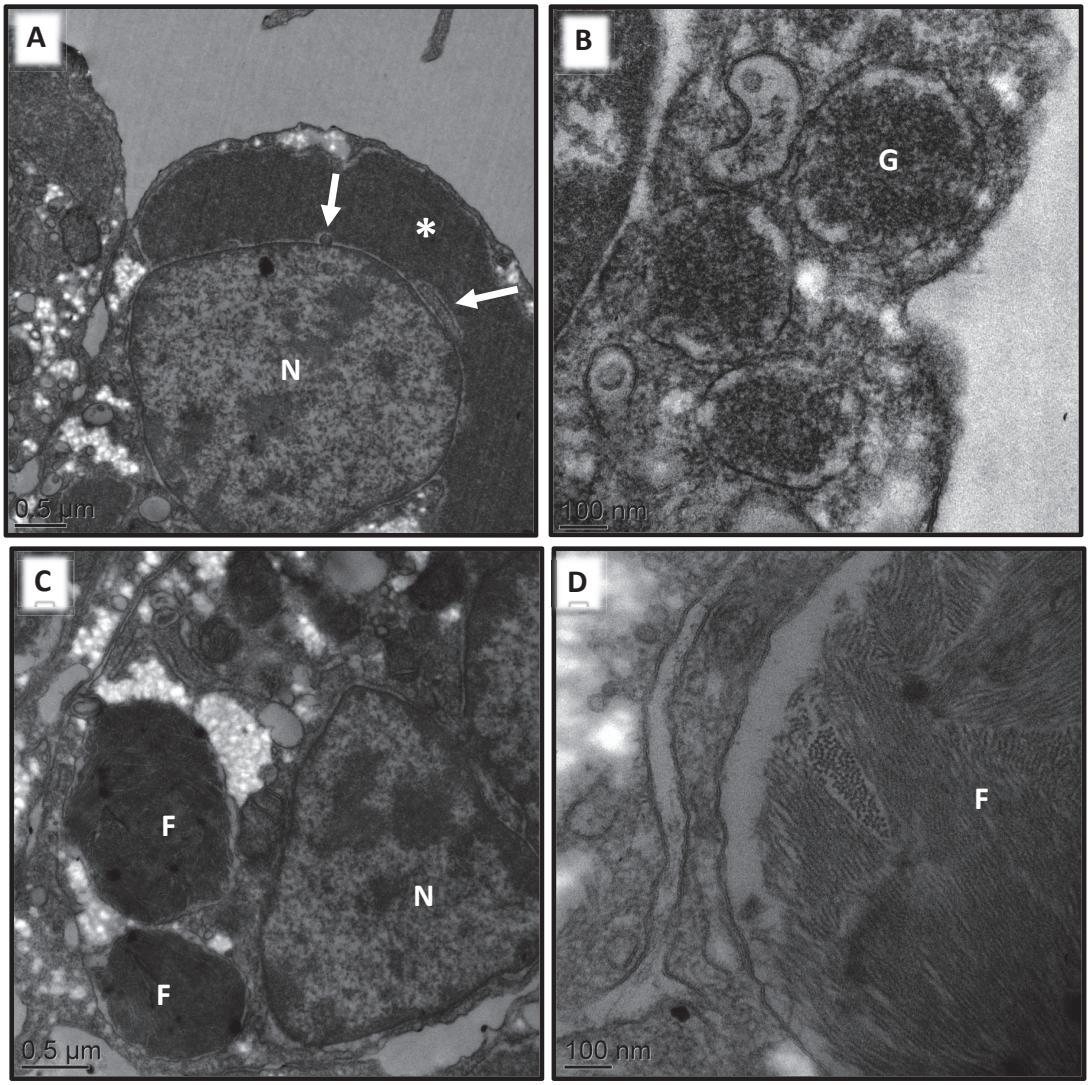


Figure 14 : Hemocytes from *L. stagnalis* observed in transmission electron microscopy

A: An unknown massive perinuclear structure (*) can be observed with vesicles (arrows) that sprout out from the nucleus (N).
B : Cytoplasm contained granules (G) but their small size (about 200 nm in diameter) may explain why they were not perceptible by photonic microscopy.
C: Fibrillary structures (F) occupied great cytosolic space.
D: Fibres from fibrillary-structures (F) were tangled and arranged by hundreds. Transversal and longitudinal sections are observed simultaneously within the same organelle.

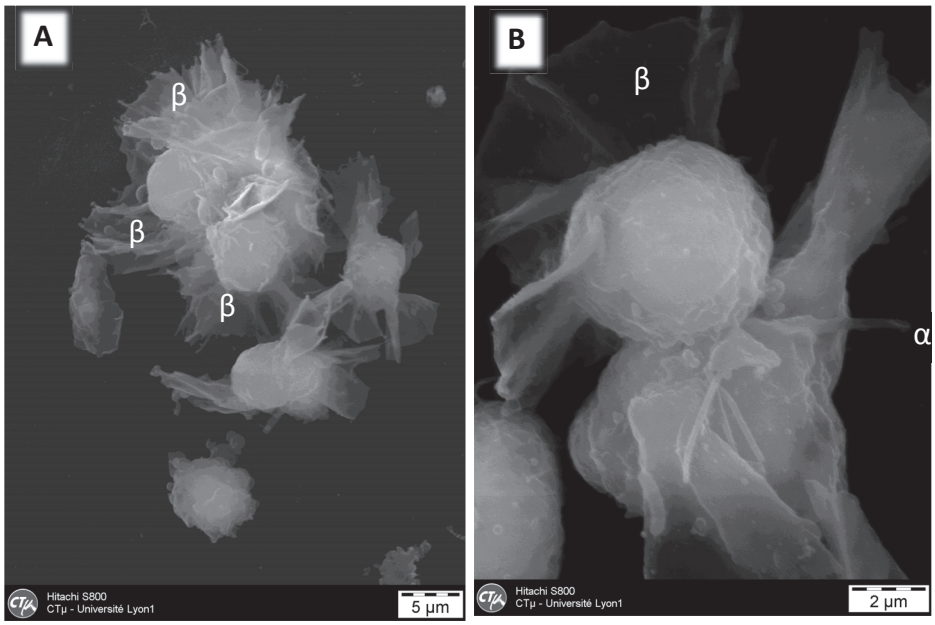


Figure 15: Hemocytes from *L. stagnalis* observed in scanning electron microscopy

A : Hemocytes were agglutinated each other's by tangled β structures.
B: Some hemocytes were spherically-shaped

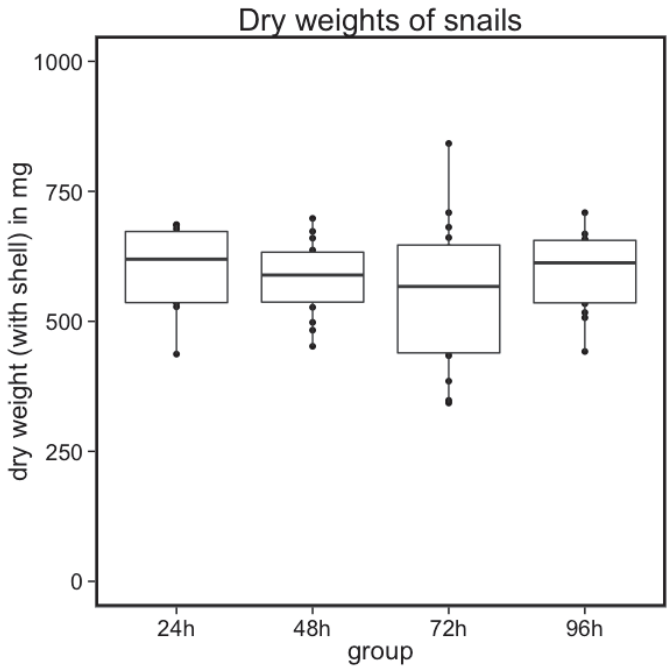


Figure 16 : Dry weights of snails

The boxplots correspond to the weight of snails (body mass + shell) after lyophilisation at the end of the experimentation into each group of hemolymph collection frequencies (i.e. 24h, 48h, 72h and 96h).

3.3 Article 3 : Recommandations pour l'analyse de l'activité oxydative immunocompétente liée aux hémocytes chez *Lymnaea stagnalis*

Chez *Lymnaea stagnalis*, nous venons de voir qu'il est préférable d'avoir un intervalle de temps supérieur à 48h entre deux collectes d'hémolymphe afin que l'immunocapacité (*i.e.*, densité et viabilité hémocytaire) des organismes ne soit pas affectée. Mohandas *et al.* [1992] avaient observé que des collectes répétées avaient des effets sur l'activité d'enzymes lysosomiales hémocytaires et donc il semble pertinent de s'intéresser à un possible effet de collectes répétées sur un marqueur d'immunocompétence fonctionnel — en l'occurrence l'activité oxydative des hémocytes — largement étudié dans les études immunotoxicologiques de ce manuscrit.

(soumis à *Journal of Xenobiotics*)

Type : *short-communication*

Résumé

L'activité oxydative immunocompétente c'est-à-dire l'activité induite NADPH-oxydase a une fonction centrale dans l'immunocompétence de *Lymnaea stagnalis*. Dans cette courte communication, le développement d'un protocole est présenté pour mesurer cette activité sur les hémocytes de *L. stagnalis* avec des particules de zymosane comme inducteurs puissants. La mesure se fait en spectrofluorimétrie car cela est adapté pour le suivi d'une cinétique enzymatique d'un grand nombre d'échantillons (aucun délai d'attente par mesure entre les puits). Un faible volume d'hémolymphe (25 μl) par individu et par condition *in vitro* est requis, ce qui permet de réaliser des duplicats ou triplicats pour des mesures robustes. Ce protocole a été validé dans le cadre d'une étude sans présence de toxique mais les organismes ont été soumis à un prélèvement répété d'hémolymphe afin de voir si cela impactait cette activité. Trois collectes d'hémolymphes ont été réalisées avec un intervalle de temps de 48h entre chaque collecte. Il a été observé une baisse graduelle de l'activité oxydative lors de la $2^{ème}$ collecte puis une baisse statistiquement significative lors de la $3^{ème}$ collecte. En définitive, cette étude suggère que des collectes répétées d'hémolymphe peuvent affecter la fonctionnalité des hémocytes chez *L. stagnalis*, en l'occurrence leur activité oxydative immunocompétente. Cela suggère d'espacer de plus de 48h les collectes lorsque plus de deux collectes sont réalisées pour mesurer l'activité oxydative immunocompétente chez *L. stagnalis*.

Mots-clés : effet de collectes répétées, activité oxydative immunocompétente, zymosan, hémocytes, spectrofluorimétrie, modèles linéaires mixtes, *Lymnaea stagnalis*

Recommendations for the analysis of hemocyte-related immunocompetent oxidative activity in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*

Paul Boisseaux[a], Patrice Noury[a], Marie-Laure Delignette-Muller[b,c], Hélène Thomas-Guyon[d], Jeanne Garric[a]

[a] *Irstea Centre de Lyon-Villeurbanne, Laboratoire d'Écotoxicologie, MAEP, 5 rue de la Doua, 69626 VILLEURBANNE (France)*
[b] *Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne, France*
[c] *Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France*
[d] *LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle*

Introduction and objectives

One of the most remarkable features of immune systems through many species is the capacity of phagocytes to produce diverse form of oxidizing agents in order to destruct invaders. Reactive oxygen species (ROS) represent a family of various reactive molecules that play pivotal roles in a myriad of physiological and pathophysiological events. The NADPH oxidase catalytic complexes (also called respiratory burst oxidases) are most often admitted to be responsible for the hemocyte immunocompetent oxidative activity [5, 7, 8]. These enzymes are activated when the cell is exposed to appropriate stimuli such as pathogen-associated-molecular patterns (PAMPs): the phenomenon is inducible [3, 9]. In several mollusks, the phagocytosis of microorganisms promotes the activation of the NADPH oxidases from hemocytes [13, 14, 10, 7], in particular in *L. stagnalis* [1]. In *L. stagnalis*, it has been observed that repeated hemolymph samplings at a 48h frequency did not affect the snails immunocapacity defined as the combination of hemocyte density and hemocyte viability [6]. However, other endpoints may still be affected such as functional markers for example, as it was reported for lysosomal enzymatic activity in *L. stagnalis* [15]. The aims of this study was (i) to develop a method in order to follow kinetics of hemocyte-related oxidative activities under basal and immunostimulated *ex vivo* conditions and (ii) to assess possible effects of repeated hemolymph collections on hemocyte oxidative activities.

1. Methods

A total of 24 calibrated snails (32 ±2 mm shell-length), free of parasites, were taken from the breeding stock of our laboratory and randomly assigned into three aquaria. Snails were maintained in a flow-through system of clean groundwater as for breeding stocks (20± 1 ˚C, 16h/8h of light/dark cycles, *ad libitum* feeding with Tetraphyll©). The experimentation duration lasted for four days and the hemolymph of individual snails was collected mechanically as described by Sminia [18] and at three times: at t = 0 h, t = 48 h and t = 96 h. When tickling the foot sole of the snail with the tip of a micropipette, the snail retracts into its shell and extrudes hemolymph through the hemal pore. The methodology of ROS measurement was adapted from [1, 16, 10]. For each snail, 25 μl of hemolymph were gently deposited into 12 wells of a 96-well plate (treated for cell

culture, Greiner, Cat. No. 655180). The plates were centrifuged (100 g, 20 min), the lymph was removed and then replaced by Snail Saline Buffer solution (SSB) [17], pre-warmed at room temperature, to achieve 200 $\mu l.well^{-1}$. An inhibitor of the NADPH-oxidase, namely the PCA (protocatechuic acid) [10, 1, 2], was used for the half of the wells (160 μM). After 30 min of slow agitation on a shaker, the half of these two groups of wells (N=24 triplicates per organism per *ex vivo* condition) was supplemented with zymosan particles (50 μl of a 2 $mg.ml^{-1}$ of SSB working solution) (Sigma Z4250), which are PAMPs from yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*). The non-stimulated cells received 50 μl of SSB. A stock solution of the cell-permeant probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) (D6883 Sigma) was previously prepared in ethanol (20 mM) and conserved at -20˚C. Straightforwardly after zymosan and SSB additions, the H_2DCFDA stock solution was diluted at 2 mM using SSB and then 10 μl were added into each well. Samples were homogenized and then the plate was read using a spectrofluorimeter (TECAN, Safire). The fluorescence at 485/530 nm (EX/EM) wavelengths was measured for 1 hour every 2 minutes. First, the raw data of relative fluorescence obtained from kinetics were converted into amount of converted product DCF (Dichlorofluorescein) by using a standard curve. Second, the activity was calculated as the mean of triplicates for each *ex vivo* condition from each snail, according to the formula :

$$oxidative\ activity\ (fmol\ of\ DCF.min^{-1}.\mu l^{-1}) = \left(\frac{slope X_{ij}(20-40min)}{25\mu l}\right)$$

where X is the amount of DCF (fmol) at the minute i for the snail j.

The datasets were analyzed by fitting linear mixed-effects models (LMEM) using the lmer function from the *lme4* package [4] in the R software. Beforehand, we applied a $\log_{10}$ transformation to the data to normalize the distributions. LMEM were first built with three fixed factors, the "zymosan" (*i.e.*, presence/absence), the "PCA" (*i.e.*, presence/absence), and the day, and two nested random factors, the snail and the replicate (aquarium). The initial model also included interaction terms between "zymosan" and "PCA", "zymosan" and "day", "PCA" and "day". The model was simplified by removing the effects that did not appear significant. An effect was considered as statistically significant when the 95 % confidence interval of any of its corresponding coefficients did not contain the value 0.

2. Results and Discussion

2.1. Baseline activities

In the present study, the data are expressed in $fmol\ of\ DCF.min^{-1}.\mu l^{-1}$. It corresponds to the oxidative activity from hemocytes (*i.e.*, the lymph was removed) per microliter of hemolymph. The transformation of relative fluorescent units in amount of substance converted has been made in order to facilitate the data comparisons between independent experimentations and the use of different spectrofluorimeter settings (*e.g.*, gains). By using the corresponding standard curve, the same data calculation is possible. The underlying question that justified such a methodology was: what is the hemocyte-related immunocompetent oxidizing ability in the circulating system of the snail ? Indeed, interpretation of ROS productions are tricky in immunophysiopathology because they encompass many origins (*e.g.*, mitochondrial, endoplasmic reticu-

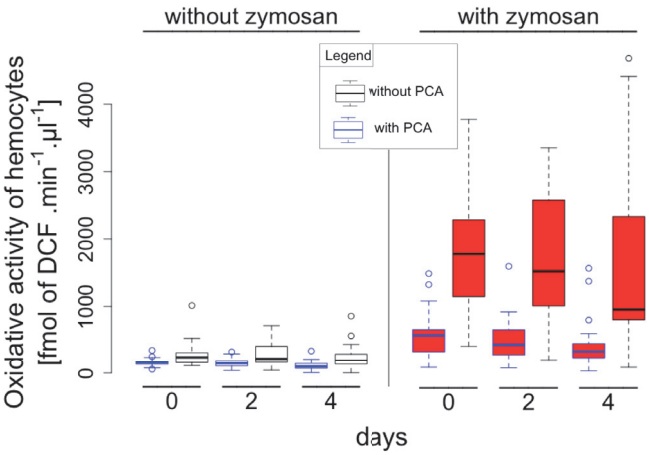


Figure 1: Hemocyte-related oxidative activities under repeated hemolymph collections

The graph represents the oxidative activity from snail's hemocytes — being sampled every 48h — under different *ex vivo* conditions. The *ex vivo* conditions correspond to samples with zymosan (right) and without zymosan (left); both groups were supplemented with PCA (blue borders) or not (black borders).

lums, peroxisome activities, etc) [8], NADPH-activity [1], mechanical-stress [12] and xenobiotic-oxidative stress [17, 19, 11] among others. They may constitute indication of toxicity or of immunocompetence (oxidative stress *vs* immunocompetent oxidative activity) and so basal together with stimulated activities are both complementary. Last, the lymph was removed in order to reduce ROS background coming from other pathways than hemocytes.

ROS production showed a strong increase when the samples were stimulated with zymosan and a strong decrease when they were incubated with PCA (fig. 1). A transient reduction phase occurred at approximately 25 minutes (fig.2). Afterwards, ROS production increased linearly. The mean (in decimal logarithm) at day 0 for samples without zymosan and without PCA was estimated to 2.39 (with 95% confidence interval (CI) of [2.26 — 2.51]). This $\log_{10}$ value corresponds to a hemocyte-related oxidative activity of 245.47 $fmol\ of\ DCF.min^{-1}.\mu l^{-1}$. In average, the immunostimulation with zymosan increased significantly the $\log_{10}$ value of the basal activity by 0.82 (95% CI of 0.74 —- 0.90), which corresponds to an increase by a factor 6.61 of the activity (100.82 = 6.61). The presence of the inhibitor PCA decreased significantly the log10 value of the basal activity by 0.23 (95% CI of -0.19 —- -0.25). A significant interaction was found between zymosan and PCA. Hence, the presence of PCA diminished by 0.53 (-0.53 = -0.23 - 0.30) the $\log_{10}$ values of the zymosan-stimulated oxidative activity instead of 0.23 in the absence of zymosan. Addition of PCA did not lead to a proportional inhibitory effect whether the samples were immunostimulated with zymosan or not.

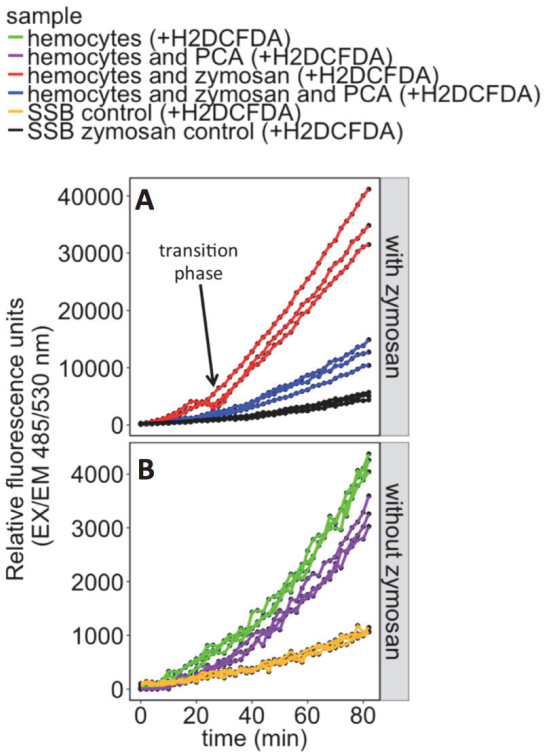


Figure 2: Example of kinetics of hemocyte-related oxidative activities from 25 μl of hemolymph [gain= 130]

The graph represents an example of the ROS kinetics obtained from raw data with the spectrofluorimeter into the different *ex vivo* conditions, for one snail, with corresponding controls. The black arrow indicates a kinetic transition (*i.e.*, unknown phenomenon) being observed in most of the snails. Note that the **scale** from graph A is **ten times bigger** than the one from the graph B (values are much higher with zymosan particles and hemolymph).

2.2. Repeated collections

Data analysis from the model revealed a significant effect of the day 4 but not the day 2 compared to the day 0. The oxidative activities at day 4 were estimated to multiply by 0.64 the ones from day 0. In other words, the third hemolymph collection led to a significant decrease in the oxidative activities (*i.e.*, basal and immunostimulated) of approximately 36% from the oxidative activities measured at day 0. No significant interactions were found neither between the day and the zymosan nor between the day and the PCA. The repeated hemolymph collections decreased both basal and zymosan-stimulated oxidative activity from hemocytes. The decreases are particularly important for the third hemolymph collection (*i.e.*, day 4) on the figure 1. Such phenomenon could be the result of a shift in hemocytes maturity (linked to hemocyte renewal turnover) provoked by repeated collections and so young hemocytes would not have the cell machinery —- or to a lesser extent — to carry out the immunocompetent oxidative activity. Further studies should be conducted to confirm or infirm this hypothesis. In parallel, at each sampling time the snails' hemocyte density and viability have been quantified by flow cytometry but no "sampling effect" has been detected on these endpoints.

3. Conclusion

The presented method has been optimized because (i) only 25 μl of hemolymph per well replicate are necessary and so it is possible to set up several well replicates per individual, (ii) spectrofluorimetry allows assessing real kinetics of a broad number of samples, what is tricky in flow cytometry, (iii) lymph is removed and so the ROS production originates mainly from hemo-

cytes, (iv) zymosan particles are strong inductors of the immunocompetent oxidative activity, (iv) linear mixed-effect models used allow quantifying the effect of all factors, including time.

We recommend increasing the time interval (*i.e.*, more than 48h) if more than two consecutive hemolymph collections are performed on one snail, otherwise the effect of "mechanical hemolymph collection" will likely impact the hemocyte oxidative activities and could lead to a bias in results interpretation.

Acknowledgements

The Rhône-Alpes region provided financial support to Paul Boisseaux (ARC3 Environnement).

References

[1] Adema, C., van Deutekom-Mulder, E., van der Knaap, W., and Sminia, T. (1993). NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod Lymnaea stagnalis. *Journal of leukocyte biology*, 54(5):379–383.

[2] A't Hart, B., Simons, J. M., Rijkers, G. T., Hoogvliet, J. C., Van Dijk, H., and Labadie, R. P. (1990). Reaction products of 1-naphthol with reactive oxygen species prevent nadph oxidase activation in activated human neutrophils, but leave phagocytosis intact. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(3):241–249.

[3] Babior, B. M., Benna, J. E., Chanock, S. J., and Smith, R. M. (1997). The NADPH oxidase of leukocytes: the respiratory burst oxidase. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34:737–783.

[4] Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.

[5] Bedard, K. and Krause, K.-H. (2007). The nox family of ros-generating nadph oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1):245–313.

[6] Boisseaux, P., Delignette-Muller, M.-L., Abbaci, K., Thomas, H., and Garric, J. (2016). Analysis of hemocytes in Lymnaea stagnalis: Characterization and effects of repeated hemolymph collections. *Fish & Shellfish Immunology*.

[7] Buggé, D. M., Hégaret, H., Wikfors, G. H., and Allam, B. (2007). Oxidative burst in hard clam (mercenaria mercenaria) haemocytes. *Fish & shellfish immunology*, 23(1):188–196.

[8] Donaghy, L., Hong, H.-K., Jauzein, C., and Choi, K.-S. (2015). The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish & shellfish immunology*, 42(1):91–97.

[9] Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A. K., and Soudant, P. (2012). Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster Crassostrea gigas: a mitochondrial involvement. *PloS one*, 7(10):e46594.

[10] Hahn, U. K., Bender, R. C., and Bayne, C. J. (2000). Production of reactive oxygen species by hemocytes of Biomphalaria glabrata: carbohydrate-specific stimulation. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(6):531–541.

[11] Koutsogiannaki, S., Franzellitti, S., Fabbri, E., and Kaloyianni, M. (2014). Oxidative stress parameters induced by exposure to either cadmium or 17β-estradiol on mytilus galloprovincialis hemocytes. the role of signaling molecules. *Aquatic Toxicology*, 146:186–195.

[12] Lacoste, A., Malham, S. K., Gélébart, F., Cueff, A., and Poulet, S. A. (2002). Stress-induced immune changes in the oyster crassostrea gigas. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(1):1–9.

[13] Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., and Samain, J.-F. (2007). In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in Crassostrea gigas hemocytes. *Aquaculture*, 270(1):413–421.

[14] Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., and Leboulenger, F. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ*, 2(2):91–104.

[15] Mohandas, A., Adema, C., Van der Knaap, W., and Sminia, T. (1992). The effect of haemolymph extraction on distribution of lysosomal enzymes in Lymnaea stagnalis haemocytes: a cytochemical study. *Comparative Haematology International*, 2(2):61–67.

[16] Moss, B. and Allam, B. (2006). Fluorometric measurement of oxidative burst in lobster hemocytes and inhibiting effect of pathogenic bacteria and hypoxia. *Journal of Shellfish Research*, 25(3):1051–1057.

[17] Russo, J., Lefeuvre-Orfila, L., and Lagadic, L. (2007). Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fome-

safen in the pond snail lymnaea stagnalis (gastropoda, pulmonata). *Environmental pollution*, 146(2):420–427.

[18] Sminia, T. (1972). Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate Lymnaea stagnalis studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 130(4):497–526.

[19] Winston, G. W., Moore, M. N., Kirchin, M. A., and Soverchia, C. (1996). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, mytilus edulis: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(2):221–229.

3.4 Résultats complémentaires sur les caractérisations hémocytaires

3.4.1 Distributions hémocytaires

Les distributions hémocytaires peuvent être quantifiées selon les régions des cytogrammes correspondants (voir explications p. 124). La figure 3.2 (p. 184) représente les proportions relatives des sous-populations hémocytaires et leur évolution dans le cadre d'une fréquence de prélèvement hémolymphatique de 24h. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type à partir des valeurs normalisées sur la moyenne des sous-populations hémocytaires par jour de mesure. Les proportions de sous-populations hémocytaires semblent stables au cours des jours de prélèvements et sont en moyenne de 18, 42 et 40 % pour les hémocytes petits, intermédiaires et larges, respectivement. La variabilité interprétée selon les écart-types est plus élevée pour les cellules larges et intermédiaires que pour les petites cellules (rondes).

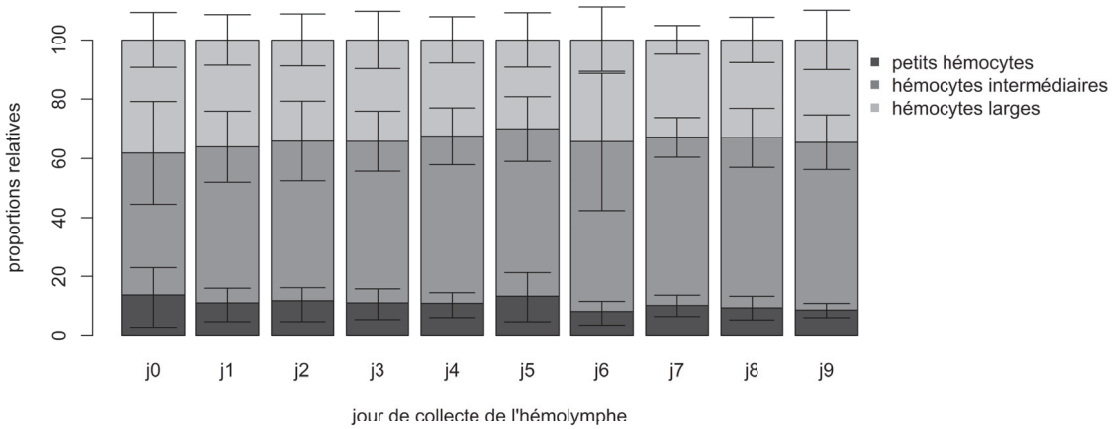


FIGURE 3.2 – Sous-populations hémocytaires : exemple de l'expérience avec une fréquence de prélèvement de 24h

Comme cela est montré à la page 124, les régions des sous-populations hémocytaires sont dépendantes de l'opérateur surtout en ce qui concerne la distinction des cellules intermédiaires avec les cellules larges. En effet, les petits hémocytes de la région R2 sont mieux séparés des deux autres régions R3 et R4. La pertinence de quantifier ces sous-structures hémocytaires doit être confirmée par leur justification (i) microscopique et/ou (ii) fonc-

tionnelle. Souvent, de forte différences structurelles entre hémocytes sont associées à des différences fonctionnelles. Par exemple, les granulocytes sont souvent décrits comme ayant une activité de phagocytose plus importante que les hyalinocytes (*e.g.*, *Crassostrea Virginica*, [Wikfors & Alix, 2014]), lesquels ont une activité anti-microbienne plus importante que les cellules rondes.

3.4.2 Images complémentaires

Des images de microscopie électronique (à transmission et à balayage) sont présentées dans cette section. Ces images sont complémentaires de celles présentées dans l'article 2 et correspondent à la même série d'analyse. Le but de cette section est simplement d'étoffer la caractérisation descriptive des hémocytes de *L. stagnalis* (voir article 2 pour les matériels et méthodes utilisées). Par souci de lisibilité et d'épuration des images, aucune annotation ou légende n'a été mise devant les images. Chacune ayant déjà été mentionnée dans l'article 2, j'invite le lecteur à s'y référer en cas de doute sur les structures décrites. En ce qui concerne la microscopie électronique à transmission (MET), il est toujours bon de se rappeler que l'observation est soumise à l'aléa du plan de coupe. Par exemple, les images de la figure 3.4 A et B semblent différentes de beaucoup d'autres images mais aucune conclusion ne peut être tirée sur la présence de deux types cellulaires différents ou sur le diamètre des cellules car (i) le plan de coupe est aléatoire et (ii) les cellules n'ont pas été triées au préalable. Enfin, des observations en microscopie photonique d'hémocytes de *L. stagnalis* après un tri-cellulaire sont présentées en annexe E.

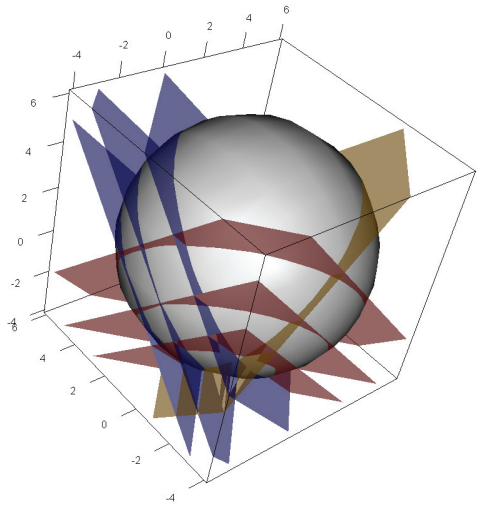


FIGURE 3.3 – Représentation des plans de coupes aléatoires des cellules pour leur observation en MET

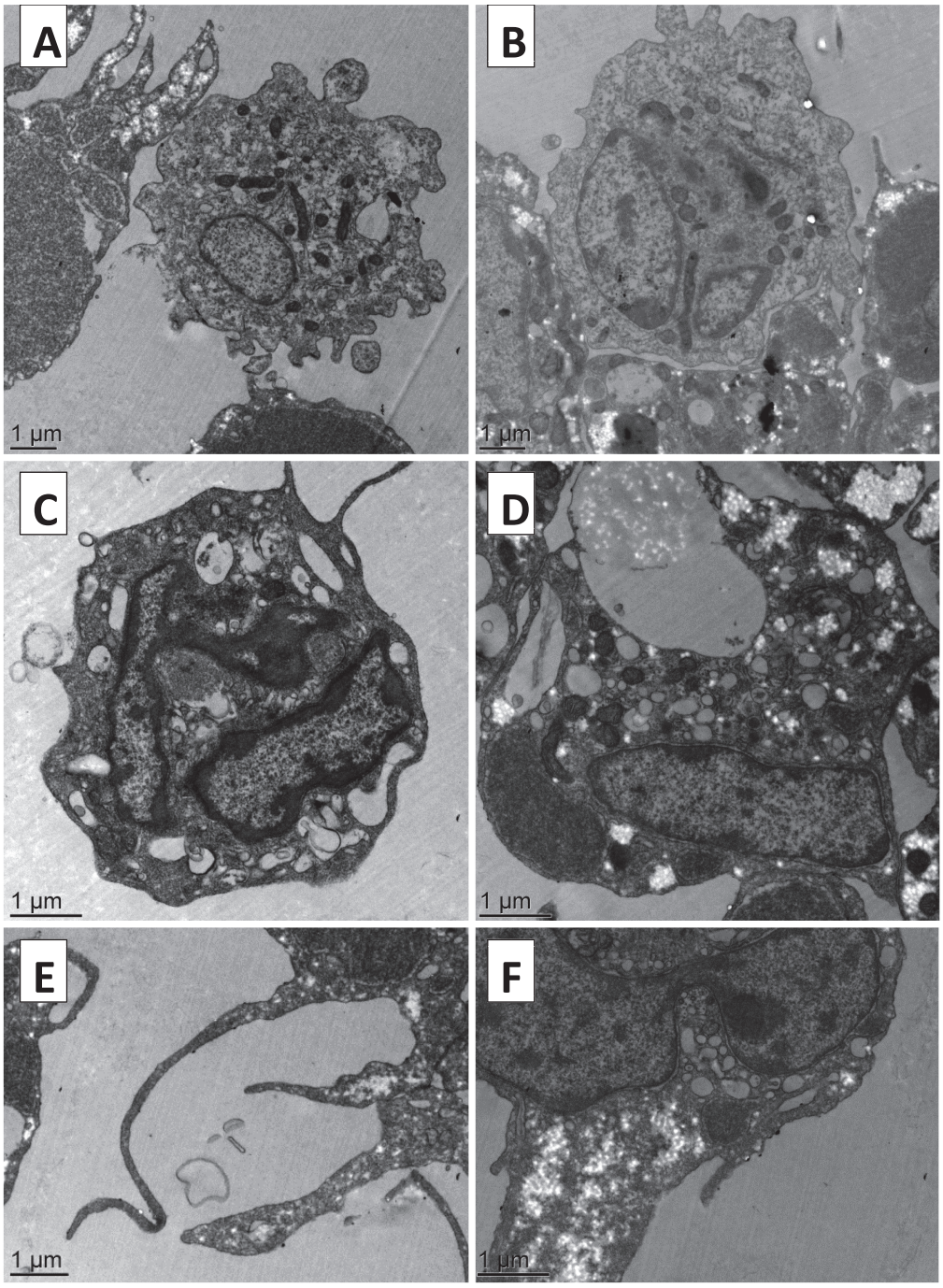


FIGURE 3.4 – Aspect général des hémocytes
A et **B** : structures peu riches en vésicules mais riches en mitochondries (cellules rondes ou plan ?) ; **C** : hémocyte polynucléaire avec plusieurs phagosomes ; **D** : illustration de la plasticité cellulaire : invagination de la membrane ; **E** : filipode d'hémocyte ; **F** : polylobulation nucléaire reliée par une structure étroite (canule) de chromatine.

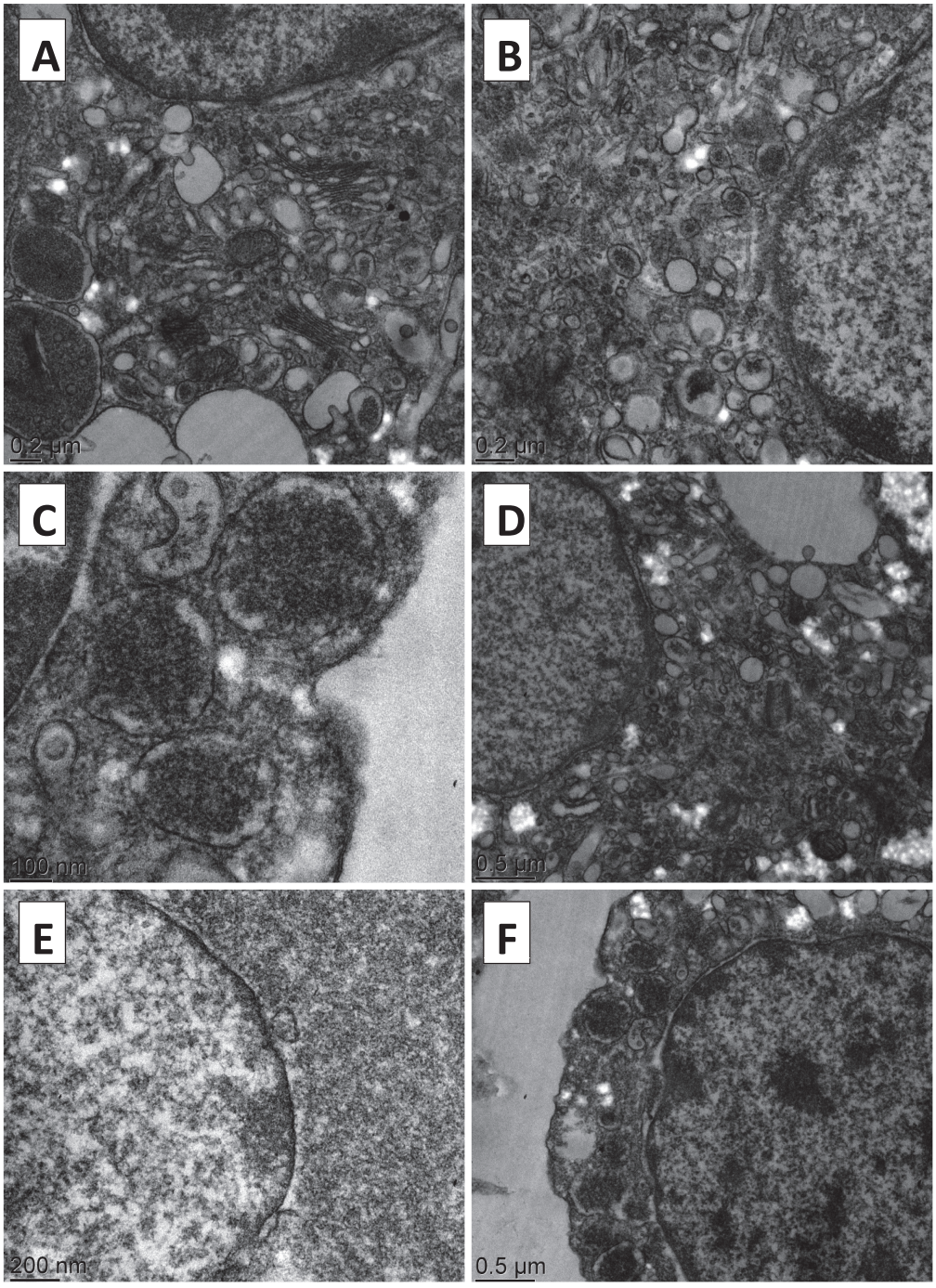


FIGURE 3.5 – Signes d'activité cellulaire intense
A et **B** : nombreuses vésicules, nombreux granules (petits) et réticulum endoplasmiques ; **C** : zoom sur les granules denses ; **D** : exocytose de granule ; **E** : système dynamique de communication avec le noyau ; **F** : multiples granules.

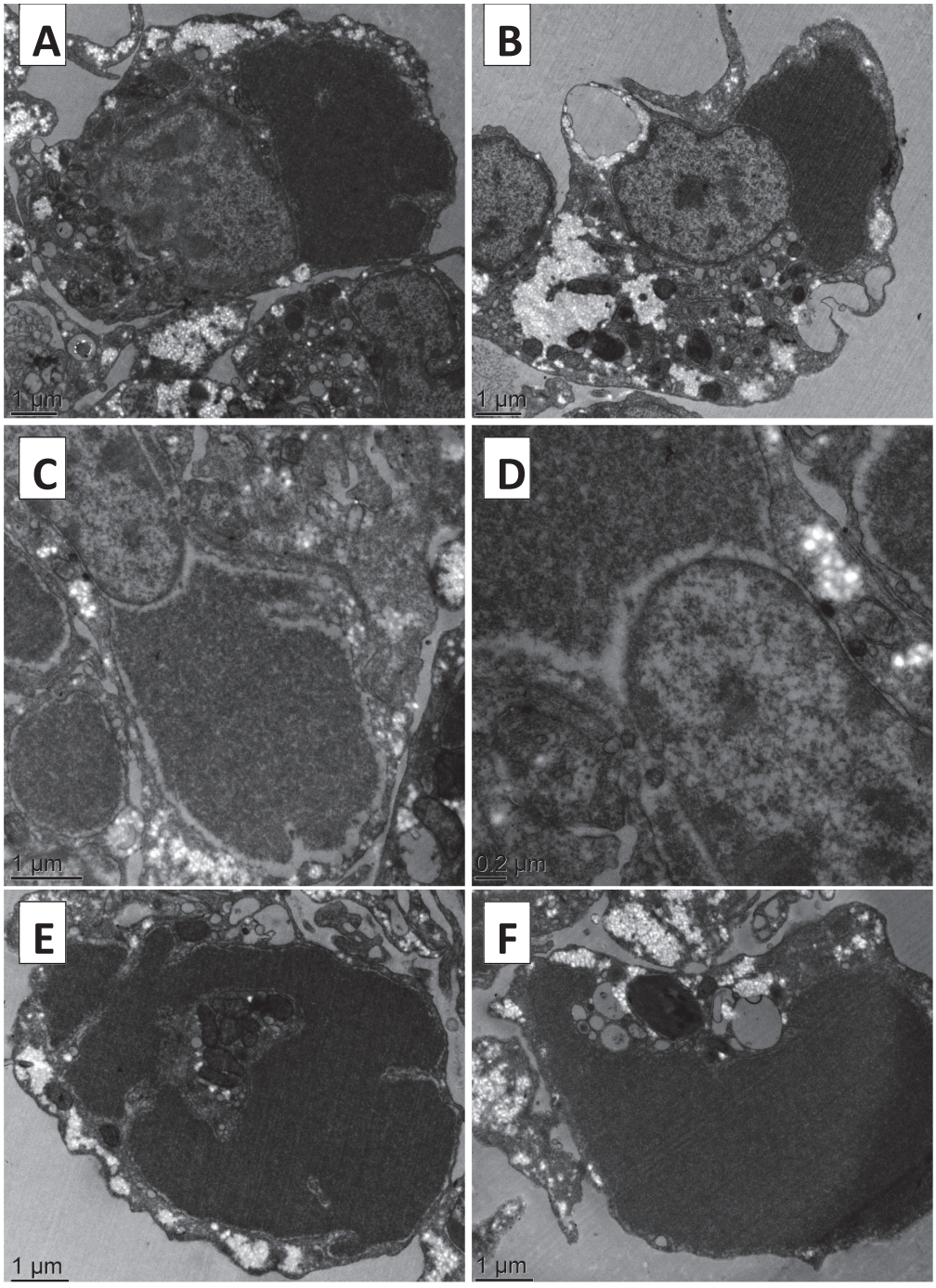


FIGURE 3.6 – Première ultrastructure abondante d'intérêt
A et **B** : Ces structures non-identifiées sont observées dans la plupart des hémocytes ; **C** et **D** : Très souvent, elles sont observées dans l'espace périnucléaire ; **E** et **F** : Elles occupent des volumes cellulaires très importants.

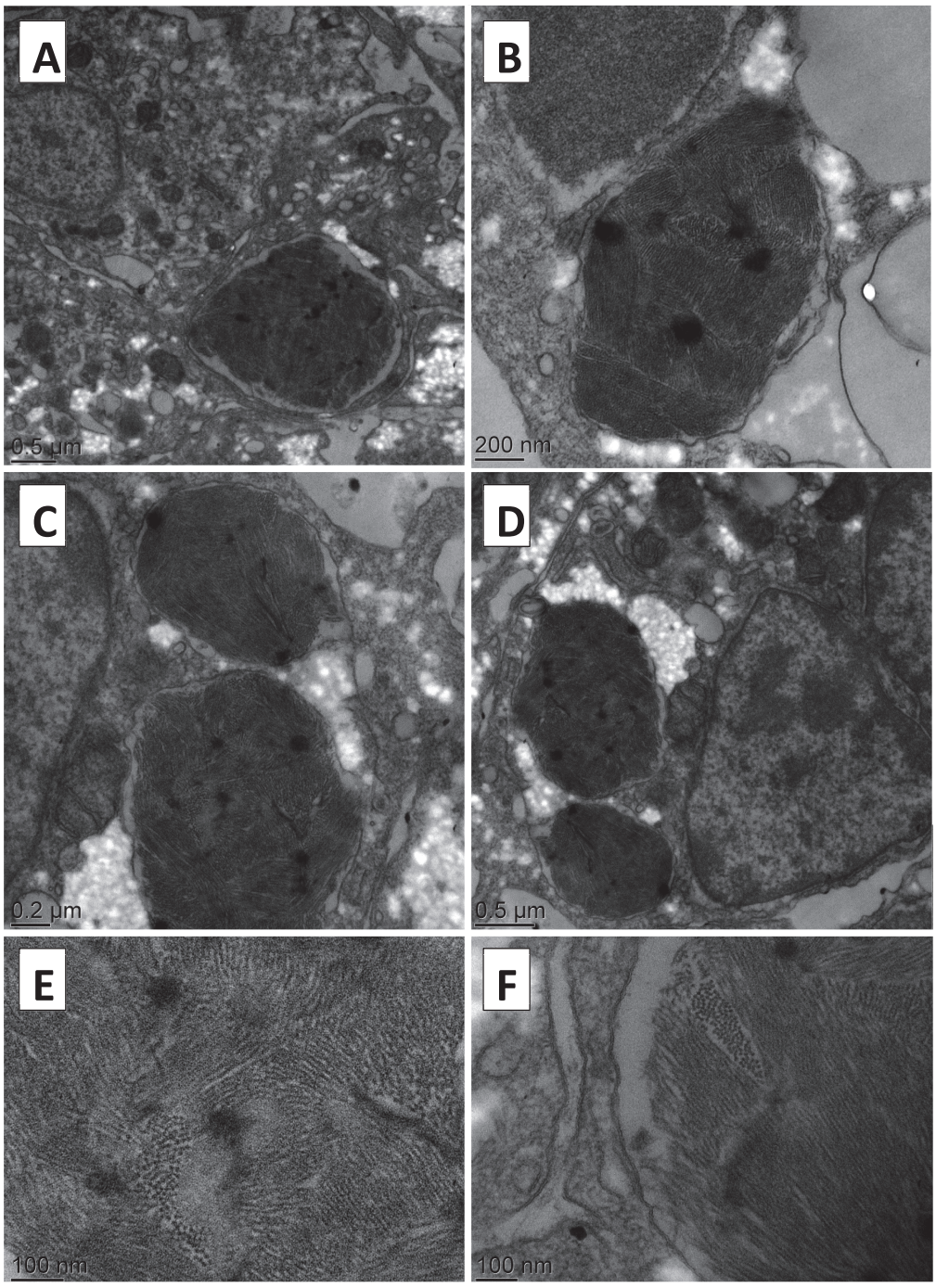


FIGURE 3.7 – Deuxième ultrastructure abondante d'intérêt
A et **B** : La structure fibrillaire non-identifiée (exceptée l'appellation *lysosomal-like structure* de Sminia (1972)) se retrouve dans la plupart des micrographes ;**C** et **D** : Ces structures « en pelote de laine » peuvent être multiples dans les cytoplasmes et occuper un volume cellulaire important ; **E** et **F** : Ces structures sont arrangées par fibres empaquetées par centaines puis enroulées de manière pluridirectionnelle.

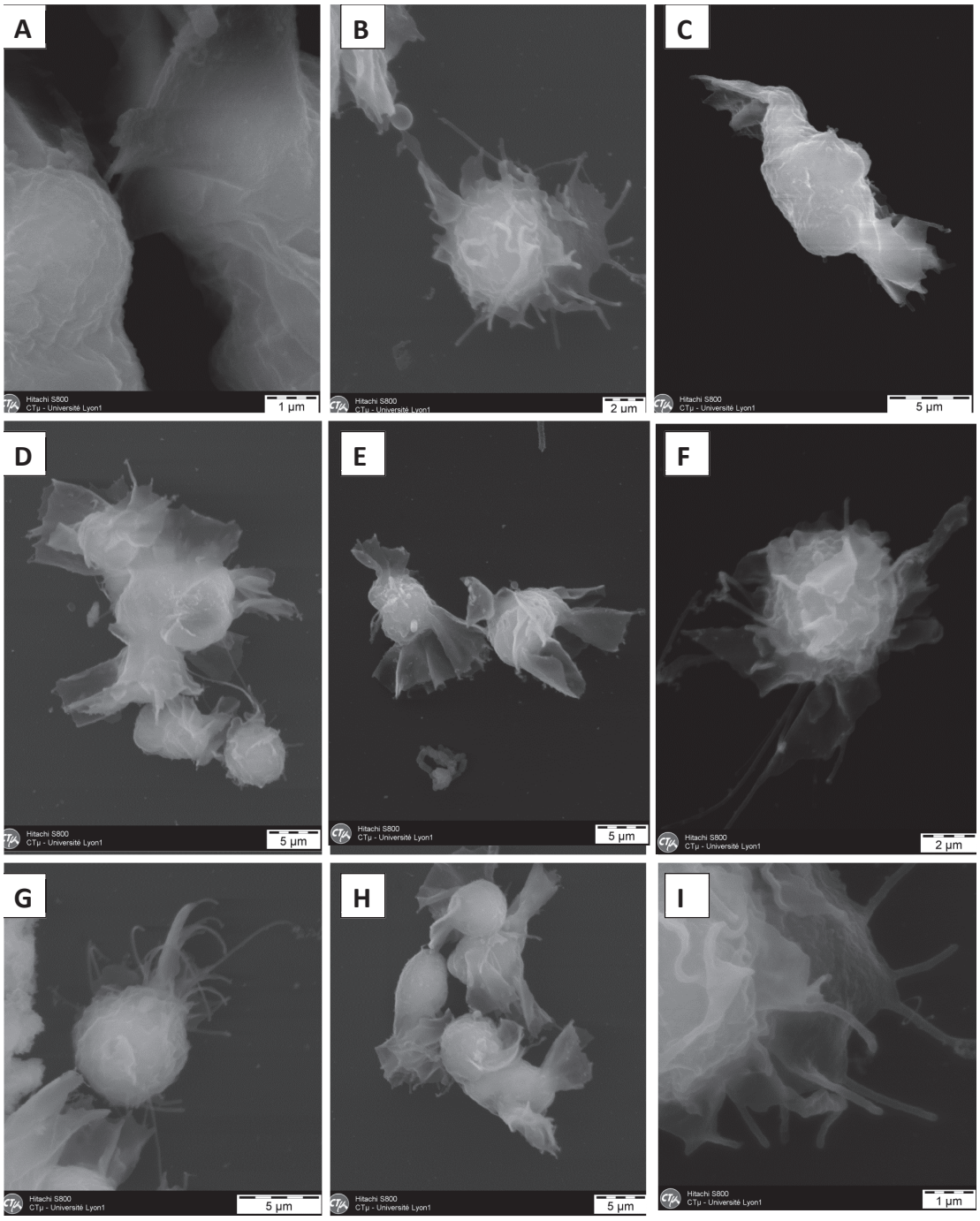


FIGURE 3.8 – Structure tridimentionnelle des hémocytes circulants chez *L. stagnalis* **A** : contact entre deux hémocytes et surface craquelée ; **B** : protrusions de filipodes ; **C** : hémocyte très ovoïde avec des voiles aux extrémités ; **D** : aggrégation hémocytaire ; **E** : deux hémocytes avec les structures « en voiles » très développées ; **F** : hémocyte romboïde rugueux ; **G** : hémocyte romboïde avec plusieurs filipodes ; **H** : aggrégation d'hémocytes ; **I** : filipodes d'hémocytes (exploration du microenvironnement ?).

La première partie du manuscrit s'achève. Les recherches, caractérisations et développements fondamentaux ont été réalisés pour envisager leur utilisation dans un contexte écotoxicologique. Dans le prochain chapitre, nous nous intéresserons aux objectifs (6), (7) et (8) qui concernent respectivement la **sensibilité** des marqueurs d'immunocompétence évalués (face aux concentrations), leur **rapidité de modulation** et la transposition de **spécificité immunotoxique de substances chimiques entre espèces de différents phylums**. L'approche multi-biomarqueur a été appliquée lors d'expositions à une classe particulière de xénobiotiques : des **produits pharmaceutiques**. Les expositions se sont faites à des concentrations **réalistes de l'environnement** (1-10 $\mu g.L^{-1}$) et à de fortes concentrations, dites « **thérapeutiques** » (100-1000 $\mu g.L^{-1}$). Les modes d'actions ont été spécifiquement sélectionnés selon les intéractions connues (*i.e.*, immunomodulateurs ou immunosuppresseurs) avec le système immunitaire de vertébrés. Les expositions ont été réalisées sur de courtes périodes (3 jours).

Deuxième partie

IMMUNOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

Chapitre 4

Évaluation du potentiel immunotoxique aigu, chez *L. stagnalis*, de xénobiotiques pharmaceutiques d'intérêt

Sommaire

4.1 Contexte et objectifs 194

4.2 Article 4 : Effets immunotoxiques à court terme de l'anticancéreux Etoposide sur l'escargot des étangs *Lymnaea stagnalis* 196

4.3 Article 5 : Réponses immunitaires chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* après une courte exposition à des produits pharmaceutiques préoccupants pour les systèmes immunitaires : Diclofenac, Cyclophosphamide et Cyclosporine A 200

4.1 Contexte et objectifs

Parmi la diversité des produits chimiques rejetés dans les eaux de surface, les produits pharmaceutiques constituent une classe de xénobiotiques paradoxale. Ils proviennent d'une activité anthropique (industrie pharmaceutique) et ont pour finalité d'améliorer la santé des organismes (usage humain et vétérinaire). Ils sont conçus pour leurs vertus thérapeutiques mais chaque médicament présente un panel d'effets secondaires. Les patients rejettent une fraction des molécules mères ingérées mais non métabolisées et aussi des métabolites d'origine médicamenteuse via leurs urines et feces. Ces xénobiotiques vont être collectés et filtrés à des degrés variables dans les stations d'épurations (STEPs) avant d'être rejetés dans les eaux de surface. De par leurs propriétés physico-chimiques, certains médicaments présentent plus de métabolites en sortie de STEP (effluents) qu'en entrée de STEP (*influents*). Le degré de métabolisation de chaque molécule mère, le déversement non-écoresponsable de médicaments ou l'utilisation dans un cadre vétérinaire sont autant de sources de contaminations des milieux. Ainsi, les médicaments se retrouvent à des concentrations non négligeables dans les eaux de surface. Les médicaments et métabolites génèrent une pression chimique chronique sur des espèces non-cibles de l'environnement. Ils peuvent induire des toxicités plus ou moins spécifiques. Plusieurs **médicaments** sont conçus pour intéragir spécifiquement avec le système immunitaire (e.g., immunosuppresseurs ou immunomodulateurs) des humains ou animaux mammifères non-humains dans le cadre d'une utilisation vétérinaire (**réponses aigües**). Certains médicaments sont utilisés à de fortes doses et sont conçus pour être particulièrement agressifs : c'est le cas de la plupart des médicaments anti-cancéreux. Les voies de métabolisation varient selon les espèces et les sensibilités de réponse aux divers métabolites également, ce qui fait que l'impact des produits médicamenteux est difficile à appréhender correctement dès lors qu'une espèce non-cible est considérée.

Un xénobiotique sera d'autant plus immunotoxique qu'il induit des effets délétères sur des traits immunitaires de manière rapide (effets aigus), à des concentrations faibles (sensibilités de concentration), en ciblant le système immunitaire avant d'autres fonction physiologiques (précocité physiologique) et cela sur plusieurs phylums (spécificité immunotoxique trans-phylum). La figure 4.1 (p. 195) illustre cette conception de la spécificité immunotoxique d'un xénobiotique.

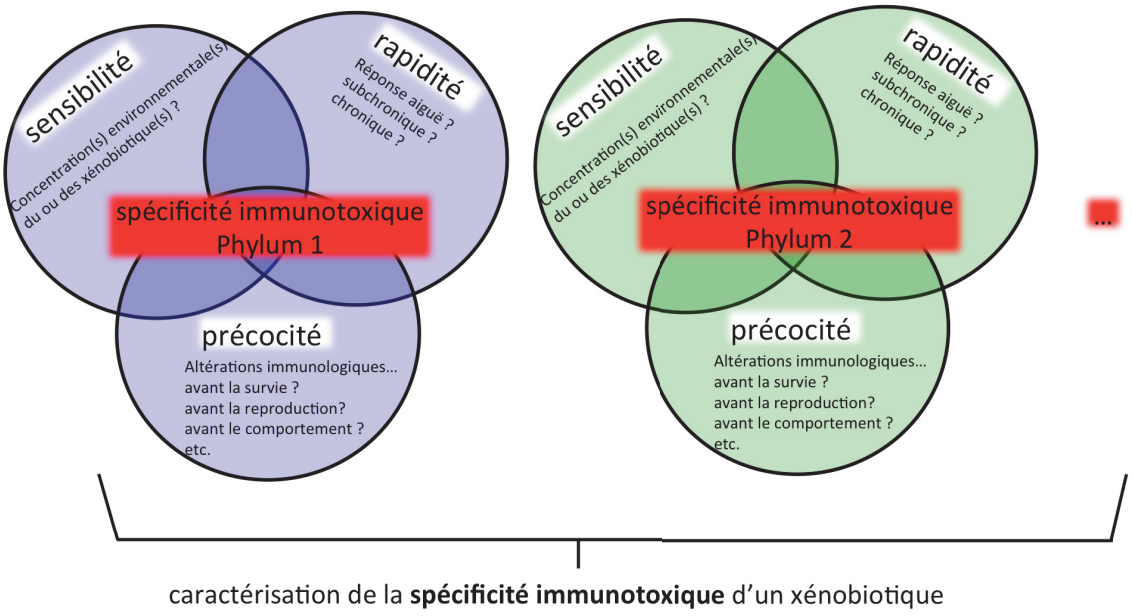


FIGURE 4.1 – Immunotoxicité d'un xénobiotique

Le chapitre suivant vise à étudier l'effet de différentes classes de médicaments — qui sont conçues pour agir directement sur le système immunitaire de leur organisme cible (humains et rongeurs) — sur le système immunitaire de *Lymnaea stagnalis*. Les anticancéreux étoposide et cyclophosphamide (médicament et promédicament), l'anti-inflammatoire diclofenac et l'anti-rejet de xénogreffes cyclosporine A ont été étudiés (voir les classifications toxicologiques dans l'annexe F.2, p. 427). Tous ont des propriétés immunosuppressives chez les humains ou les rongeurs, à l'exception du diclofenac. De courtes expositions de trois jours ont été réalisées à des concentrations environnementalement réalistes (1–10 $\mu g.L^{-1}$) et à de fortes concentrations dites thérapeutiques (100–1000 $\mu g.L^{-1}$). A l'issue des expositions, des marqueurs d'immunocompétence de l'approche multibiomarqueur présentée dans le premier axe de la thèse ont été évalués. Ce chapitre vise à fournir des éléments de réponse concernant la **sensibilité** de réponse des immunomarqueurs vis-à-vis des **concentrations** d'exposition aux xénobiotiques, leur **rapidité** de réponse (réponses aiguës) et la **spécificité immunotoxique trans-phylum** des molécules sélectionnées.

4.2 Article 4 : Effets immunotoxiques à court terme de l'anti-cancéreux Etoposide sur l'escargot des étangs *Lymnaea stagnalis*

(publié dans *Journal of Xenobiotics*)

Type : *short-communication*

Résumé de l'article

Les anti-cancéreux représentent une classe de produits pharmaceutiques particuliers car ils nécessitent des posologies lourdes et les traitements sont souvent agressifs de par leur forte activité cytotoxique. L'Etoposide est un médicament anti-cancéreux utilisé lors de chimiothérapies contre plusieurs types de cancers (e.g., testicules, poumons et lymphomes). Des concentrations non négligeables sont retrouvées dans les eaux de surface. Ce court article présente les effets immunotoxiques de l'Etoposide qui ont été observés sur le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis*. Une courte exposition (3 jours) à des concentrations dites « environnementales » (1 — 10 $\mu g.L^{-1}$) a induit une augmentation des densités hémocytaires. L'exposition à des concentrations dites « thérapeutiques » (100 — 1000 $\mu g.L^{-1}$) a induit une très forte baisse des densités hémocytaires, caractéristique d'une immunosuppression. Une cytotoxicité, c'est-à-dire une baisse de la viabilité hémocytaire a été observée à 10, 100 et 1000 $\mu g.L^{-1}$, alors que l'activité de phagocytose des hémocytes n'a pas été affectée par l'exposition à l'Etoposide. Cette étude montre que l'Etoposide est fortement immunotoxique pour *L. stagnalis* et cela questionne quant aux effets d'une exposition sur le long terme.

Mots-clés : étoposide, immunotoxicité, exposition courte, limnée des étangs

Short-term immunotoxic effects of an anti-cancer drug (Etoposide) on the freshwater pondsnail *Lymnaea stagnalis*

P. Boisseaux,[1] M. Gust,[1] S. Betoulle,[2] J. Garric[1]

[1]Laboratory of Ecotoxicology, IRSTEA Lyon-Villeurbanne, Villeurbanne; [2]Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO Stress environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques, Reims, France

Introduction

A growing body of evidences indicates the rise in pharmaceutical contamination of aquatic ecosystems.[1-3] Anti-cancer drugs (AKs) are very special because they may avoid some toxicological studies, clinical trials or environmental toxicity assessments imposed for other pharmaceuticals (EMEA, FDA).[4-6] In parallel, these drugs require high dosage. It generates high amounts of biologically active molecules into hospital effluents and by extension into surface waters. Both parent-compounds and metabolites are being encountered at high concentrations (ng/L to µg/L).[7,8] The original molecules may be generated from the fraction non-metabolized by humans (≅0.40 for etoposide).[8] Eventually, it may be the result of accidental spillages or lack of environmental good practices.

Among AKs, Etoposide is widely used in chemotherapy (total amount consumed in France in 2004 was 332.84 kg).[7] It is prescribed worldwide against lung, testicles and blood cells (lymphoma) cancers in humans.[9,10] This plant-derived alkaloid is an anti-neoplasmic, cytotoxic molecule reported to cause single DNA breaks with topoisomerase II inhibiting effects. It has been detected at concentrations up to 5 µg/L in cancer-specialized hospital effluents.[8]

The pond snail *Lymnaea stagnalis* inhabits lentic freshwater systems and is ecologically relevant in Holarctic regions of the planet (*i.e.* northern hemisphere). This gastropod is currently recommended by OECD for full-lifecycle toxicity testing.[11] Hemocytes are the circulating immunocompetent cells of *Lymnaea stagnalis'* open immune system. Their lymphatic concentration is directly linked to the immune capacity.

Immune response substantially depends on phagocytosis. Immunosuppressive effects can increase its vulnerability to multiple biological stressors (such as pathogen invasions) and impair its population.[12] We aimed at assessing the acute effects of Etoposide on *L. stagnalis'* immune parameters, both at environmentally realistic concentrations and at *therapeutic-like* concentrations.[10]

Materials and Methods

Experimental conditions and chemical exposure

Calibrated laboratory-reared adult pondsnails (30±1 mm shell-length) were acclimated during 24 h in 500 mL beakers filled with clean groundwater. Six replicates of 2 snails (12 snails) were exposed to each condition: one control condition corresponding to clean groundwater, one control supplemented with vehicle solvent (0.1% DMSO used for all the tested concentrations) and four Etoposide concentrations (1, 10, 100 and 1000 µg/L) [Sigma-Aldrich, CAS: 334 19-42-0]. Water was renewed daily under each exposure condition. The lowest concentrations were chosen according to the environmentally-realistic concentrations in hospital effluents (5 µg/L).[8] The highest *therapeutic-like* concentrations were chosen according to cytotoxic effects observed in human plasma concentrations at 0.7-2 µg/mL.[10] Exposure temperature was set at 20°C, constantly recorded and a neon lightning (1000 lux) allowed a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark). Organisms were fed *ad libitum* with ground TetraPhyll® (30 mg/snail). During the test, mortality and water parameters (dissolved oxygen, ammoniac, pH, conductivity) were daily measured. The exposure lasted for three days (72 h).

Hemolymph collection and flow cytometry analysis

Hemolymph samples were collected with a micropipette by gently tickling the snail foot sole. Hemocyte density and viability were immediately measured. Acquisitions were performed on a Guava easyCyte ™ 6-HT multicolor flow cytometer (Merck Millipore) using the GuavaSoft 2.7 software. The *ViaCount module* was used for cell density and viability determination, whereas the *Incyte module* was used for the phagocytosis assessment. Total hemocyte density (THD) and viability were measured using *Viacount reagent*. Briefly, hemolymph was diluted (1:4) with the reagent into 96-well plates (Costar®, sterile, U-bottom, non-treated, polystyrene) and incubated 10 min (in the dark and under slow agitation). In total, 1000 events per sample were acquired. Regarding the phagocytosis, 200 µL of hemolymph collected from each individual were disposed onto a 96-well plate (Greiner® bio one, for cell cultures, sterile, F-bottom, polystyrene). An excess amount of 7.5×10^5 latex microbeads (polyscience YG 2.0 µm latex microsphere) were gently mixed with each sample. Plates were incubated for 24h in the dark under gentle agitation. The supernatant was removed and cells were fixed (PBS containing 0.5% of formaldehyde (v/v) and 0.2% (w/v) of sodium azide). 20,000 events/sample were acquired and read in the *YELLOW* photomultiplicator (583/26 nm). Calculations were performed as follows: *active hemocytes* were the proportion of cells that engulfed at least one microbead, whereas the mean number of microbeads per active hemocytes reflects the *activity of phagocytosis*.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by running a Kruskal-Wallis Test followed by repeated pairwise Wilcoxon post hoc tests when necessary to compare exposed groups with the control group. The result was considered statistically significant when $P<0.05$ (**$P<0.001$ while *$P<0.05$). Beforehand, the Shapiro test for normality distribution and Bartlett test for homogeneity of variances were run for each group. All statistical analysis were realized with the open source R software.[13]

Results and Discussion

At *therapeutic* concentrations (100-1000 µg/L), a sharp drop of total hemocyte density (THD) was observed (Figure 1A). It is consistent with previous studies reporting cytotoxic effects on human blood cells at such concen-

Correspondence: Paul Boisseaux, Laboratory of Ecotoxicology, IRSTEA Lyon-Villeurbanne, 5 rue de la Doua, 69626 Villeurbanne, France.
E-mail: paul.boisseaux@irstea.fr

Key words: etoposide, immunotoxicity, acute exposure, pond snail.

Conference presentation: *ECOBIM meeting*, 2014 May, Brest, France.

Acknowledgements: the region *Rhône-Alpes* grants a PhD fellowship to Paul Boisseaux. This study was supported by the French IMOPHAK project (*Impacts moléculaires, cellulaires et physiologiques de pharmaceutiques anti-cancéreux sur un organisme d'eau douce*).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright P. Boisseaux et al., 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Journal of Xenobiotics 2014; 4:4894
doi:10.4081/xeno.2014.4894

trations.[14] At the environmentally relevant concentrations a significant increase in hemocyte density was observed compared to controls (Figure 1A). Similar results have already been observed in *L. stagnalis* at environmentally realistic concentrations of several xenobiotics.[15-17] Hemocytes viability significantly decreased with increasing drug concentration (Figure 1B). No significant effects were measured on phagocytosis activity. The proportion of active hemocytes is similar under all exposure conditions (approximately 20%, Figure 1C). Phagocytosis activity was around a mean of 2.9 microbeads per hemocyte in all treatments (Figure 1D).

Conclusions

Our study highlights the immune disruptive effects of etoposide on the pond snail *L. stagnalis*. At realistic concentrations found in effluents of oncology-specialized hospitals, it exerts immunomodulation effects, whereas at *therapeutic-like* concentrations the effects become immunosuppressive (cytotoxicity). In addition to this reduced number of hemocytes, a high cellular mortality rate was observed (up to 40%). However, it seems that phagocytosis carried out by the remaining viable cells was unaffected. It indicates that etoposide is rather cytotoxic than blocks phagocytosis pathways. This experimentation constitutes a first acute approach and further studies are required to clarify: i) the underlying mechanism of actions that lead to the observed increase in hemocytes density at low concentrations; ii) the effects of a chronic exposure; and iii) the further consequences on physiological functions such as growth and reproduction.

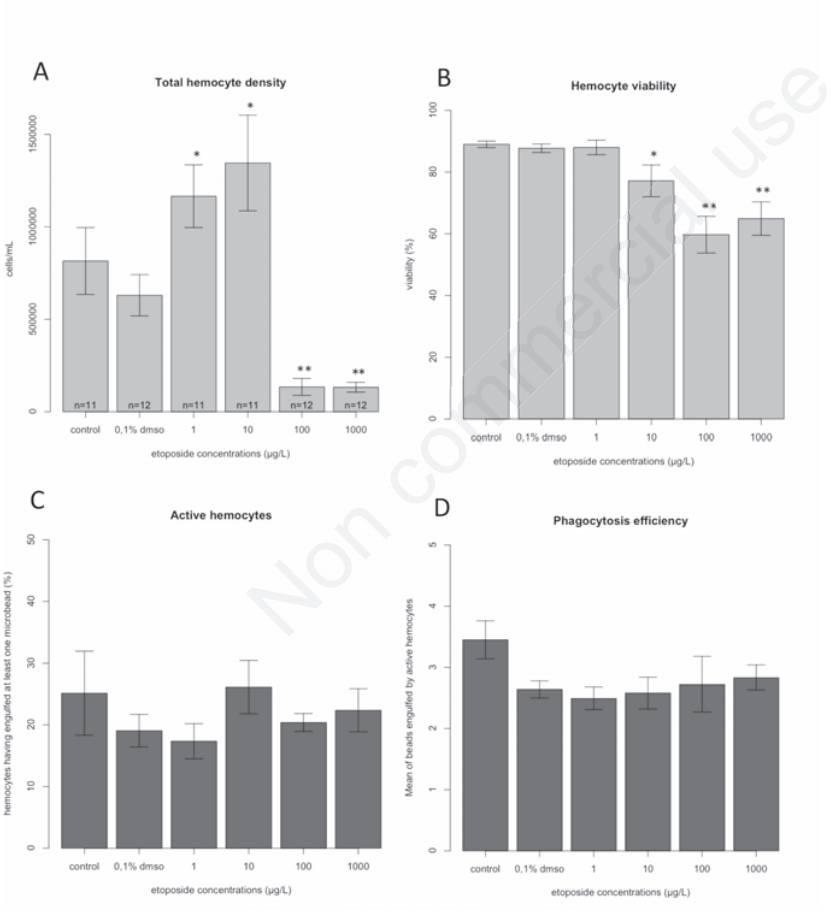


Figure 1. Effects of etoposide on immunocompetence of *L. stagnalis*. Snails were exposed to increasing concentrations of etoposide (1-1000 µg/L) for 72 h in glass beaker replicates with daily renewals. Afterwards, the hemolymph was collected individually and analyzed for determination of hemocyte concentrations (A), hemocytes viability (B), active phagocytes (C) and efficiency of phagocytosis (D). The barplots and error bars represent the mean and standard error of the mean (SEM) of respective replicates per conditions. The number of snails per condition is indicated at the bottom of the barplots (A); differences correspond to snails that died during the experiment.

References

1. Kummerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. J Environ Manage 2009;90:2354-66.
2. Christensen FM. Pharmaceuticals in the environment - a human risk? Regul Toxicol Pharmacol 1998;28:212-21.
3. Matozzo V. Effects of pharmaceuticals on immune parameters of aquatic invertebrates. ISJ 2014 [In press].
4. Dagher R, Johnson J, Williams G, Keegan P, Pazdur R. Accelerated approval of oncology products: a decade of experience. J Natl Cancer Inst 2004;96:1500-9.
5. Hartmann M, Mayer-Nicolai C, Pfaff O. Approval probabilities and regulatory review patterns for anticancer drugs in the European Union. Crit Rev Oncol Hematol 2013;87:112-21.
6. Apolone G, Joppi R, Bertele V, Garattini S. Ten years of marketing approvals of anticancer drugs in Europe: regulatory policy and guidance documents need to find a balance between different pressures. Br J Cancer 2005;93:504-9.
7. Besse JP, Latour JF, Garric J. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? Environ Int 2012;39:73-86.
8. Catastini C, Mullot J-U, Boukari S, Mazellier P, Levi Y, Cervantes P, et al. Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals (Identification de molécules anticancéreuses dans les effluents hospitaliers). J Eur Hydro 2008; 39:80-171.
9. Cancer Care Ontario. Etoposide monograph; 2013. Available from: https://www.cancercare.on.ca/
10. Hande KR PJW, Noone RM, Wilkinson GR, Greco FA, Wolff SN. Pharmacokinetics of high-dose etoposide (VP-16-213) administered to cancer patients. Cancer Res 1984;44:379-82.
11. OECD DRPDoML-CTT, in OECD Series on Testing and Assessment No. 121. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2010. p 182.
12. Galloway T, Depledge M. Immunotoxicity

Non commercial use only

in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology 2001;10: 5-23.
13. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014. Available from: http://www.R-project.org/
14. Wozniak AJ, Ross WE. DNA Damage as a basis for 4'-Demethylepipodophyllotoxin-9-(4,6-O-ethylidene-β-d-glucopyranoside) (etoposide) cytotoxicity. Cancer Res 1983;43:120-4.
15. Russo J, Madec L, Brehélin M. Haemocyte lysosomal fragility facing an environmental reality: a toxicological perspective with atrazine and Lymnaea stagnalis (Gastropoda, Pulmonata) as a test case. Ecotoxicol Environ Saf 2009;72:1719-26.
16. Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagne F. Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail Lymnaea stagnalis. Sci Total Environ 2013;445-446:210-8.
17. Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagne F. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail Lymnaea stagnalis. Aquat Toxicol 2013;126:393-403.

Non commercial use only

4.3 Article 5 : Réponses immunitaires chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* après une courte exposition à des produits pharmaceutiques préoccupants pour les systèmes immunitaires : Diclofenac, Cyclophosphamide et Cyclosporine A

(accepté à *Ecotoxicology and Environmental Safety*, en cours de révisions)

Type : *full-length article*

Résumé

Introduction et objectifs : Les produits pharmaceutiques *Diclofenac* (anti-inflammatoire non stéroïdien), *Cyclophosphamide* (médicament anti-cancéreux aux propriétés immunosuppressives) et *Cyclosporine A* (médicament aux propriétés immunosuppressives qui est utilisé contre le rejet de greffes) sont des molécules qui interagissent spécifiquement avec le système immunitaire des mammifères (e.g., rongeurs et Homme). Cette étude vise à évaluer si ces médicaments — qui constituent des xénobiotiques retrouvés dans les rivières — peuvent interagir avec le système immunitaire du gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* et impacter son immunocompétence lors d'une courte exposition.

Matériel et méthodes : *Lymnaea stagnalis* a été exposée au laboratoire à chacun des trois produits pharmaceutiques mentionnés (séparément) pendant trois jours. Les organismes ont été exposés à des concentrations environnementalement réalistes (1 — 10 $\mu g.L^{-1}$) et des concentrations dites thérapeutiques (100 — 1000 $\mu g.L^{-1}$) dans des aquariums en conditions statiques (N=24 limnées/condition). La concentration des médicaments a été mesurée après les trois jours d'exposition afin de valider les ordres de grandeur des concentrations réelles d'exposition après trois jours.

Plusieurs marqueurs d'immunocompétence ont été mesurés. La densité et viabilité hémocytaire ont été mesurées lors de la collecte des organismes (provenant d'élevages) juste avant leur acclimatation dans leurs aquariums respectifs afin de connaitre les niveaux basaux individuels. Après les trois jours d'exposition aux contaminants, plusieurs marqueurs d'immunocompétence ont été mesurés : la densité et la viabilité hémocytaire, la capacité de phagocytose et l'activité oxydative immunocompétente des hémocytes.

Résultats Les concentrations mesurées des médicaments étaient dans les ordres de grandeurs attendus, à l'exception du diclofenac aux concentrations environnementales où les concentrations étaient plus faibles. Des incertitudes résident dans l'analyse des échantillons (congélation/décongélation, cassure des bouteilles lors de la décongélation) et la possible photodégradation.

Comme attendu, le Diclofenac et la Cyclosporine A ont induit des réponses immunitaires significatives, bien que les effets n'étaient pas fortement marqués. En revanche, le Cyclophosphamide n'a pas induit d'effet détectable sur les marqueurs immunitaires mesurés. Après les trois jours d'exposition, les organismes exposés au Diclofenac avaient une densité hémocytaire, une viabilité hémocytaire et une activité de phagocytose plus élevées que les témoins. Une diminution significative de la viabilité hémocytaire a été induite par la Cyclosporine A à une concentration de 1000 $\mu g.L^{-1}$.

Discussion et Conclusion : Les immunomodulations subtiles interrogent quant à leurs effets lors d'une exposition de longue durée qui pourrait déclencher des phénomènes de *trade-offs* entre des traits d'histoire de vie. Par ailleurs, le fait que le pro-médicament anti-cancéreux *Cyclophosphamide* n'ait pas impacté les marqueurs d'immunocompétence nous rappelle qu'il serait nécessaire d'inclure des métabolites pertinents dans l'évaluation du danger toxique/immunotoxique des médicaments envers des espèces non-cibles. Le métabolisme de *L. stagnalis* est largement différent de celui des vertébrés. Enfin, un possible effet additif entre médicaments aux modes d'action ou aux propriétés (effets biologiques) similaires doit également être considéré pour de futures évaluations d'effets immunotoxiques de médicaments sur les gastéropodes.

Mots-clés : gastéropode, médicament, diclofenac, cyclophosphamide, cyclosporine A, immunotoxicité

Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A

Paul Boisseaux[a], Patrice Noury[a], Hélène Thomas-Guyon[b], Jeanne Garric[a]

[a] *Irstea Centre de Lyon-Villeurbanne, Laboratoire d'Écotoxicologie, MAEP, 5 rue de la Doua, 69626 VILLEURBANNE (France)*
[b] *LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle*

Abstract

This is a pioneering study in the ecotoxicological assessment of immunotoxic effects of the three selected drugs of concern to a freshwater gastropod species. *Lymnaea stagnalis* was exposed in the laboratory for 3 days to three drugs used for immune systems: diclofenac (nonsteroidal anti-inflammatory drug), cyclophosphamide (anti-cancer immunosuppressive drug) or cyclosporine A (anti-xenograft immunosuppressive drug). Exposure ranges included environmental realistic (1–10 $\mu g.L^{-1}$) and therapeutic concentrations (100–1000 $\mu g.L^{-1}$). At the end of exposure times, the immune parameters of individual snails were measured: hemocyte density and viability, hemocyte phagocytosis capacity and hemocyte-related oxidative activities (basal and NADPH-oxidase stimulated with zymosan particles). Diclofenac and cyclosporine A induced immune responses, although the effects were not strong. No immunosuppression was observed. Such subtle immunomodulations bring further interrogations regarding their long-term immunotoxicity and possible resulting tradeoffs with life-history traits. On the other hand, the prodrug cyclophosphamide did not induce significant immune responses. Since metabolism pathways differ greatly between vertebrates and invertebrates, this study also suggests that relevant vertebrate metabolites should be included in the immunotoxicity assessment of pharmaceuticals in non-target invertebrate species. Finally, the possible interactive effects of these pharmaceuticals sharing similar modes of action or effects features should also be explored.

Keywords: gastropod, pharmaceuticals, diclofenac, cyclophosphamide, cyclosporine A, immunotoxicity

Abbreviations [1]

1. Introduction

The increase of pharmaceuticals in aquatic environments is a concern to wildlife. They may provoke adverse effects on multiple physiological functions, including the immune system, which is of major importance since organisms constantly face threats from infectious agents (*i.e.*, parasites, bacteria and viruses). In mollusks, circulating immunocompetent cells are

[1] CAS number (Chemical abstract service registry number); CP (Cylophosphamide); CSA (Cyclosporine A) ; DC (Diclofenac); DMSO (Dimethyl sulfoxide); LMEM (linear mixed-effect model); MoA (Mode of action) ; ROS (reactive oxygen species); SM (supplementary material)

called hemocytes, which are involved in a myriad of functions – other than immune – such as wound healing, shell repair and nutrient transport (Sminia et al. 1973, Cheng 1984, T. Suzuki et al. 1991, Franchini and Ottaviani 2000, Li et al. 2016). Therefore, if hemocytes are impaired, snails' general health will likely be impacted and they will be vulnerable to contracting infectious diseases with possible effects on populations.

The freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* is found throughout lentic systems such as ponds, lakes and low water-flow rivers in most countries of Holarctic regions (IUCN website 2017). *L. stagnalis*, also called the great pond snail, is one of the largest gastropod species in freshwaters. It can live up to 1–3 years in natural environments and feeds mainly on macrophytes, periphyton and detritus. *L. stagnalis* is at the interface of sediments and the surface of waters where they breathe via their pneumostome. This is a sentinel species of chemical pressure and can be bred in the laboratory for ecotoxicological studies. Compared to several crustaceans (*e.g.*, Daphnia magna, Hyallela azteca), mollusk species are, generally speaking, less sensitive to toxic insults. However, the sensitivity of a species is contaminant-dependent. From this viewpoint, it is important to assess the impact of pharmaceuticals on species that are representative of the most widely encountered phylum in their ecosystem (Balian et al. 2008). In most freshwater ecosystems, mollusks are the third largest phylum and may comprise up to 80% of invertebrate biomass in some lentic systems. Last, mollusks are the most endangered phylum and are threatened by extinction (Lydeard et al. 2004).

L. stagnalis has an open-like immune system. The hemolymph can be collected repeatedly at an individual level with relatively high confidence that the method has a non-detrimental effect (Boisseaux et al. 2016). These features promote *L. stagnalis* as a promising model in environmental immunotoxicology.

Today, diclofenac (DC) is included on the 2015/495/EU-Watch list of substances for EU-wide monitoring (Barbosa et al. 2016). It is prescribed worldwide for humans and veterinary purposes. It belongs to the pharmaceutical class of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and has analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. Human therapeutic plasma levels range from approximately 400 up to 2000 $\mu g.L^{-1}$ (Juhlin et al. 2004, Cuklev et al. 2011). Diclofenac is thought to act mainly by inhibition of prostaglandin synthesis (cyclooxygenase-1 and 2), but many other modes of action (MoAs) are currently under consideration (Gan 2010). Ecotoxic effects include physiological disorders, e.g., in the blue mussel (Ericson et al. 2010), genotoxicity in plants (Feito et al. 2012), fish hepatotoxicity (Triebskorn et al. 2004, Islas-Flores et al. 2013), hepatic gene expression modifications (Cuklev et al. 2011) and reprotoxicity (Lee et al. 2011). Inflammatory responses following DC exposure have been observed in Salmona trutta (Hoeger et al. 2005, Segner et al. 2012). With a logKow (octanol-water partition coefficient) of 4.51 (Avdeef et al. 1998), this drug has been reported to be highly bioaccumulated in animals, for example in fishes (Mehinto et al. 2010) and bivalves (Daniele et al. 2016). DC is thought to be the cause of population decline in certain birds (Oaks et al. 2004) and many birds are predators of *L. stagnalis*. In water, DC has been measured in the $\mu g.L^{-1}$ range in wastewater

treatment plant effluents (Tixier et al. 2003, Zhang et al. 2008).

Anti-cancer drugs can provoke strong adverse effects (*i.e.*, they are very invasive), most are genotoxic, mutagenic and/or reprotoxic. They require high doses for therapeutic efficacy. Their market approval process can be accelerated (*i.e.*, justified by the therapeutic risk–benefit ratio) (Dagher et al. 2004, Johnson et al. 2011, Hartmann et al. 2013) and there are considerable financial stakes in their production (Howard et al. 2015). In a previous study investigating the effects of an anti-cancer drug, Etoposide, we observed a drop of hemocyte density and a decrease of cell viability in the pond snail (*L. stagnalis*) exposed to therapeutic concentrations (100 and 1000 $\mu g.L^{-1}$) for 3 days (Boisseaux et al. 2014). To our knowledge, the toxicity of cyclophosphamide (CP) to *L. stagnalis* has never been investigated until now. CP is an anti-cancer drug that is carcinogenic to humans (group 1 classification of the International Agency for Research on Cancer). This molecule is used worldwide for treating ovarian cancer, breast cancer, lung cancer and cases of neuroblastoma and lymphoma. CP is categorized as a cytotoxic molecule and belongs to alkylating agents. Its main MoA is to add the alkyl group to DNA and thereby block DNA replication. CP is a well-known immunosuppressor in mammals (Winkelstein 1973, Hahn et al. 1975, Gonsette et al. 1977, Kanzler et al. 1997, Martin-Suarez et al. 1997). Peak blood concentrations in patients range from 0.4 to 19 $\mu g.mL^{-1}$ (Juma et al. 1979, Rustum and Hoffman 1987, Rezvani et al. 2013). The parent compound and metabolites are released in surface waters. High concentrations in hospital effluents have been reported in the $\mu g.L^{-1}$ range (Besse et al. 2012). However, concentrations in WWTP effluents and surface waters are often in the $ng.L^{-1}$ range (Buerge et al. 2006), which remains a concern.

Cyclosporine A (CSA) was chosen mainly because of its known effects and therefore its therapeutic uses. It is an immunosuppressor agent in humans used following organ transplantation to prevent rejection. The MoAs involve inhibition of (i) the immune-cell receptor signal transduction pathway via the inhibition of calcineurin (protein phosphatase 2B), (ii) nitric oxide production (stimulated by lipopolysaccharides, TNFα and interleukin-1α) and (iii) cytochrome c release from mitochondria (Waters et al. 2005, Kuper et al. 2007). CSA is a well-known drug model for immunosuppressive effects in mammals (Schuurman et al. 1994, Dewaal et al. 1995, Crevel et al. 1997, Langezaal et al. 2001, Schulte et al. 2002, Auli et al. 2012). Peak blood concentrations in patients range from 50 to 1300 $\mu g.L^{-1}$ (Sawchuk and Cartier 1981, Moyer et al. 1988, Caruso et al. 2001, Grote-Koska et al. 2014). Therefore, we thought it relevant to investigate the potential immunotoxicity of CSA in a non-target species, even though we found no studies stating the environmental concerns of this molecule.

Wildlife organisms face both (i) chronic pharmaceutical pressures in the $\mu g.L^{-1}$ range (Kümmerer 2009) and (ii) transient peaks possibly in the 500–1000 $\mu g.L^{-1}$ range in the worst-case scenario. The aim of the study was to assess immune responses in the non-target species *L. stagnalis* following short-term exposure to pharmaceuticals potentially harmful to immune systems and to select the pharmaceutical inducing the strongest immune effects for a further long-term ecotoxicological study. High concentrations from 1000 $\mu g.L^{-1}$ down to 1 $\mu g.L^{-1}$ were used to assess a dose-dependent response pattern. *L. stagnalis* was exposed to each of the pharma-

ceuticals – diclofenac (DC), cyclosporine A (CSA) and cyclophosphamide (CP) – from environmentally realistic to therapeutic concentrations. Immunocapacity (*i.e.*, non-functional parameters) was defined as the individual hemocyte density and viability. Immunoefficiency (*i.e.*, functional parameters) was defined as the phagocytosis capacity and the NADPH-oxidative activity.

2. Material and methods

2.1. Snails and pharmaceutical exposures

Three independent experiments were carried out for each of the three pharmaceuticals (*i.e.*, not mixtures). A total number of 144, 144 and 120 calibrated adult snails (30 mm ± 2 shell-lengths) were selected from the breeding stock of our laboratory for the DC, CSA and CP experiments, respectively. Snails were bred in flow-through systems with clean groundwater pumped in an aquiferous system beneath our laboratory (photoperiod of 16 h/8 h of light/dark cycles, water temperature at 20±1˚C, feeding with TetraPhyll *ad libitum*). They were individualized by marking an identification number on the top of their shell using a permanent ink marker.

For each pharmaceutical, four concentrations were tested: 1, 10, 100 and 1000 $\mu g.L^{-1}$ by reference to nominal concentrations. Environmental realistic concentrations were represented by 1 and 10 $\mu g.L^{-1}$, while therapeutic concentrations by 100 and 1000 $\mu g.L^{-1}$ (see human blood peak concentrations of molecules and also their environmental concentrations in the introduction). For all exposures, clean groundwater pumped beneath our laboratory and used for rearing the snails was used to set up control conditions (see Table S1 in supplementary materials (SM)). A carrier solvent control was also included for the CSA experimentation (DMSO at 0.01% used for all CSA exposures). Seppälä and Jokela (2010) previously observed that starvation can affect immune parameters in *L. stagnalis*. Since the organisms were not fed during drug exposures, an additional control consisting in adding organic salad *ad libitum* was included for the DC experiment (the first pharmaceutical tested).

The organisms were exposed to pharmaceuticals for 3 complete days in static conditions. Each exposure condition had three replicates. Each replicate consisted in a 15-L glass-aquaria filled with 5 L of exposure medium in which eight snails were introduced (*i.e.*, 24 snails per concentration). Aquaria were kept in water-baths set at 20±1˚C. The photoperiod was set at 16 h/8 h of light/dark cycles. Luminosity was approximately 1000 lux, 50 and 50 lux for the DC, CP and CSA. CP and CSA are likely to be light-sensitive since the manufacturer recommends storing them protected from light.

Three days before adding the pharmaceuticals, the snails were randomly assigned to an aquarium. A short 3-day acclimation period was imposed for all organisms before adding exposure solutions. They were fed organic salad *ad libitum* during acclimation only, while during pharmaceutical exposures they were not, except for the "salad controls" included in the DC experiment. At day 0 of exposure, groundwater from each aquarium was removed and fresh pharmaceutical exposure conditions as mentioned above were set up. Note that no salad controls were set up in CP and CSA experiments because (i) the insufficient supply of snails and (ii) no statistically significant differences were found between water controls and salad controls in the DC experiment regarding the immunomarkers and snail survival.

For DC (diclofenac sodium, Sigma, CAS 15307-79-6), a stock solution at 100 $mg.L^{-1}$ was first prepared by dissolving the compound in groundwater test medium

and then the test solutions were sequentially diluted from this stock. Similar procedures were performed for CP (cyclophosphamide monohydrate, Sigma, CAS 6055-19-2). For CSA (cyclosporine A, Sigma, CAS 59865-13-3), an initial CSA stock solution was prepared in DMSO at 10 $\mu g.mL^{-1}$. Then, the 1:10 000 ratio (*i.e.*, 0.01% DMSO) was applied for all final exposure media. The water quality (conductivity, pH, dissolved oxygen, ammonium cation and nitrite anion) was measured every day in one random replicate of each condition.

2.2. Immunomarkers assessment

Acclimation. Immunocapacity (hemocyte density and viability) was measured at day -3 (at the beginning of the acclimation period, 3 days before drug exposure) to determine the basal levels from the breeding stock. At day 3 (after 3 days of drug exposure), immunocapacity was measured as well as immunoefficiency (hemocyte phagocytosis capacity and oxidative activities).

Hemolymph collection. The hemolymph was collected as described by Sminia (1972). By tickling the foot sole of the snail, it retracts into its shell and extrudes hemolymph through the hemal pore. The hemolymph was collected with a micropipette (approximately 500 μl per snail) into 500-μl skirted-polypropylene tubes (Dutscher, Dumath, Issy-les-Moulineaux, France).

Flow cytometry. Flow cytometry was used to quantify hemocyte density, hemocyte viability and hemocyte phagocytosis capacity. The Guava easyCyte^{TM} 6-HT apparatus (Millipore^{TM}) was used. Every acquisition was run with the Incyte module from the GuavaSoft 2.7 software at a flow rate of 0.59 $\mu l.s^{-1}$. Note that the accuracy of counts was regularly verified using the manufacturer's calibration protocol (Guava easyCheck Kit, Hayward, CA, USA).

The hemocyte density and viability. The hemocyte density and viability were determined as described in Boisseaux et al. (2016). Briefly, the cells were first gated by size and granulometry and 5000 events were acquired in this gate for cell density, 2500 events for cell viability. For cell viability, 50 000 hemocytes per well of a 96-well plate (Greiner, polystyrene, U-bottom) were adjusted and then 2 μl of propidium iodide (1 $mg.ml^{-1}$) were added for discrimination of dead cells (5000 events per sample).

The phagocytosis capacity. The phagocytosis capacity corresponds to the ability of hemocytes to engulf and internalize microbes in order to destroy them (i.e., intracellular phagosomes). This activity is important for the efficiency of the animal's immune system. It was artificially measured as the capacity of hemocytes to mechanically engulf latex microbeads over 18 h of in vitro exposure. To this aim, a volume of 200 μL of hemolymph were added per well. Samples were diluted using SSB (snail saline buffer; see Russo et al. (2007)), pre-warmed at room temperature, in a 96-well plate (Greiner® bio one, for cell cultures, sterile, F-bottom, polystyrene). Then, an excess amount of $7.2.10^5$ fluorescent microbeads (polyscience YG 2.0 μm latex microsphere) were gently mixed with each sample, which corresponds to a hemocyte-to-bead ratio of 1:7 for 100 000 hemocytes. Plates were shielded from light and slowly agitated for 18 h. Then the supernatant was removed and the cells were fixed (SSB containing 0.5% formaldehyde (v/v) and 0.2% (w/v) sodium azide). A total of 15 000 events were acquired and read in the YELLOW photomultiplicator (583/26 nm). The

phagocytosis capacity was calculated as the percentage of hemocytes that engulfed at least one microbead among the gate on the hemocyte population.

The oxidative activity. The oxidative activity of hemocytes was assessed both in basal and stimulated status. The basal activity corresponds to the generation of ROS through cell machinery metabolism (*e.g.*, mitochondria, peroxisomes, etc.). The stimulated oxidative activity corresponds to the immunocompetent enzymatic complex, likely NADPH (Adema et al. 1993) involved in pathogen destruction and so it is an important indicator of immunocompetence. A volume of 25 μl per animal was gently deposited onto a 96-well plate (Greiner, polystyrene, flat bottom) in duplicate for both the basal and the zymosan-stimulated oxidative activity. Plates were centrifuged (100 g, 20 min), the lymph was removed and replaced by snail saline buffer (SSB) (adjustments at 200 $\mu l.well^{-1}$). The activity was stimulated by adding zymosan (Sigma Z4250, 250 mg) at 125 $\mu g.well^{-1}$. ROS generation was detected by adding the fluorescent probe H_2DCFDA (Sigma, France) at 80 μM. Measurements were taken with a spectrofluorimeter (TECAN, Safire) every 2 min for 1 h with EX/EM 480/530-nm wavelength settings. First, the raw fluorescence units were converted into the amount of fluorescent product dichlorofluorescein (DCF) resulting from the reaction of ROS with the H_2DCFDA probe. Second, the slope between 20 and 40 min of kinetics was calculated and normalized by the volume of hemolymph.

2.3. Chemical analysis

At the end of exposures, chemical analysis was performed to validate the ranges of exposure concentrations. For each experiment, the chemicals were quantified in water samples for which nominal drug concentrations were 10 and 1000 $\mu g.L^{-1}$. Water was sampled in 1-L Pyrex bottles (approximately 500 mL of water). Bottles were shielded from light to prevent further photodegradation and were placed at -20°C until chemical analysis. Analyses were performed using liquid chromatography (H-Class Waters apparatus) coupled with tandem mass spectrometry (Xevo-TQ-S Waters apparatus) (*i.e.*, LC MS/MS). Target compounds were determined with their multiple reaction monitoring (MRM) transitions (*i.e.*, transitions of mass-to-charge ratio m/z) using electrospray in positive mode as well as their chromatographic retention time and their ratio of transitions (see Table 1). The mobile phase in the column (Agilent, Poroshell, 120SB-C8, 2.1 x 50 mm; 2.7 μm) was first (A) milliQ water supplemented with 0.01% acetic acid and second (B) with acetonitrile. A gradient was applied from 90/10 of A/B to 100% of B within 3 min followed by 2 min of 100% B. The flow was set at 0.6 $ml.min^{-1}$ and the temperature at 60°C. For the mass spectrometer, the capillary tension was set at 3.2 kV, the desolvation temperature at 450°C and the desolvation flow at 900 $L.h^{-1}$. Detection and quantification limits ($ng.ml^{-1}$) were 0.3/0.3, 0.01/0.025 and 1/1.5 for DC, CP and CSA, respectively.

2.4. Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the R software (Team 2016). The graphs were made with the ggplot2 package (Wickham 2009). The survival analysis was performed with the survival package (Therneau 2015) after pooling all organisms from each exposure condition. Data were right-censored (because full mortality rates were not observed). The logrank test was run to enquire about statistically signif-

icant differences in survival among exposure conditions.

For hemocyte density and viability analysis, linear mixed-effect models (LMEMs) were fitted using the lmer function from the lme4 package (Bates et al. 2015) to test the effect of drug exposure over time and take into account random snail and aquarium effects. They were first built with the day as the fixed factor, an interaction term of the day with the condition and two nested random factors, the snail and the replicate (aquarium). The impact of the exposure condition was only considered as an interaction term with the day, because no impact of the future exposure condition can occur at the beginning of the acclimation period (*i.e.*, day -3), but an effect of the condition over time (*i.e.*, interaction of respective effects). Note that beforehand, a logit transformation was applied to proportions of viable hemocytes to normalize the distributions.

For oxidative activity analysis, a log10 transformation was applied to normalize the data. LMEMs were first built with two fixed factors, the "zymosan" and the "exposure condition", and one random factor, the "replicate" (aquarium). The interaction between the exposure condition and the zymosan was included in the initial models.

For phagocytosis capacity, a logit transformation was applied to the phagocytosis capacity in order to normalize the distributions. LMEMs were first built with one fixed factor, the exposure condition, and one random factor, the replicate.

For interpretations of LMEMs, the homoscedasticity of residuals and normality of distributions of residuals and the random effects of all LMEMs were visually verified using plots of residuals and quantile-quantile plots of residuals and random effects (Fig. S4 and S5 in SM). Each model mentioned above was simplified by removing the effects that did not appear significant. An effect was considered statistically significant when the 95% confidence interval (CI) of its coefficient did not contain 0 (t-value > |2|).

3. Results

3.1. Chemical analysis

The results of chemical measurements are presented in Table 2. For the highest therapeutic concentrations (*i.e.*, 1000 $\mu g.L^{-1}$), the ranges of measured concentrations were consistent with the nominal concentrations for all pharmaceuticals. For the highest environmentally relevant concentration (*i.e.*, 10 $\mu g.L^{-1}$), the ranges of measured concentrations were consistent with nominal concentrations for CP and CSA. However, concentrations were lower than expected for DC at the highest environmentally relevant concentration. After 3 days of exposure, only 0.45 $\mu g.L^{-1}$ was recovered instead of 10 $\mu g.L^{-1}$. This was the only experiment for which luminosity was high (approximately 1000 lux). Buser et al. (1998) reported that diclofenac can be rapidly photodegraded and this may partly explain the results since a photoperiod of 16 h/8 h of light/dark cycle was set up with approximately 800–1000 lux in light intensity for the DC experiment (less than 100 lux for CP and CSA). It should be noted that problems of glass bottle breakage at defreezing occurred and so the data interpretation was not straightforward.

3.2. Survival

In all the experiments, the survival rate of snails from each exposure condition was higher than 80% at day 3

Table 1: Chemical measurements for verification of ranges of concentration exposures

pharmaceutical	Nominal concentration at starting exposure (t=0) ($\mu g.L^{-1}$)	Measured concentration of the water sample collected at t=3 days of exposure ($\mu g.L^{-1}$)
Diclofenac	10	0.45 (n=4)
	1000	890.5 (n=2)
Cyclophosphamide	10	13.2 (n=1)
	1000	866.5 (n=2)
Cyclosporine A	10	24.2 (n=1)
	1000	912 (n=2)

The results are presented as the mean of measurements taken in one true replicate of water sample (n = number of repeated analytical measures per water sample). A total of six different water samples were analyzed. At defreezing, the bottles broke and the content was recovered for further analysis. For the CSA, measures were not repeatable when the standard curve was realized and so interpretation is not straightforward. The fact that more product appeared at the day 3 (measured concentration) compared to the nominal concentration in the left column could be a problem of repeatability and/or molecule fate when recovering samples. The results show that pharmaceutical concentrations at day 3 were within the expected range of concentration at day 0, except for DC 10 (see results for further comments).

compared to the rates at day 0 (see Fig. S1 in SM). The logrank test did not suggest significant differences between conditions.

3.3. Immunocapacity

For hemocyte density in the DC experiment, a statistically significant interaction (LMEMs) was suggested between the day and the conditions DC 10, DC 100 and DC 1000 compared to the controls. These controls consist in the salad controls and water controls merged together in a single control group since no statistically significant effects were found between them with LMEMs. At day 3, the DC 10, 100 and 1000 conditions significantly increased the hemocyte density compared to this merged group of controls (Fig. 1A). However, a significant day effect was suggested. A substantial decrease in hemocyte density occurred between day -3 and day 3 for the controls and DC 1 conditions. Hence, at day 3 and at DC 10, DC 100 and DC 1000, the drop in hemocyte density observed in controls and DC 1 was reverted up to basal levels observed at day -3. Water controls and salad controls were not significantly different and so we assumed starvation was a negligible factor on this endpoint in the context of the particular experimental conditions used in the present study. For hemocyte viability, no statistically significant effects of DC were detected (Fig. 1D). However, the t-values for the interaction of the day with DC 10 and DC 100 were 1.7 and 1.6, respectively. This is above statistical significance but very close and therefore a tendency toward an increase in hemocyte viability due to DC can be suspected.

For the CP experiment, no significant effect of the pharmaceutical was suggested by LMEMs, for neither hemocyte density nor hemocyte viability (Fig. 1B and E). However, a significant increase in hemocyte density and a significant decrease in hemocyte viability were observed. These "day effects" were statistically significant, although they were all independent of the exposure conditions and so no CP effect was detected. Hemocyte viability for CP 1000 seemed slightly lower than other exposure conditions, but no statistically significant differences were suggested by LMEMs.

For the CSA experiment, the hemocyte density was very stable between conditions and days (Fig. 1C). No significant differences were detected between water controls and DMSO controls. The only statistically significant effect was detected for the CSA 1000 condition (Fig. 1F), corresponding to a decrease in hemocyte viability compared to water controls. No other significant effects of the day or exposure conditions were evidenced by LMEMs. The graphs with logit-transformed values are presented in Fig. S6 (SM).

3.4. Immunoefficiency

The phagocytosis capacity is presented in Figure 2. No strong effect of pharmaceutical exposures was observed. A slight increase was depicted for DC exposures, statistically significant only for DC 100. Therefore, at this concentration, DC stimulated the capacity of hemocytes to carry out phagocytosis (Fig. 2A). For all other exposure conditions in the CP and CSA experiments (Fig. 2B and C), differences could not be statistically attributed to the presence of pharmaceuticals.

The oxidative activities of hemocytes are presented in Figure 3. The addition of zymosan particles succeeded in stimulating the oxidative activity in all experiments. DC increased the NADPH-oxidase activity (*i.e.*, zymosan-stimulated ROS production), notably for

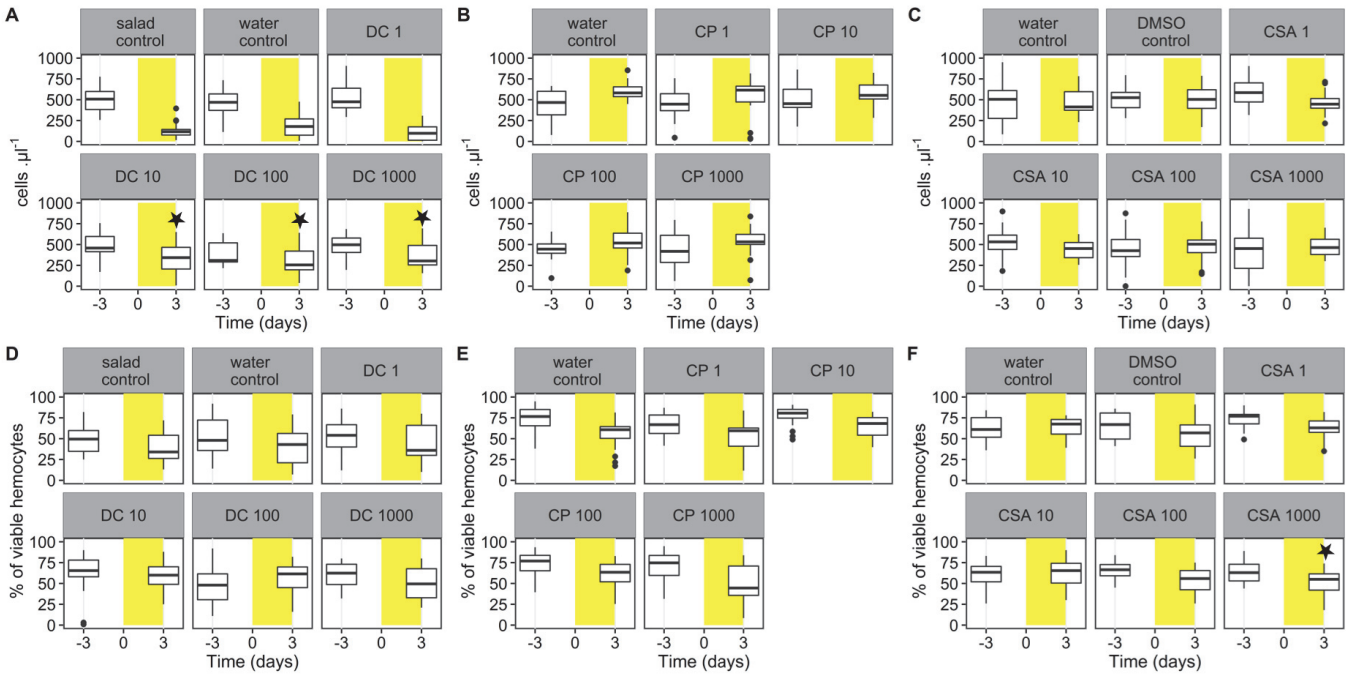


Figure 1: Immunocapacity (hemocyte density and viability) of snails

Graphs A, B and C represent the hemocyte density in the diclofenac (DC), cyclophosphamide (CP) and cyclosporine A (CSA) experiments, respectively. Graphs D, E and F represent the hemocyte viability in the respective experiments. Each biomarker was assessed 3 days before and 3 days after exposures. On each plot, the white part corresponds to the acclimation period, while the yellow part corresponds to the exposure period. The numbers in head titles stand for the nominal concentrations of the pharmaceutical exposures expressed in $\mu g.L^{-1}$. Stars indicate statistically significant differences with controls (see results and SM for details).

the 1000 $\mu g.L^{-1}$ condition (Fig. 3A). CP as well as CSA decreased the NADPH-oxidase activity (Fig. 3B and C). Nevertheless, no statistically significant effect of the respective pharmaceuticals on the basal or stimulated oxidative activities was detected (t-values < |2|).

4. Discussion

Gust et al. (2013) previously studied the effect of pharmaceutical mixtures (other classes of therapeutic uses than those studied herein) at realistic environmental concentrations and found immune responses in *L. stagnalis* following short-term (3-day) exposure. The present results were somewhat surprising since strong adverse effects were expected at therapeutic concentrations, which were chosen as realistic peak plasma concentrations in humans undergoing treatment. Therefore, these concentrations may well be overdosed for gastropods, even if they reflect external exposure instead of drug concentrations in *L. stagnalis* hemolymph. To date and to our knowledge, no studies have measured pharmaceutical concentrations in circulating hemolymph of aquatic molluscan species.

DC significantly impacted the immunocapacity and immunoefficiency of the snails' hemocytes. This effect is typical of an inflammatory response since most of the markers were enhanced by DC compared to controls. However, an unexpected drop in the inflammatory response in controls was observed at day 3 (second collection) during this experiment, which cannot be attributed to starvation. DC exposures allowed maintaining the immunocapacity of snails between day -3 and day 3. This means that DC likely induced significant immune responses in *L. stagnalis*, which blocked the drop we observed in control organisms. In natural environments, such inflammatory responses under chronic exposure can lead to detrimental effects for the species. It is well known that immunity is a highly energy-demanding process, so important trade-offs can be expected over the long-term (Lochmiller and Deerenberg 2000, Okin and Medzhitov 2012). When artificially modulated, immunity can act as a double-edged sword (Graham et al. 2005). This is one of the problems with pharmaceuticals in the environment because most drugs are designed for beneficial therapeutic effects but at the same time exert adverse effects. It can be noted that the DC-induced immune effects observed in *L. stagnalis* contrast with those experienced by humans (anti-inflammatory). Similar paradoxes can be observed for other classes of compounds, such as the carcinogenicity of anticancer drugs.

In the freshwater zebra mussel, a multi-biomarker ecotoxicological study has reported that GST-S-transferase (from visceral mass) was substantially increased after 96 h of DC injections (Quinn et al. 2011). Similarly, lipid peroxidation and metallothionein activity were increased, although to a lesser extent. Another investigation reported a significant decrease in the lysosomal stability in the hemocytes of zebra mussels following 96 h of DC exposure at environmentally relevant concentrations (Parolini et al. 2011). However, no statistical significance was found regarding their apoptotic rate, viability status or DNA damage, leading the authors to conclude that cyto-genotoxicity of DC was, overall, negligible to Dreissena polymorpha hemocytes. Similarly, we found no remarkable cytotoxicity or impaired enzymatic functioning (NADPH-oxidase activity) in hemocytes. Since all these studies were conducted for a short exposure time, it would be very valuable to investigate the chronic immune effects of DC

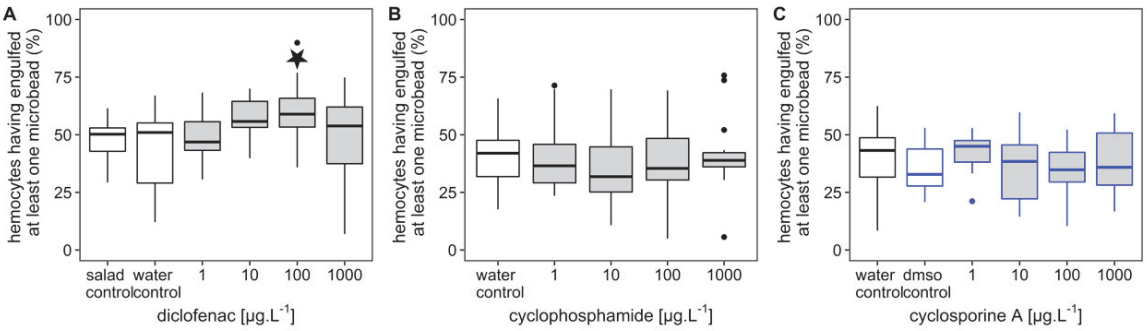


Figure 2: Phagocytosis

The graphs represent the phagocytosis capacity of the snail's hemocytes 3 days after diclofenac (A), cyclophosphamide (B) and cyclosporine A (C) exposures, respectively. The star corresponds to a statistically significant difference with the corresponding water control (*i.e.*, 95% confidence interval of model regression coefficient not containing the value "0"). The blue borders of graph 2C indicate the presence of the carrier solvent DMSO (0.01%). The boxplots filled with grey indicate the presence of a pharmaceutical, while those with white filling indicate the absence of pharmaceutical.

exposure to such freshwater mollusks.

Matozzo (2014) reported that only one study investigated adverse immune effects of CP on aquatic animals. It was carried out in the bivalve Mytilus edulis and the sea star Asterias rubens by Canty et al. (2009). No significant cytotoxicity (neutral red assays) in hemocytes was found when the organisms were exposed to CP for 7 days at very high concentrations (18–180 $mg.L^{-1}$). In contrast, high dose-dependent genotoxicity (DNA strand breaks and micronuclei) was induced by the anti-cancer drug. Since the concentrations were even higher than the therapeutic concentration that we used, the results of our study are consistent with the investigation of Canty et al. (2009). Similarly, CP was reported to exert high genotoxicity in the aquatic snail Lymnaea acuminata, although investigations were carried out on ovotestes, not immune cells (Singh and Agarwal 1981). Overall, the small set of available data does not point to strong short-term immunotoxicity of CP to aquatic molluscan species at environmental realistic concentrations. In the present study, no CP immunotoxicity was detected even at therapeutic exposure levels. Since CP is a pro-drug, the lack of appropriate converting enzymes in *L. stagnalis* may explain the absence of cytotoxic effects at such high concentrations. Immunosuppression did not occur in these snails, which strengthens the necessity to integrate species-proteome peculiarities in the expected pharmaceuticals' (such as xenobiotics) adverse effects. Again, long-term exposure may reveal completely different toxicity trends and wild *L. stagnalis* specimens are also likely exposed to the cytotoxic metabolites of CP, for instance active phosphoramide mustard metabolites (Madondo et al. 2016). Mesocosms with *L. stagnalis* and vertebrate aquatic species – likely to metabolize the CP prodrug – chronically exposed to CP

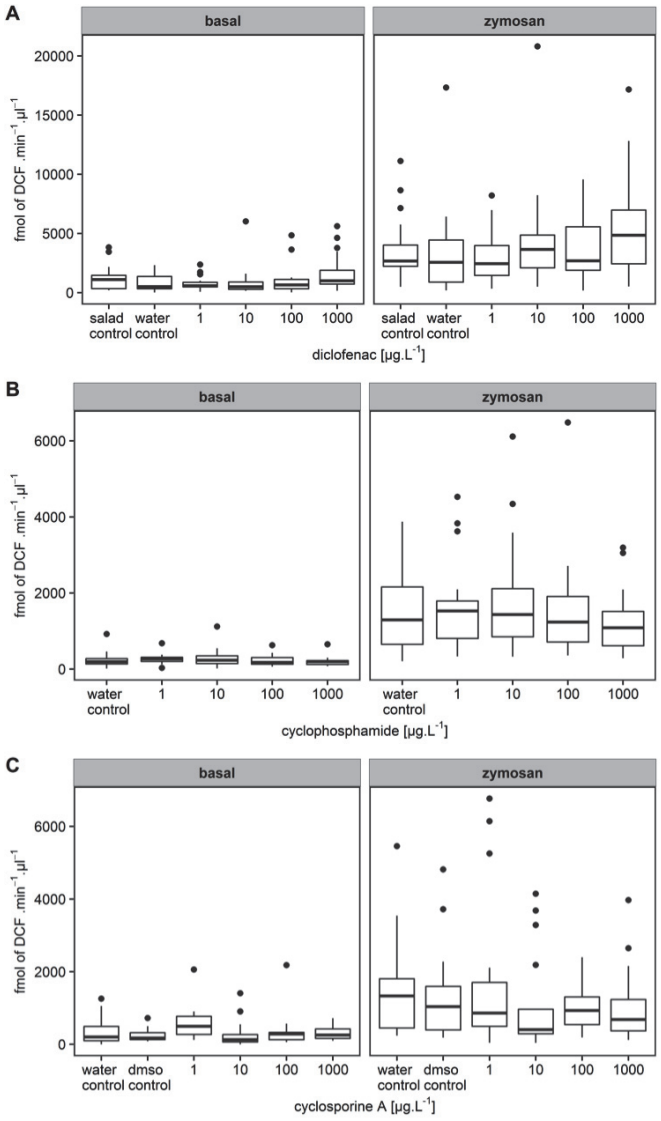


Figure 3: Oxidative activities of hemocytes

The graphs represent the hemocyte-related oxidative activities of snails after 3 days of drug exposures (A: diclofenac, B: cyclophosphamide and C: cyclosporine A experiments). On each snail, the generation of ROS kinetics from hemocytes was followed in their basal status as well as after stimulation with zymosan particles (*i.e.*, NADPH-oxidase activity).

and its active metabolites (4-hydroxycyclophosphamide and carboxyethilphosphoramide mustard) (Rezvani et al. 2013) would be advantageous in a case study seeking to understand the environmental impact of cytotoxic anti-cancer alkylating drugs.

In the present study, only the hemocyte at 1000 $\mu g.L^{-1}$ of nominal CSA concentration exposures resulted in a significant decrease compared to controls. All the other endpoints assessed were not significantly impacted by CSA, so we can conclude that CSA exerted only weak short-term impairment of the snails' a priori immunocompetence (in contrast to a posteriori immunocompetence resulting from a bacterial challenge). At environmental realistic concentrations, no clues of immunotoxicity were observed. However, since the immunotoxicity of CSA to *L. stagnalis* was detected at therapeutic concentrations, chronic exposure at low concentrations in the environment may have significant effects on the species. Furthermore, we observed, interestingly, that the snail's egg-mass oviposition rate was higher for the CSA 1000 $\mu g.L^{-1}$ exposure condition compared to the other conditions (see Fig. S3 in SM). Therefore, at 1000 $\mu g.L^{-1}$, immunotoxicity and reproduction trade-offs are suspected. In immunotoxicology (*e.g.*, clinical studies) CSA is a well-known drug model for immunosuppressive effects (Schuurman et al. 1994, Dewaal et al. 1995, Crevel et al. 1997, Langezaal et al. 2001, Schulte et al. 2002). By following OECD protocols (Organisation for Economic Cooperation and Development), the study from Schulte et al. (2002) carried out on rats revealed the drug's dose-dependent immunosuppressive effects. In the context of alternative methods within the REACH project (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) (Lilienblum et al. 2008), Carfi et al. (2007)

conducted an in vitro immunotoxicity study on primary cultures of lymphocytes. They evaluated the effects of short-term exposures to CSA. They found that the IC50 (anti-CD3 antibody stimulation) was ten times lower in mouse cells than in human cells while the IC50 (cell viability) for mouse cells was three times higher than for human cells. This strengthens the species-specific sensitivity pattern of the drug's MoA. Langezaal et al. (2001) classified drug immunotoxicity into three types: (i) activation, (ii) sensitization and (iii) impairment of the immune response mechanisms (*i.e.*, immunosuppression). They stated that CSA was a well-known model substance for type 3 drug immunotoxicity (*i.e.*, immunosuppression) as well as dexamethasone and azathioprine. A more recent *in vivo* study reported that CP and CSA exerted substantial immunosuppression regarding the antibody response in mice compared to other drug models such as dexamethasone, chlorpromazine and prednisolone (Auli et al. 2012). Again, these observations suggest high species specificity to the drug's immune effects.

On the whole, the present study reports weak immune effects in the invertebrate gastropod *L. stagnalis* exposed to the selected pharmaceuticals of immune concern. However, we can still hypothesize important consequences in the environment under chronic pressure of these or similar pharmaceuticals and possibly life-history trade-offs. Since they are well-known molecules interacting specifically with the immune system of mammals, it would be of great value to gain knowledge on their chronic immunotoxicity to *L. stagnalis* and model fishes such as zebrafish, because as vertebrate species they are more likely to metabolize prodrugs than invertebrate species (Kari et al. 2007, Chakraborty et al. 2009).

As the relevance of the environmental risk assessment of pharmaceuticals lies in the diversity of species used in ecotoxicological tests (*e.g.*, species-sensitivity distributions), *L. stagnalis* is a useful freshwater gastropod model for investigating the immunotoxicity of chemicals, providing insights into the MoA. Indeed, related immunological methods presented in this paper are non-invasive, relevant and practical. In addition, *L. stagnalis* is currently labeled as a model organism for OECD reprotoxicity tests. Furthermore, the genome of *L. stagnalis* is being sequenced (STAGING-project 2017) and the development of genomic/proteomic tools examining immune responses is promising for the investigation of the MoA of pharmaceuticals for the *L. stagnalis* immune system, and to improve knowledge on mechanisms as well as to develop new sensitive immunomarkers.

Conclusion

As hypothesized, diclofenac and cyclosporine A exerted immune responses in *L. stagnalis*. On the contrary, short-term exposures of the prodrug cyclophosphamide did not impact the markers of immunocompetence in *L. stagnalis*, even at high concentrations. The effects of pharmaceuticals on mammal immune cells cannot be systematically transposed to gastropod immune cells, notably for prodrugs since metabolism pathways differ greatly between vertebrates and invertebrates. Consequently, these results raise issues about the long-term effect of these drugs on immune responses (sublethal effects) and possibly on other life traits of gastropods. They also suggest that relevant human drug metabolites should be taken into consideration when assessing the environmental hazard of drugs toward invertebrate

species. Finally, possible additive effects of these pharmaceuticals sharing a similar MoA or features should also encourage exploration.

Acknowledgements

We thank Barbara Giroud and Gaelle Daniele (ISA-Institut des Sciences Analytiques, Lyon-Villeurbanne) for chemical analysis of water samples. We also extend our thanks to the useful comments of anonymous reviewers and Linda Northrup for English proofreading.

Funding

The Rhône-Alpes region provided financial support to Paul Boisseaux in a PhD fellowship program (*ARC3 Environnement*).

References

Voir à la fin du manuscrit.

Supplementary data

Table S1 : Informations about water quality

Main parameters of water mediums during the study	
Conductivity ($\mu S.cm^{-1}$)	470 – 495
Dissolved oxygen (%)	> 60 %
NH_4 (ppm)	< 0.05 ppm
NO_2 (ppm)	0.05 – 0.1 ppm
pH	7.5 – 8.0
Chemical analysis of the groundwater (same origin than the one used during the study) in the course of the year	
HCO_3^- ($mg.L^{-1}$)	176 - 239
SiO_2 ($mg.L^{-1}$)	7.9 - 8.0
COT ($mg.L^{-1}$)	0.7 – 1.15
Cl^- ($mg.L^{-1}$)	15.0 – 17.1
SO_4^{2-} ($mg.L^{-1}$)	38.2 – 38.5
Na^+ ($mg.L^{-1}$)	10.5 – 11.7
K^+ ($mg.L^{-1}$)	2.2 – 2.5
Mg^{2+} ($mg.L^{-1}$)	7.5 – 7.8
Ca^{2+} ($mg.L^{-1}$)	63.1 – 85.3
NH_4^+ ($mg.L^{-1}$)	< 0.05
NO_2^- ($mg.L^{-1}$)	< 0.05
NO_3^- ($mg.L^{-1}$)	2.5 – 10.1
PO_4^{3-} ($mg.L^{-1}$)	< 0.1

Table S2 : Details of the model retained to describe the hemocyte density dataset for the diclofenac experimentation*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	43.2	0.0	80.1	-
	Replicate [inter aquarium effect]	66.8	27.9	86.5	-
	Residuals [intra-individual effect]	129.7	111.5	145.6	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	482.7	422.6	542.8	-
	Day effect	-323.9	-381.3	-264.7	-10.8
	Interaction of day 3 with DC 1 $\mu g.L^{-1}$	-61.4	-169.5	46.0	-1.0
	Interaction of day 3 with DC 10 $\mu g.L^{-1}$	163.8	52.6	274.8	2.6
	Interaction of day 3 with DC 100 $\mu g.L^{-1}$	142.4	33.5	249.3	2.3
	Interaction of day 3 with DC 1000 $\mu g.L^{-1}$	212.7	104.3	320	3.5

*** R formula : lmer(density ~ day + day : condition + (1|aquarium/snail), data=diclofenac)**

Exposure conditions are compared to the control group consisting in the water controls merged wi th salad controls as the latters were not statistically different from each other.

Table S3 : Details of the model retained to describe the hemocyte viability dataset for the cyclosporine A experimentation*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	0.4	0.3	0.5	-
	Replicate [inter aquarium effect]	0.02	0.0	0.2	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.53	0.5	0.6	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]		0.4	0.8	-
	Day effect	-0.3	-0.51	-0.01	-2.1
	Interaction of day 3 with CSA 1 $\mu g.L^{-1}$	0.2	-0.15	0.59	1.2
	Interaction of day 3 with CSA 10 $\mu g.L^{-1}$	0.3	-0.09	0.66	1.5
	Interaction of day 3 with CSA 100 $\mu g.L^{-1}$	-0.2	-0.60	0.14	-1.2
	Interaction of day 3 with CSA 1000 $\mu g.L^{-1}$	-0.4	-0.75	-0.01	-2.0

*** R formula : lmer1<- lmer(logit.viability ~ day + day : condition+ (1|aquarium/snail), data=CSA)**
Exposure conditions are compared to the control group consisting in the water controls and DMSO controls merged together as the latter were not significantly different from each other.

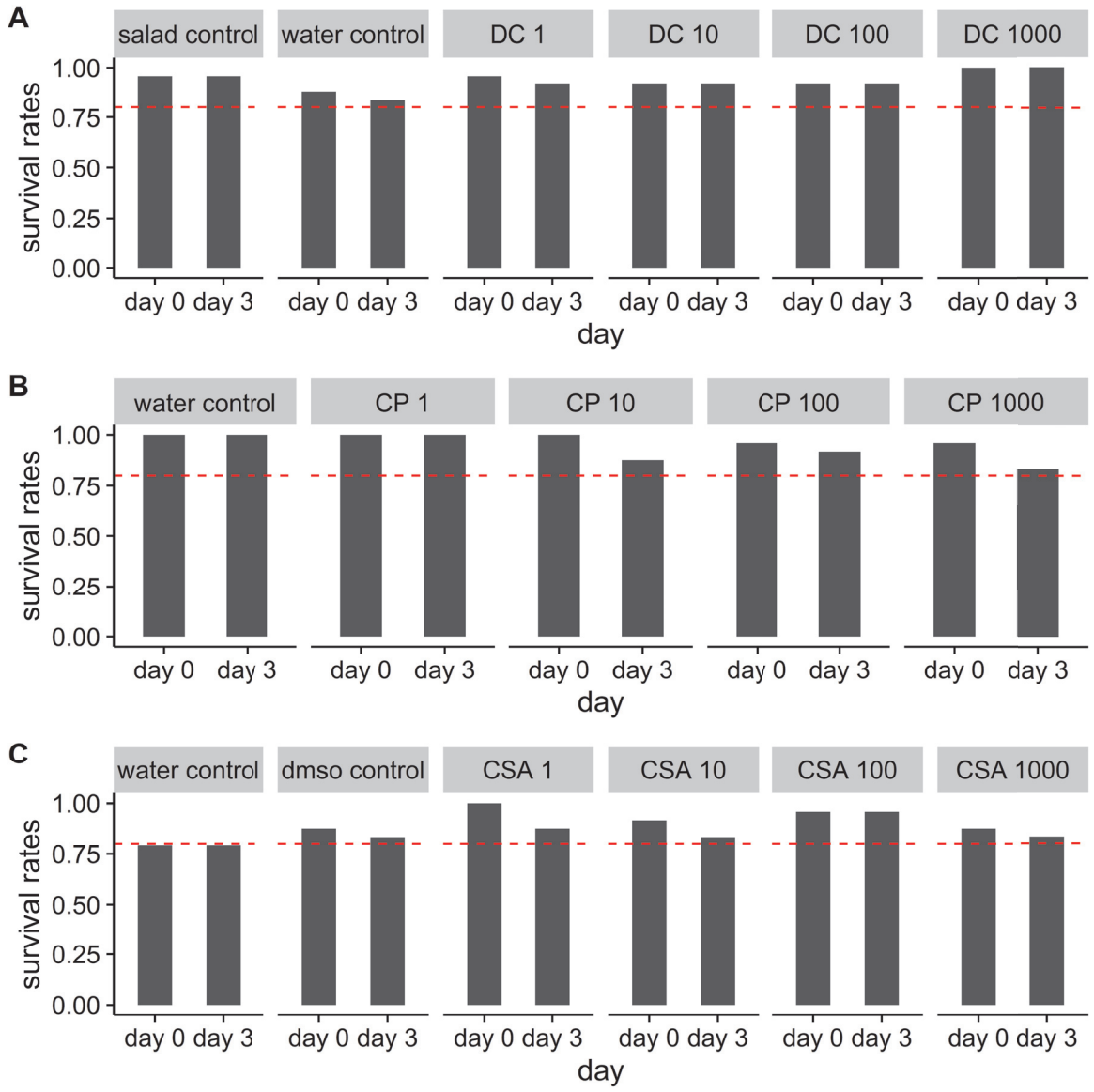


Figure S1 : Snail survival rates

The barplots correspond to survival rates of snails at the day 0 and 3 into respective exposure condition after pooling the replicates aquaria of respective experimentations: **A**: Diclofenac (DICLO), **B**: Cyclophosphamide (CP) and **C**: Cyclosporine A (CSPA). The values in the head title of respective barplots stands for nominal exposures of the pharmaceutical in $\mu g.L^{-1}$. The dashed lines indicate the intercept with y-axis at 0

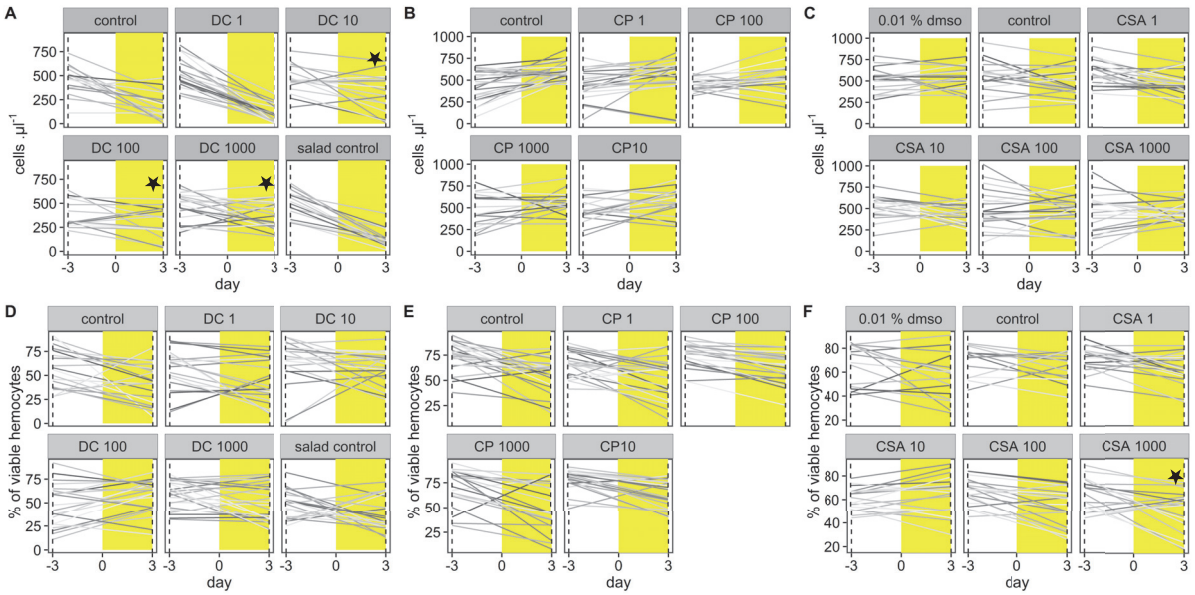


Figure S2: The graphs **A**, **B**, and **C** represent the hemocyte density in the diclofenac (DC), the cyclophosphamide (CP) and the cyclosporine A (CSA) experimentations, respectively. The graphs **D**, **E** and **F** represent the hemocyte viability in the respective experimentations. Each biomarker was assessed 3 days before and 3 days after the exposures. On each plot, the half-white part corresponds to the acclimation period, while the other half-yellow part corresponds to the exposure period. The numbers in head titles stand for the nominal concentrations of the pharmaceutical exposures expressed in $\mu g.L^{-1}$. Stars indicate statistically significant differences with controls.

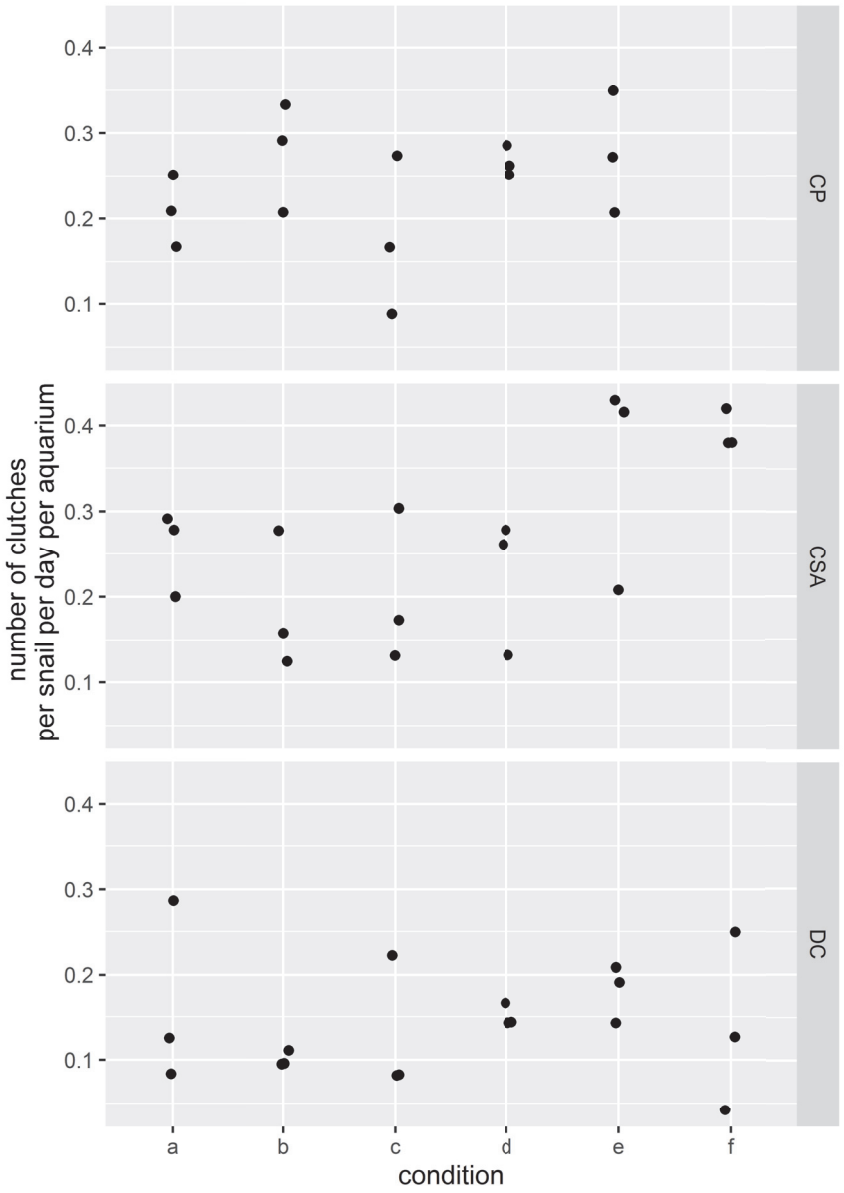


Figure S3: Reproductive outputs during the 3 days of drug exposures

Clutches were counted into each aquarium after 3 days of drug exposures into the respective experimentations. Number of clutches were divided by the number of individual-day (NID) as described in Delignette-Muller et al. (2014)[1]. Each point corresponds to the value for one aquarium replicate of the corresponding experimental condition. The conditions “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f” for (i) cyclophosphamide (CP) experimentation stand for water control, CP 1, CP 10, CP 100 and CP 1000 $\mu g.L^{-1}$, respectively, for (ii) cyclosporine A (CSA) experimentation stand for water control, dmso control, CSA 1, CSA 10, CSA 100 and CSA 1000 $\mu g.L^{-1}$, respectively and for (iii) diclofenac (DCF) experimentation stand for water control, salad control, DC 1, DC 10, DC 100 and DC 1000 $\mu g.L^{-1}$, respectively, by reference to nominal drug concentrations.

[1] Delignette-Muller, M. L., C. Lopes, P. Veber, and S. Charles. 2014. Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. Environmental science & technology **48**:7544-7551.

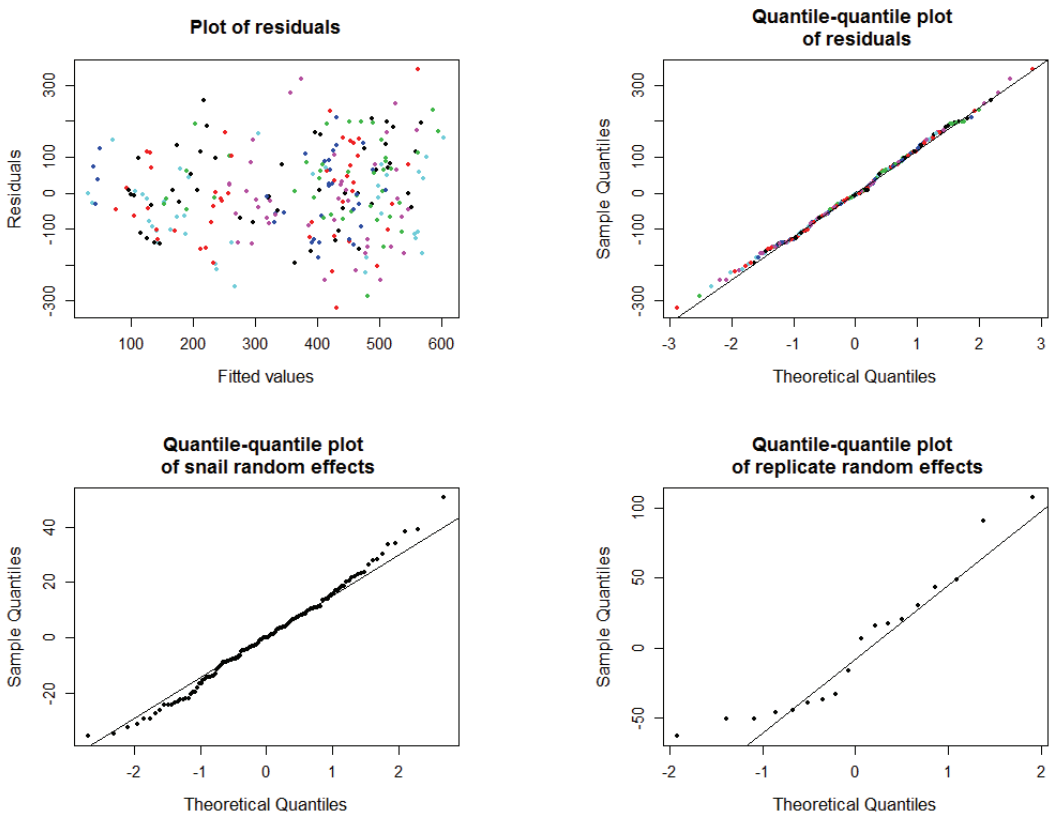


Figure S4 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte density model from the diclofenac experimentation

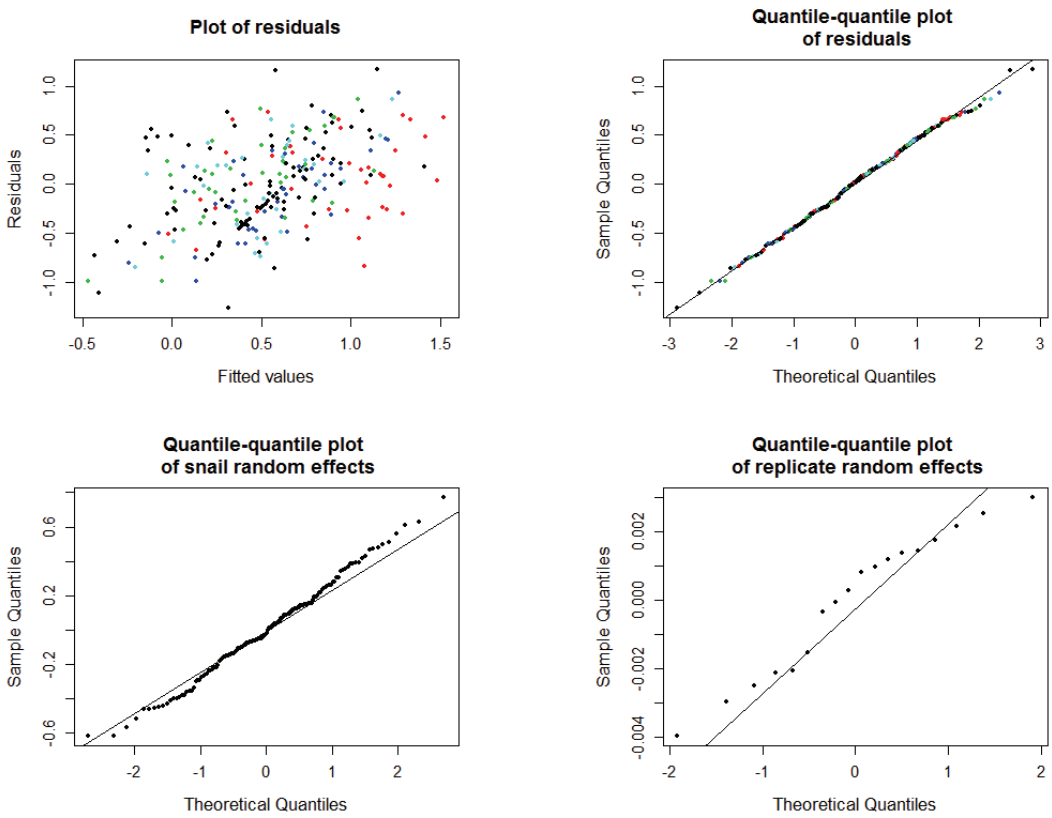


Figure S5 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte viability model from the cyclosporine A experimentation

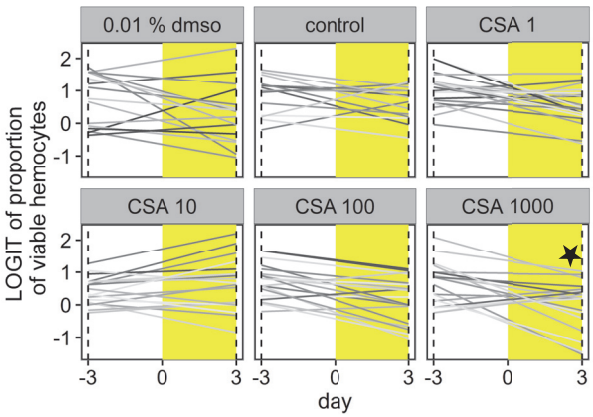


Figure S6 : Hemocyte viability after LOGIT transformation for the cyclosporine A (CSA) experimentation

Des molécules conçues pour avoir des vertues thérapeutiques peuvent interagir avec le système immunitaire de *L. stagnalis* lors d'expositions de courte durée. Les effets immunosuppresseurs ou immunotoxiques de produits pharmaceutiques ne sont pas systématiquement transposables des mammifères aux gastéropodes (par extension du phylum des *chordata* aux *mollusca*). Ces travaux renforcent la nécessité d'étudier des métabolites pertinents pour mieux comprendre le danger immunotoxique des divers médicaments sur des espèces non-cibles. Par ailleurs, ces travaux ont montré la faible sensibilité (de concentration) de réponse des immunomarqueurs chez *L. stagnalis*. Qu'en est-il de l'immunotoxicité de xénobiotiques à des concentrations réalistes de l'environnement sur de **plus longues durées** d'exposition ? Il existe d'autres classes de xénobiotiques provenant d'activité anthropique dont le but est d'endiguer des maladies, bien qu'ils ne soient pas des médicaments à proprement parler. C'est le cas de certains produits biocides (i.e., pesticides) utilisés comme anti-moustiques à des fins de **prophylaxie** contre les maladies parasitaires (e.g., le paludisme). L'exemple de l'**insecticide pyrethrinoïde Deltaméthrine** illustre ce cas de figure. Par ailleurs, de nombreuses preuves existent concernant l'immunotoxicité de la Deltaméthrine sur des mammifères (humains et rongeurs). Ce pesticide est largement utilisé dans le monde et est rémanent dans l'environnement. Une pression chronique à des concentrations environnementales peut induire une immunotoxicité avant que n'apparaissent des effets délétères à d'autres niveaux d'organisation physiologiques et/ou traits de vie : alimentation, reproduction, survie. C'est dans ce contexte que le chapitre suivant se propose d'évaluer l'immunotoxicité de la Deltaméthrine — en utilisant l'approche multibiomarqueurs — chez *L. stagnalis* dans un contexte environnemental réaliste sur 44 jours d'exposition en renouvellement continu. Ce chapitre vise à fournir des éléments de réponse aux questions 6 (sensibilité aux concentrations), 7 (rapidité de réponse), 8 (immunotoxicité trans-phylum) et 9 (précocité physiologique).

Chapitre 5

La Deltaméthrine exerce-t-elle des effets immunotoxiques sur une population naturelle de *Lymnaea stagnalis* ?

Sommaire

5.1 Contexte et objectifs 228

5.2 Article 6 : La Deltaméthrine exerce-t-elle des effets immunotoxiques sur une population naturelle de *Lymnaea stagnalis* ? 230

5.1 Contexte et objectifs

La deltaméthrine (DTM) est un insecticide pyréthroïde largement utilisé dans le monde (voir la classification toxicologique dans l'annexe F.2, p. 427). De nombreuses preuves d'immunotoxicité sur des vertébrés existent (*e.g.*, humains, rongeurs, poissons). Qu'en est-il chez les mollusques, et en particulier *L. stagnalis* ? Ce chapitre vise à étudier l'impact immunotoxique de la DTM sur *L. stagnalis* dans un contexte environnemental réaliste : exposition à des concentrations environnementales (0.1 — 10 $\mu g.L^{-1}$), population collectée en milieu naturel (Rhône), temps d'exposition de 44 jours. Les concentrations choisies visaient à déterminer la **sensibilité** de réponse des immunomarqueurs à des **concentrations** environnementales. La DTM a été choisie comme cas d'étude afin de voir s'il est possible de transposer les propriétés **immunotoxiques** de cette molécule entre **phylums** (*chordata* et *mollusca*). Des mesures individuelles de marqueurs d'immunocompétence ont été réalisées à différents temps d'intervalles afin de déterminer la possible **rapidité** de modulation des marqueurs d'immunocompétence. D'autres traits de vie ont été mesurés en parallèle tels que le taux de reproduction par individu, le taux d'alimentation et la survie des organismes afin de déterminer s'il existe une **précocité physiologique** de réponse des marqueurs d'immunocompétence.

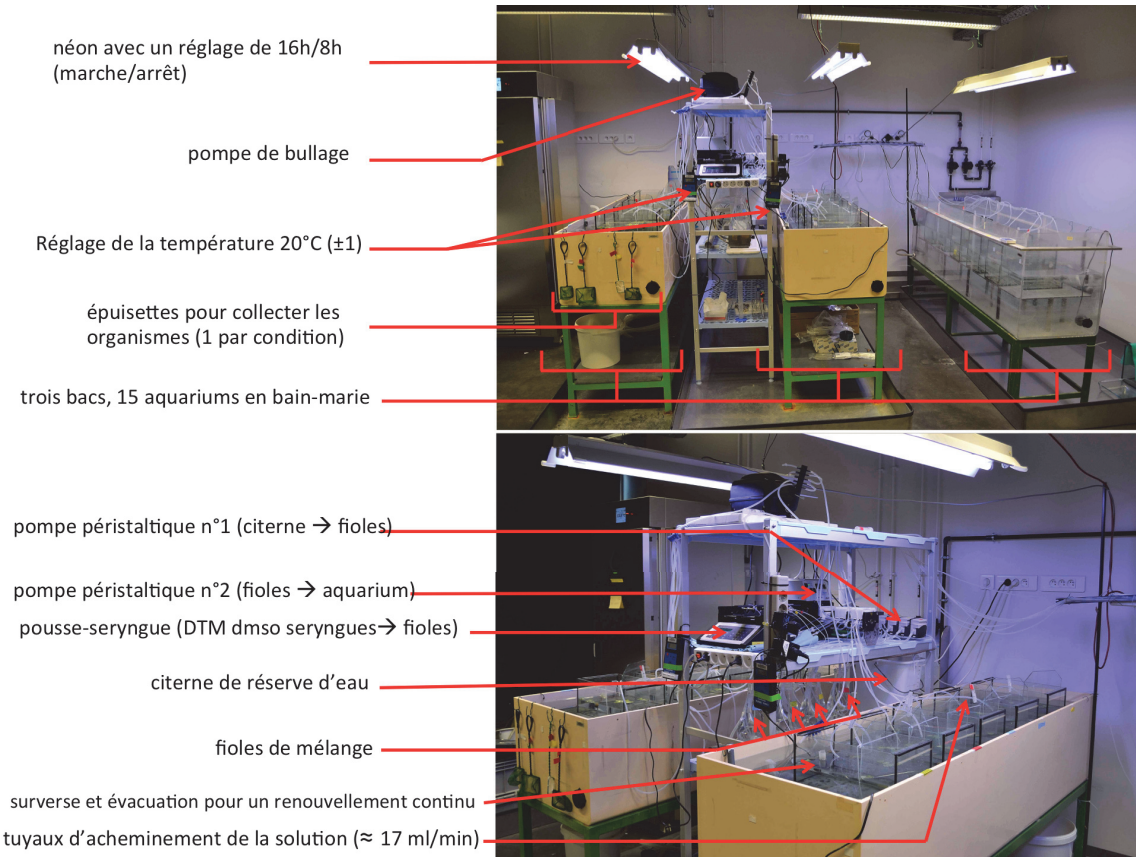


FIGURE 5.1 – Schéma du dispositif expérimental mis en place pour l'étude de l'immunotoxicité de la deltaméthrine chez *L. stagnalis* présentée ci-après

5.2 Article 6 : La Deltaméthrine exerce-t-elle des effets immunotoxiques sur une population naturelle de *Lymnaea stagnalis* ?

(à soumettre)

Type : *full-length article*

Résumé de l'article

Introduction : La deltaméthrine (DTM) est un insecticide pyréthroïde utilisé dans le monde entier, en particulier à des fins de prophylaxie contre des maladies parasitaires. Plusieurs études ont montré que la DTM provoque des effets immunotoxiques chez plusieurs vertébrés (humains, rongeurs et poissons). Par ailleurs, une étude avait étudié l'effet de la DTM sur les capacités de reproduction du gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* et des perturbations légères avaient été observées sur plusieurs générations. Dans l'étude présentée ici, nous avons cherché à voir (i) si les effets immunotoxiques de la DTM sur les vertébrés peuvent également apparaitre chez *L. stagnalis* via l'évaluation d'une batterie de marqueurs d'immunocompétence dans un contexte environnemental réaliste, (ii) si l'évaluation de marqueurs d'immunocompétence (traits immunitaires) permet de détecter une altération physiologique induite par la DTM avant que n'apparaissent des effets sur d'autres traits de vie (survie des organismes, taux d'alimentation et reproduction).

Matériel et Méthodes : La DTM a été utilisée à des concentrations environnementales (*i.e.*, 0.1, 1 et 10 $\mu g.L^{-1}$) pendant 44 jours via un système à renouvellement continu (aquariums et pompes péristaltiques, voir la fig. 5.1 p. 229). Plusieurs marqueurs d'immunocompétence ont été évalués tout au long de l'expérience à une échelle individuelle. Les *endpoints* qui ont été mesurés sont la densité et la viabilité hémocytaire (j=0, 2, 9, 21 et 44), l'activité non spécifique phénol-oxydase de l'hémolymphe (j=9), l'activité oxydative immunocompétente (j=2 et 21) et la capacité de phagocytose (j=44). En parallèle, des traits d'histoire de vie ont été mesurés (survie, oviposition, fécondité et taux d'alimentation). Pour évaluer la reprotoxicité, le protocole OCDE (test n ° 243, 2016) a été suivi.

Résultats : Les résultats ne permettent pas de conclure à un effet de la DTM sur la survie des organismes, ni sur le taux d'alimentation ou sur la reproduction (*i.e.*, oviposition, fécondité). La DTM n'a pas impacté de manière significative l'immunocapacité des organismes (*i.e.*, densité et viabilité hémocytaire). En revanche une immunomodulation a été détectée pour les organismes exposés à la DTM à 10 $\mu g.L^{-1}$ car une augmentation significative de l'activité phénol-oxydase de l'hémolymphe — par comparaison aux témoins — a été observée au jour 9. Par la suite, une immunotoxicité a été détectée au jour 21 pour les organismes exposés à la DTM à 10 $\mu g.L^{-1}$ car une diminution significative de l'activité oxydative immunocompétente des hémocytes a été observée.

Conclusions : Ces résultats suggèrent une certaine précocité de réponse des marqueurs d'immunocompétence étudiés pour détecter la toxicité de la DTM. En revanche, les effets ne sont pas très marqués et plus d'investigations sont nécessaires pour mieux comprendre la précocité d'altération de ces marqueurs d'immunocompétence par rapport à d'autres traits de vie. Les effets lors d'une exposition chronique sont incertains mais cette étude laisse penser que la DTM pourrait altérer — sur le très long terme — les capacités de ces gastéropodes à se défendre contre les parasites/pathogènes et ainsi prédisposer les populations naturelles aux maladies infectieuses.

Mots-clés : deltaméthrine, immunotoxicité, gastéropode d'eau douce, traits d'histoire de vie

Is the insecticide deltamethrin likely to exert immunotoxicity to natural population of the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* ?

Paul Boisseaux[a], Dante Chazarin[a], Patrice Noury[a], Marie-Laure Delignette-Muller[b,c], Hélène Thomas-Guyon[d], Jeanne Garric[a]

[a] *Irstea Centre de Lyon-Villeurbanne, Laboratoire d'Écotoxicologie, MAEP, 5 rue de la Doua, 69626 VILLEURBANNE (France)*
[b] *Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne, France*
[c] *Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France*
[d] *LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle*

Abstract

The insecticide deltamethrin (DTM) was exposed to the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* at environmental relevant concentrations (*i.e.*, 0.1, 1 and 10 $\mu g.L^{-1}$) for 44 days in a flow-through system. Different markers of immunocompetence were measured along with the days (*i.e.*, 0, 2, 9, 21 and 44) at an individual scale. The endpoints consisted in hemocyte density, hemocyte viability, hemocyte oxidative activity stimulated with zymosan particles, hemocyte phenol-oxidase-like activity and capacity of phagocytosis. In parallel, life-history traits (survival, oviposition, fecundity and alimentary consumption) were assessed in order to put in perspective the relative sensitivity of markers. Results suggest that differences in life-history traits cannot be attributed to the presence of DTM. However, signs of immunotoxicity have been observed, suggesting precocity of immunomarkers to detect toxicity of DTM. The effects under chronic exposures are uncertain, but we can hypothesize that important DTM will jeopardize snails to fight intruders in natural environments with consequences at the population level. Further studies are required to assert the sensitivity of such immunomarkers in order to understand their relevance in ecotoxicology.

Keywords: deltamethrin, immunotoxicity, freshwater invertebrate, life-history traits

1. Introduction

The increasing amount of xenobiotics in rivers that exert immunotoxicity onto aquatic life is a concern that deserves to be addressed. The immune system has a physiological function particularly important in a multistress context (*e.g.*, chemicals, bacterias, parasites, temperature shifts, etc). Immunocompetent cells (*i.e.*, hemocytes in invertebrates) are involved in a myriad of vital processes such as pathogen clearance, nutrient transport, wound healing, waste clearance (*e.g.*, apoptotic cells), etc. The immune system is considered to be a major fitness determinant because the organisms in natural environments are facing pathogens all along their lifespan (Graham et al. 2010, Segner et al. 2012). Impairment of immunocompetence can lead to survival consequences. The immunobiomarkers may be used as indicators of the animal unhealthy condition. Better understanding of relationships between immunotoxicities and effects at other physiological levels constitute an important goal in environmental immunotoxicology. A

particular effort onto invertebrate species should be deployed because studies are scarcer than onto vertebrate species (Galloway and Depledge 2001, Galloway and Handy 2003).

The pesticides constitute an important part of the chemical environmental pollution. Their use aims at targeting a specific animal phylum with a specific mechanism of action. Hence, an insecticide neurotoxic is expected to be more toxic to insects than to mollusks and acting mainly on the nervous system. In spite of that, toxicity can obviously be crisscrossed between phyla and mechanisms of toxic actions may act at multiple physiological levels. In the present study, the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* was used for several reasons. Ecotoxicological studies on gastropods deserve attention. They represent an important part of the biomass (up to 60% in some aquatic ecosystems) (Russell-Hunter 1983). *L. stagnalis* is ecologically representative of Holarctic regions of the planet where it lives in freshwater lentic biota. It is an OECD model organism for reprotoxicity tests (Ducrot 2014). The collection of hemolymph can be realized mechanically without animal sacrifice. It has been observed that repeated hemolymph collections did not affect snail survivals nor hemocyte densities/viabilities at frequencies up to 48h (Boisseaux et al. 2016). The time-course evolution of snails immunocompetence can be realized at an individual level. This represents a great advantage of this organism for immunological studies because it is possible to take into account the individual idiosyncrasy. A choice has been made to work on species collected on the field. Hence, the investigated effects are likely representative to what may happen in natural environments.

The deltamethrin (DTM) is used worldwide as insecticide for agriculture, veterinary and domestic uses. For example, it is employed as a mosquito repellent to tackle the malaria epidemia. DTM belongs to the pyrethroid class of pesticides which neurotoxicity (*i.e.*, blocking the closure of ion gates of sodium channels on membrane nerve cells) is the major known mechanism of toxicity. It has a high potential to accumulate in biological tissues; the log Kow is estimated of 4.6 at 25°C (INRS). The DTM is very toxic to aquatic vertebrate species; for example the study from Viran et al. (2003) observed a $LC50_{48h}$ on guppies at 5.13 $\mu g.L^{-1}$. DTM is also very toxic to aquatic invertebrates species as shown in the study lead by Thomas et al. (2008) on a cladoceran (*Ceriodaphnia cf. dubia*) and a freshwater shrimp (Paratya australiensis). Values of $LC50_{96h\ and\ 48h}$ were measured below 0.26 $\mu g.L^{-1}$. The $LC50_{48h}$ of juveniles freshwater amphipods (*Gammarus fossarum*) has been observed at 4.0 $ng.L^{-1}$ (Adam et al. 2010). The filtering activity of freshwater mussels (*Anodonta cygnea*) has been observed to be significantly reduced in a 96h DTM exposure at 10 $\mu g.L^{-1}$ as soon as 30 min after exposure (Kontreczky et al. 1997). Signs of DTM immunotoxicities have been depicted in humans (Kumar et al. 2015), in rats (Aydin 2011) and fishes (Pimpão et al. 2007). DTM showed signs of toxicity on hemolymph of terrestrial snails (Helisoma duryi) (Bakry et al. 2011) and toxicity on hemocytes from the honeycomb moth (*Galleria mellonella*) (Kurt and Kayis 2015). In aquatic invertebrate life, DTM showed signs of immunotoxicity in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Oahn et al. 2014) at exposure concentrations as low as 2.5 $\mu g.L^{-1}$ for 72h.

In the present study, we exposed *L. stagnalis* to DTM. The lowest concentration was set at 0.1 $\mu g.L^{-1}$ because it corresponds to the acceptability threshold of pesti-

cide concentration in surface waters (*i.e.*, environmental fate modelisations) for European Union full-market approval. Stehle et al. (2013) performed agricultural surface waters simulations with probabilistic concentrations of DTM evaluated at 0.29 $\mu g.L^{-1}$. The highest concentration was set at 10 $\mu g.L^{-1}$ because it corresponds to plausible environmental concentrations (*i.e.*, worst case scenario) and it remains likely to be a sublethal concentration to *L. stagnalis*. Indeed, a study reports the low toxicity of K-Othrine (containing DTM as active ingredient) to *L. stagnalis* (Présing 1993). No significant effects of K-Othrine exposures from 1 to 100 $\mu g.L^{-1}$ as a unique initial preparation free of solvent and for 6 weeks- were observed for the first snail generation survival. Life-history trade-offs occurred because the snail oviposition and fecundity increased. The snail survival was significantly affected only for second generations. Hence, the cumulative nature of DTM toxicity makes the survival an insensitive indicator of DTM toxicity in *L. stagnalis* for first generations.

Considering the above, the questions that justified the present study were: Do DTM long-term exposures at environmental relevant concentrations are immunotoxic to *L. stagnalis* ? Do marker of immunocompetence are more sensitive than life-history traits indicators for a xenobiotic that showed low toxicity to *L. stagnalis* ? To give elements of a response, the time-course evolution of snail's immunocompetence was evaluated under exposition of DTM at concentrations ranging from 0.1 to 10 $\mu g.L^{-1}$ over a 6-weeks duration using a flow-through system. At different days, hemocytes parameters were measured. The immunocapacity was defined as the combination of hemocyte density and hemocyte viability. The immunoefficiency was defined as the functional ability of hemocytes to realize an immune action. Among the latters, the hemocyte-oxidative activities (*i.e.*, basal and immunostimulated) were evaluated, as well as the phenol-oxidase-like activity and the activity of phagocytosis. In parallel, the snail survival, the reproduction outputs (*i.e.*, oviposition and fecundity) and the feeding rate were assessed.

2. Material and methods

2.1. Snails

Calibrated adult snails (30-35 mm shell-length) were collected in a low water flow branch of the Rhône River by scuba diving in June 2015. A total of 105 snails were randomly assigned in 15 aquariums (7 snails/aquarium). They were individually identified with honey bees marks (Ickowicz Apiculture, Bollene, France) placed on the top of their shell. Mortality was daily recorded. Dead snails and snails at the end of the implementing test period were frozen at -80°C in order to shorten the animal suffering.

2.2. Deltamethrin

2.2.1. Experimental design and chemical exposure

The experimentation was run for 44 days. Five exposure conditions were set up : (i) controls, (ii) dmso controls (0.004% used in all DTM exposures), (iii) 0.1 $\mu g.L^{-1}$ of nominal DTM concentration, (iv) 1 $\mu g.L^{-1}$ of nominal DTM concentration and (v) 10 $\mu g.L^{-1}$ of nominal DTM concentration. A total of 15 glass-aquaria were used with a capacity of water adjusted at 10 L; each exposure condition consisted in three aquarium replicates; they were randomly plunged in water-bathes in which the temperature was set at 20 ±1 °C (verified with Tinytags recorders). A neon tube-lightning at 800 lux (± 200) provided a photoperiod of 16h/8h

[light/dark]. The water quality parameters (ammonium cation, nitrite anion, pH, conductivity and oxygenation) were measured twice a week on 5 random aquaria (one per exposure condition). The DTM (Sigma, CAS 52918-63-5) exposure was realized by using a flow-through system. Each aquarium received a theoretical water flow rate of 18.9 $ml.min^{-1}$ thanks to a peristaltic pump (Ismatec BVP). Thus, the water body of each aquarium was renewed 2.7 times per day. A water pipe disposal connected to sewage collection system allowed to evacuate the water excess. DTM was first concentrated 25000X — in 100% dmso — respectively to each target concentration (*i.e.*, final dmso concentration of 0.004%). 10 ml syringes were filled every 2.5 days and placed on syringe-pump (Harvard PHD 2000) at a flow delivery rate of 144 $\mu l.hour^{-1}$. These solutions were injected into an intermediate 1.2 L glass vacuum flask that received simultaneously a water body at a flow rate of 60 $ml.min^{-1}$ (dilution 1 : 25000) thanks to a peristaltic pump (Watson 505 S). A magnetic stirrer plate allowed the solutions to homogenize. From these flasks, the Ismatec peristaltic pump mentioned above was delivering the corresponding 18.9 $ml.min^{-1}$ into the respective aquarium replicates per exposure condition.

2.2.2. *Chemical analysis*

Water was sampled in glass bottles at three different days during the implementing test period in one random aquarium from each exposure condition. Samples were straightforwardly shielded from light and frozen at -20˚C until chemical analysis. The latter was performed by LC-MS/MS method using the respective following apparatus : Waters Acquity H-Class coupled with Waters® Xevo TQ-S. The chromatography column used was Kinetex Phenyl-Hexyl 100x2,1 mm (Phenomenex) with a granulometry of 2,7 μm. Mobile phases were 0.04 mM ammonium acetate with 0.01% acetic acid in deionized water (A) and methanol (B). The elution gradient was from 5% to 90% (B) for 7 min then 100% (B) for 2 min, at 0.4 $ml.min^{-1}$. The column oven temperature was set at 60˚C. The ionization was realized with a positive electrospray source and the acquisition mode in mass spectrometry was Multiple Reaction Monitoring (MRM). Two MRMs transitions were followed : 523,1 Da -> 281,0 Da and 523,1 Da -> 506,1 Da. An external calibration was realized with the water used for the experimentation (groundwater). The limit of quantification was estimated at 0.05 $\mu g.L^{-1}$.

2.3. *Life-history traits*

The **mortality** was recorded daily and dead snails were removed from the aquaria.

Clutches were collected daily and images were acquired with a binocular microscope. The number of eggs into each clutch was counted with the image J software. The snail mortality was taken into account by calculating the number of individual—days for the whole experiment as described in Delignette-Muller et al. (2014) and as the OECD protocols (Ducrot et al. 2014, Charles et al. 2016). The **oviposition** was then calculated as the cumulated number of clutches oviposited over the experimentation divided by the number of individual—days. The **fecundity** was calculated as the cumulated number of eggs per aquaria divided by the number of individual—days.

The **feeding rate** was evaluated at days 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23 (*i.e.*, period 1) and days 33,34,35,36, 39,40,41,42 (period 2) along the experimentation. Each $i-1$ day of measurement, 30 calibrated disks (380 mm^2) of freshly washed lettuce were added into each aquar-

ium. After 24h, uneaten disks of lettuce were removed and 30 new fresh disks were added. Then, the number of disks eaten at day *i* for aquarium *j* was divided by the number of alive snails at day *i* for aquarium *j*. Hence, we estimated the number of disks eaten per individual—day by calculating the average of these values.

2.4. Markers of immunocompetence

2.4.1. Hemolymph sampling

The hemolymph collection was realized as described by Sminia (1972). By tickling the foot sole of the snail with the tip of a micropipette, a reflex mechanism is triggered. The snail retracts into its shell leading to the extrusion of hemolymph through the hemal pore. The hemolymph was then gently collected individually (*i.e.*, samples not pooled) with a micropipette. Samples were kept into 500 μl conical skirted polypropylene tubes (Dutscher, Dumath, France) and placed in ice until measurement in order to minimize cellular adhesion.

2.4.2. Flow cytometry

Flow cytometry measurements were performed on the Guava easyCyte^{TM} 6-HT apparatus (^{TM}Millipore). Every acquisition was run with the Incyte module from the GuavaSoft 2.7 software at a flow rate of 0.59 $\mu l.s^{-1}$. Note that the accuracy of counts was regularly verified using the manufacturer's calibration protocol (Guava easyCheck Kit, Hayward, CA, USA).

2.4.3. Hemocyte density

Hemocyte density was measured straightforwardly after hemolymph collection in order to minimize cell adhesion. No external substances (*e.g.*, anti-agglutinating factors) were added in order to be closer from the physiological status. First, cells were gated by size (FSC) and complexity (SSC). Then, a total of 5000 events were acquired in this live-gate and the cellular density was determined with the Incyte module. The hemocyte densities were measured at the day 0, 2, 9, 21 and 44.

2.4.4. Hemocyte viability

A volume of 100 μL of hemolymph per snail was deposited in a 96-well plate (Greiner, polystyrene, U-bottom, sterile, not treated for cell culture) and then completed with 100 μL of SSB (Snail Saline Buffer) [5 mM HEPES, 3.7 mM NaOH, 36 mM NaCl, 2mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM $CaCl_2$; 145 mosm; pH=7.9] pre-warmed at room temperature. Two microliters of propidium iodide (PI) 1 $mg.ml^{-1}$ (Sigma) were added into each well. Mixtures were homogenized with a multi-channel micropipette, plates were shielded from light and placed on a shaker under slow agitation for 10 min. PI is a lipophobic fluorescent DNA-intercalating agent. It is impermeable to the plasma membrane and stains only dead or damaged cells. Cells were visualized on FSC (log)/SSC (log) dot plots and they were live-gated by size (FSC) and RED fluorescence. A total of 2000 events were acquired in this gate. Then, the percentage of hemocyte viability was calculated as the percentage of PI-negative cells of this region (fig. 9 in supplementary materials). The hemocyte viabilities were measured at the day 0, 2, 9, 21 and 44.

2.4.5. Oxidative activity of hemocytes

The basal oxidative activity of hemocytes was evaluated (*i.e.*, ROS generation from cellular machinery metabolism) as well as the immunocompetent oxidative activity resulting from immunostimulation by zymosan particles (*i.e.*, NADPH-oxidase activity) (Adema

et al. 1993). This inducible system, known as "oxidative burst" in vertebrate species, is an important enzymatic activity responsible for the clearance of microorganisms by hemocytes via the generation of ROS (reactive oxygen species). The hemocyte oxidative activities were evaluated at the day 2 and at the day 21. The method used was the one from Boisseaux et al. (2016b). Briefly, a volume of 25 μl per animal was gently deposited onto a 96 well plate (Greiner, polystyrene, flat bottom) in duplicate for both, the basal oxidative activity and the zymosan-stimulated oxidative activity. Plates were centrifuged (100 g, 20 min), the lymph was removed and replaced by SSB (adjustments at 200 $\mu l.well^{-1}$). The stimulation of the activity consisted in an addition of zymosan (Sigma Z4250, 250 mg) of 125 $\mu g.well^{-1}$. The generation of ROS was detected by addition of the fluorescent probe H_2DCFDA (Sigma, France) at 80 μM. Measurements were done with a spectrofluorimeter (TECAN, Safire) every 2 minutes for 1 hour with EX/EM 480/530 nm wavelength settings. First, the raw fluorescence units were converted into the amount of fluorescent product dichlorofluorescein (DCF) resulting from reaction of ROS with H_2DCFDA probe. Second, the slope between 20 and 40 min of kinetics was calculated and normalized by the volume of hemolymph.

2.4.6. Phagocytosis capacity

The phagocytosis capacity consists in the capacity of hemocytes to internalize foreign microparticles (*e.g.*,, bacterias) into the intracellular compartment and so is an important immune function. It was artificially evaluated, at the day 44, as the capacity to ingest latex microbeads. First, 200 μL of hemolymph per snail were deposited in a in a 96-well plate (Greiner bio one, for cell cultures, sterile, F-bottom, polystyrene). Second, a quantity of 7.2 $.10^5$ fluorescent microbeads (polyscience YG 2.0 μm latex microsphere) were gently mixed with each sample, what corresponds to a hemocyte-to-bead ratio of 1:7 for 100 000 hemocytes. The plate was shielded from light and slowly agitated for 24h in a thermocontrolled chamber (Aqualytic, TC Serie 140G). Afterwards, hemocytes were fixed (SSB containing 0.5% of formaldehyde (v/v) and 0.2% (w/v) of sodium azide) and samples were read in the Green photomultiplicator of the flow cytometer (15 000 events were acquired per sample). Phagocytosis capacity was finally calculated as the percentage of hemocytes that engulfed at least one bead.

2.4.7. Phenol-oxidase-like activity

The phenol-oxidase-like activity plays important role in invertebrates' immunocompetence by entombing microbes into melanin capsules, reducing thereby their motility and facilitating their phagocytosis by hemocytes. This activity was evaluated at the day 9. The protocol was adapted from Seppälä and Leicht (2013). Briefly, 50 μl of hemolymph per snail were deposited in triplicates in a 96 well-plate (Greiner, polystyrene, flat bottom). A volume of 50 μl of L-DOPA (purchased from Sigma and prepared extemporaneously at 5 $mg.ml^{-1}$ of SSB) was added in the wells. The absorbance at 480 nm was measured every 2 minutes over a kinetics of 60 min. The activity was then calculated as the slope between 20-40 min (relative fluorescence units).

2.5. Statistical analysis

Software. Statistical analysis was performed with the R software (Team 2016). Graphs were realized with the ggplot2 package (Wickham 2009).

Survival. The survival plot was obtained using the survival package (Therneau 2015). Data were right-censored (as all the organisms do not die during the experiment). The logrank test was run to enquire about statistical significant difference among the survival curves of respective exposure conditions.

Reproduction. 95% confidence intervals (CI) of the mean number of clutches oviposited per individual-days (*i.e.*, oviposition) were calculated and plotted from a Poisson distribution using the pois.exact function from the epitools package (Aragon Tomas J. 2012).

Feeding rate. For each of the two periods mentioned above, the medians of each replicate was plotted with the corresponding 95% CI calculated from bootstrap simulations as recommended by Haukoos and Lewis (2005). The boot package (Canty, 2014) was used and the number of iterations was set at 999.

Hemocyte density and viability. : A logit transformation was applied to the hemocyte viability to normalize the distributions. Linear mixed-effect models (LMEM) were fitted using the lmer function from the lme4 package (Bates et al. 2015). They were first built with one fixed factor, the exposure condition, one covariate, the day, and two nested random factors, the snail and the replicate (aquarium). The impact of the exposure condition was only considered in an interaction term with the day, as there cannot be any impact of the exposure condition at starting the experiment (*i.e.*, day 0), but an effect of the condition over time (*i.e.*, interaction of respective effects).

Oxidative activities. A log10 transformation to the data of oxidative activity was applied. LMEM were employed to fit the oxidative activity datasets. For better clarity in interpretation and because the activity was evaluated at only 2 dates, we decided to build separate models for the day 2 and the day 21. Thus, no snail random effect has been included because it would not make sense anymore. LMEM were first built with two fixed factors, the "zymosan" and the "exposure condition", and one random factor, the replicate (aquarium). The interaction between the exposure condition and the zymosan was included in the initial models.

Phenol-oxidase-like activity. LMEM were first built with one fixed factor, the "exposure condition", and two nested random factors, the "replicate" and the "batch" resulting from technical source of variation during handling that may have been added to samples (*i.e.*, factor with two modalities "first" and "second"). Indeed, the first batch was measured in the morning with freshly prepared L-DOPA solution, while the second was measured in the afternoon with another freshly prepared L-DOPA solution. The "replicate" and the "batch" random effects are nested since all samples from each aquarium replicate were included in the same batch.

Phagocytosis capacity. A logit transformation was applied to the phagocytosis capacity in order to normalize the distributions. LMEM were first built with one fixed factor, the "exposure condition", and one random factor, the "replicate".

Interpretations. Homoscedasticity of residuals and normality of distributions of residuals and of random effects of all LMEMs were visually verified using plots of residuals and quantile-quantile plots of residuals and random effects (supplementary materials). Each model mentioned above was simplified by removing the effects that did not appear significant. An effect was considered

Table 1: Description of immune effects and semantic uses

Exposure condition	Measured concentration of DTM ($\mu g.L^{-1}$)
Dmso control	not detected
DTM 0.1 $\mu g.L^{-1}$	0.23 (sd=0.23)
DTM 1 $\mu g.L^{-1}$	1.24 (sd=0.73)
DTM 10 $\mu g.L^{-1}$	7.15 (sd=1.39)

statistically significant when the 95% CI of its coefficient did not contained 0.

3. Results

3.1. Chemical analysis

The DTM concentrations in water samples were in the expected order of magnitude (Table 1). Concentrations were a bit lower for the 10 $\mu g.L^{-1}$ nominal concentrations.

3.2. Life-history traits

The survival rates of snails into the groups were plotted (fig. 1). At the end of the 44 days of implementing test period, a proportion of 80% of snails survived in the water and dmso controls, what comforts us to statistically analyze the differences between the exposure conditions. No mortality has been recorded for the exposure condition DTM at 10 $\mu g.L^{-1}$. The confidence intervals (CI) (graph not shown) were quite important within all exposure conditions. The statistical logrank test resulted in a non-significant difference between the exposure conditions. Thus, we assume that differences in snail survivals cannot be attributed to the presence of the DTM.

Figures 2 A and B do not show effects of the DTM on the reproductive parameters evaluated. The oviposition seemed to be slightly reduced for the dmso control but the 95% CI are quite big and overlapping each other's. The fecundity seemed also to be slightly reduced for the dmso control group. The inter-replicate variability (*i.e.*, inter-aquarium) is important. Due to the non-Gaussian nature of data, strong inter-replicate variability and lack of strong effects of exposure condition observed on figure 2, we did not develop models to statistically analyze those data. We assume that differences in the snail reproductive outputs cannot be attributed to the DTM in the present study.

Figure 3 does not show feeding rate inhibition due to the exposure of DTM. During the first period (fig. 3A) the feeding rate was similar in all conditions and aquaria. During the second period (fig. 3B), the feeding rate was diminished by approximately a third for all conditions compared to the water control condition. However, because the dmso control condition was reduced in a similar way, this decrease cannot be attributed to the exposure of DTM in other conditions that contained the same dmso proportions (*i.e.*, 0.004%). Due to the non-Gaussian nature of data, strong inter-replicate variability and lack of strong effects of exposure condition observed on figure 2, we did not develop models to statistically analyze those data. We assume that differences in feeding rate cannot be attributed to the exposure of DTM in the present study.

3.3. Markers of immunocompetence

3.3.1. Immunocapacity

Hemocyte density. The mean estimate of hemocyte density over the experimentation was 555.9 $cells.\mu l^{-1}$ (95% CI 526.1 - 585.8) (Table 2 in supplementary materials). These values are slightly higher than a previous study, carried out on a population reared at our labora-

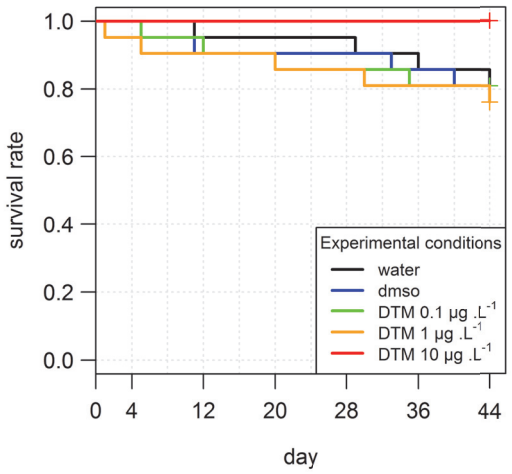


Figure 1: Snail survival

tory, for which we calculated a mean estimate of 516.1 $cells.\mu l^{-1}$ (95% CI 482.1 -550.1). Hemocyte density of individual snails does not seem reduced for a particular exposure condition (fig. 4) compared to the water control group. Statistical linear mixed-effect model (LMEM) suggested a significant effect of the day of -2.5 $cells.\mu l^{-1}$.day-1 corresponding to a small decrease of hemocyte density with time, around 100 $cells.\mu l^{-1}$ on 44 days. No significant effect of the interaction between the day and the exposure conditions were suggested from the LMEM analysis. Thus, the results do not depict impacts of the DTM on hemocyte density. The standard deviation (sd) of residuals from random effects, interpreted as the intra-individual variability (*i.e.*, over time), was estimated to 147.5 $cells.day^{-1}$ which is higher than the variability of the random snail effect (*i.e.*, inter-individual) for which the sd is estimated at 79.6 $cells.snail^{-1}$.

Hemocyte viability. The mean estimate of logit transformed hemocyte viability was 0.68 (95% CI 0.44-0.93) which corresponds to a proportion of cell viability of 66% (95% CI 60-71). These values are quite lower than a previous study carried out on a population reared at our laboratory for which we determined a mean estimate of hemocyte viability of 86% (95% CI 83-88). However, none of the exposure conditions did affect the hemocyte viability of individual snails compared to the water and dmso controls (fig. 5). LMEM does not suggest a significant interaction of the day with the exposure condition (Table 3 in supplementary materials).

3.3.2. Immunoefficiency

Oxidative activities. Figure 6 shows the hemocyte-related oxidative activity of snails under basal and zymosan-stimulated ex vivo conditions among the aquaria exposure conditions. At the day 2, the variability of basal and stimulated oxidative activities of the 0.1 $\mu g.L^{-1}$ and 10 $\mu g.L^{-1}$ of DTM exposures are higher than the control's. The median of the 0.1 $\mu g.L^{-1}$ DTM condition is higher than the control. LMEMs do not suggest any significant differences among the exposure conditions. At the day 21, the variability of stimulated oxidative activities seems globally higher than the ones at the day 2, particularly for the dmso controls. We observe a sharp decrease in the stimulated oxidative activity for the 10 $\mu g.L^{-1}$ DTM condition. LMEMs suggest that the unique exposure condition significantly different from controls is the DTM at 10 $\mu g.L^{-1}$ for the interaction between the fixed effects "zymosan" and "exposure condition" (Table 3 in supplementary materials). However, an important inter-replicate (*i.e.*, between aquaria) variability occurred and the residuals from the LMEM at the day 21 (figure 15 in supplementary materials) indicate a deviation from normality, although independent from the exposure condition, which may interrogate the

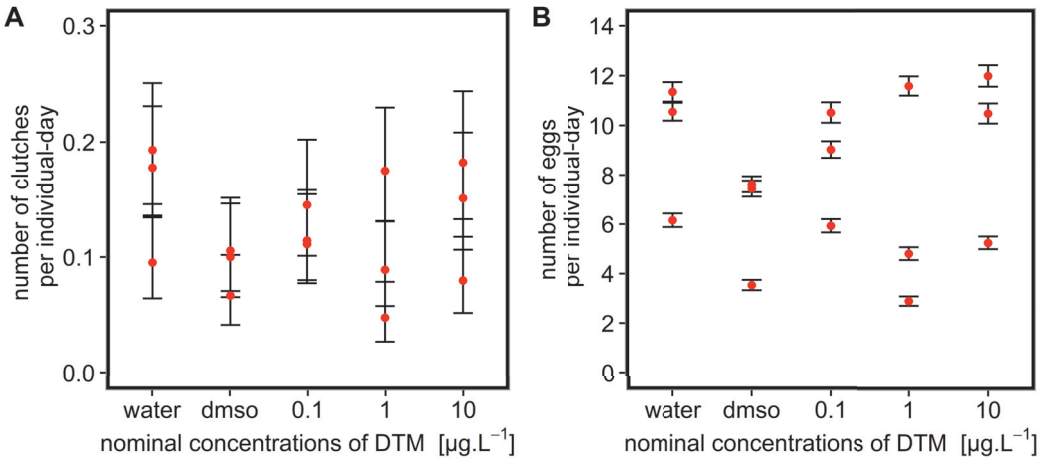


Figure 2: Reproduction outputs into the replicates of the respective experimental conditions

The red dots represent the mean - over a period of 6-weeks of experimentation- of the oviposition (A) and the fecundity (B). The error bars represent the 95% confidence interval calculated from a Poisson distribution.

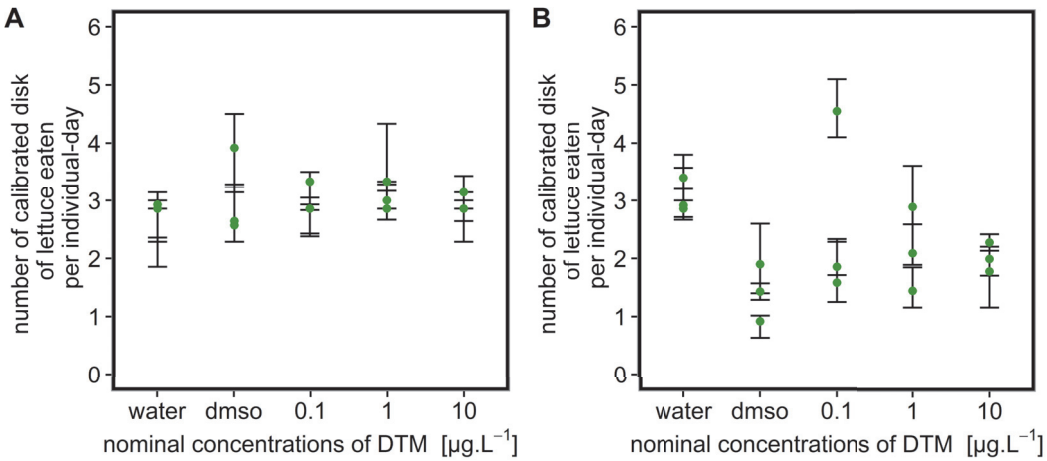


Figure 3: Feeding rate into the aquariums of the respective experimental conditions

The graphs represent the feeding rate of snails per aquarium over the weeks 2 and 3 (A) and over the weeks 5 and 6 (B) of the implementing 6-weeks test period. Each green dot represents the median of 8 days of data recording. The error bars represent the 95% confidence interval of the median calculated with the Wilcoxon test from a non-normal distribution data.

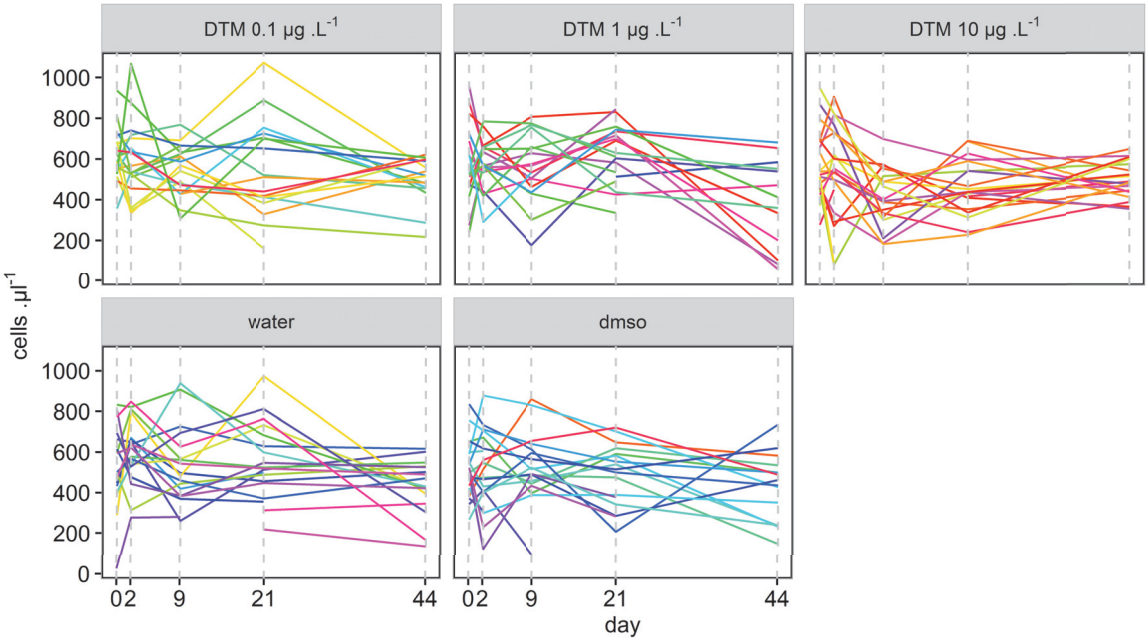


Figure 4: Evolution of individual hemocyte density

Each solid line represents the individual snail time-course evolution of its hemocyte density into the groups of DTM exposure. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) not interpretable flow cytometric data or (iii) snail that did not extrude hemolymph (*i.e.*, no retraction reflex). The vertical grey and dashed lines correspond to the days of hemocyte density quantification.

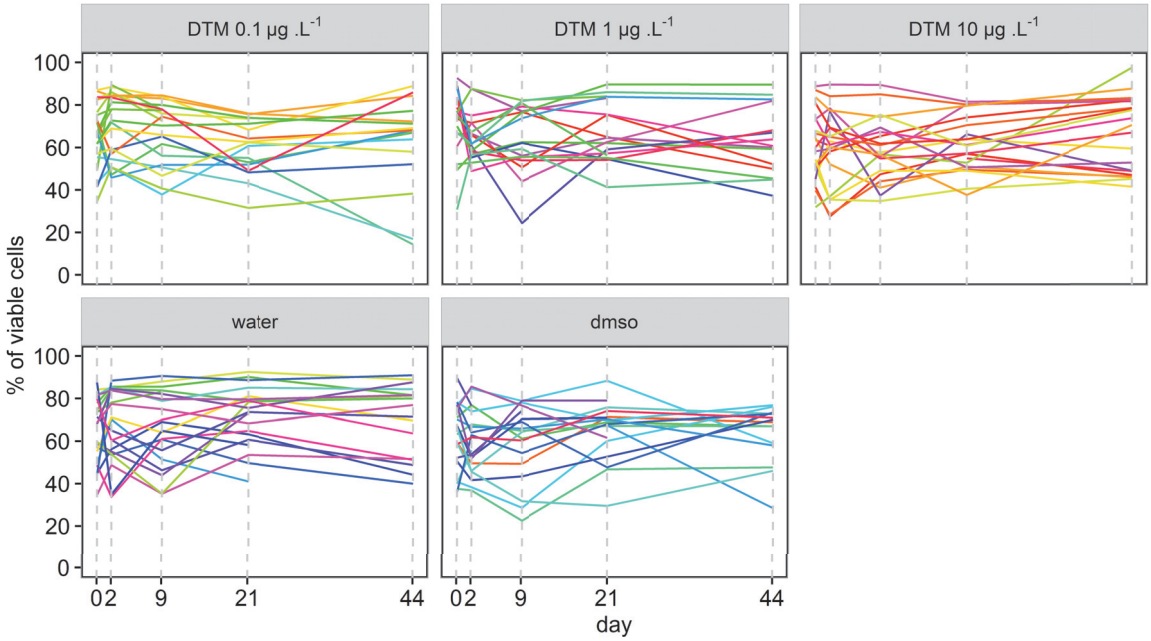


Figure 5: Evolution of individual hemocyte viability

model validity.

Phenol-oxidase-like activity. Figure 7A shows the phenol oxidase-like activity of hemolymph samples from snails at the day 9. We observe a slight dose-response upward trend. LMEMs suggest that the unique exposure condition being significantly different from the control group is the DTM at 10 $\mu g.L^{-1}$.

Phagocytosis. Figure 7B shows the phagocytosis capacity of snails at the last day of experimentation (*i.e.*, day 44). The dmso control and the DTM 1 $\mu g.L^{-1}$ conditions are higher than the water control condition. However, statistical inferences did not suggest any significant difference among the conditions.

4. Discussion

The water quality criteria (*i.e.*, temperature, conductivity, pH, dissolved oxygen, cation ammonium) according to OECD protocols from Ducrot (2014) were all met. The flow-through system utilized herein appeared to be particularly justified because snails were sourced from a river (continuous water renewal by opposition to ponds) and because we aimed at expose snails to constant concentrations of DTM. Exposure concentrations were lower than expected for the 10 $\mu g.L^{-1}$ nominal DTM exposure. Hence the sensitivity of effects observed on immune traits is likely higher than considerations at the nominal DTM exposures. The LMEMs took into account the inter-replicate effects within the statistical analysis to backup possible bias resulting from technical differences in real concentration exposures among replicates.

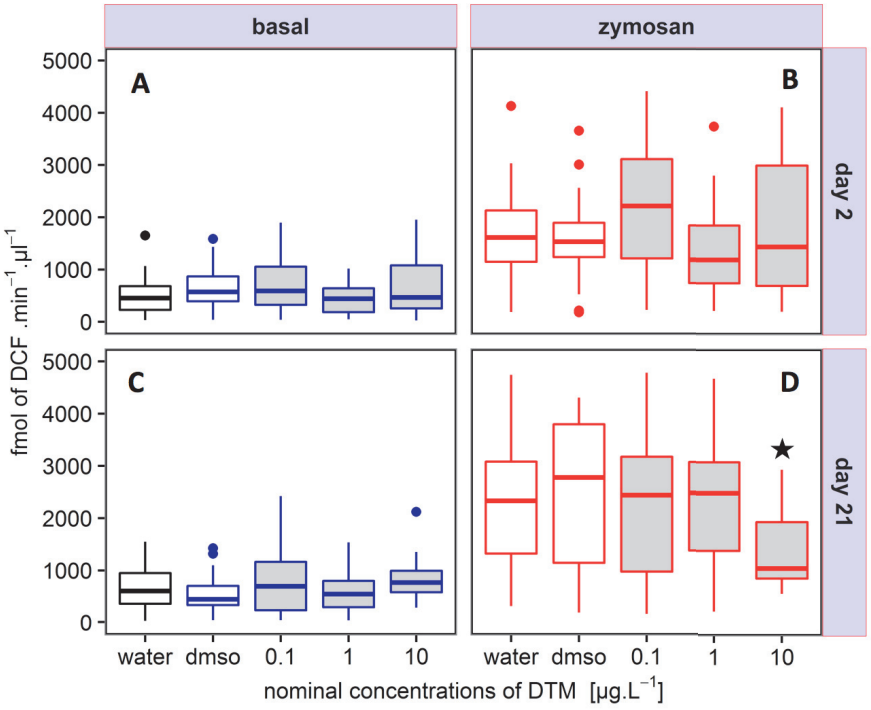


Figure 6: Hemocyte-related oxidative activities

The individual snail hemocyte-related oxidative activities were evaluated at the day 2 (A and B) and at the day 21 (C and D). For every snail and on both days of measurement, the activities were assessed under their basal status (A and C) and also under ex vivo stimulation with zymosan particles (B and D). Data are expressed in amount of converted fluorescent product DCF (dichlorofluorescein) per minute per μl of hemolymph. The black star suggests a significant difference compared to the water condition.

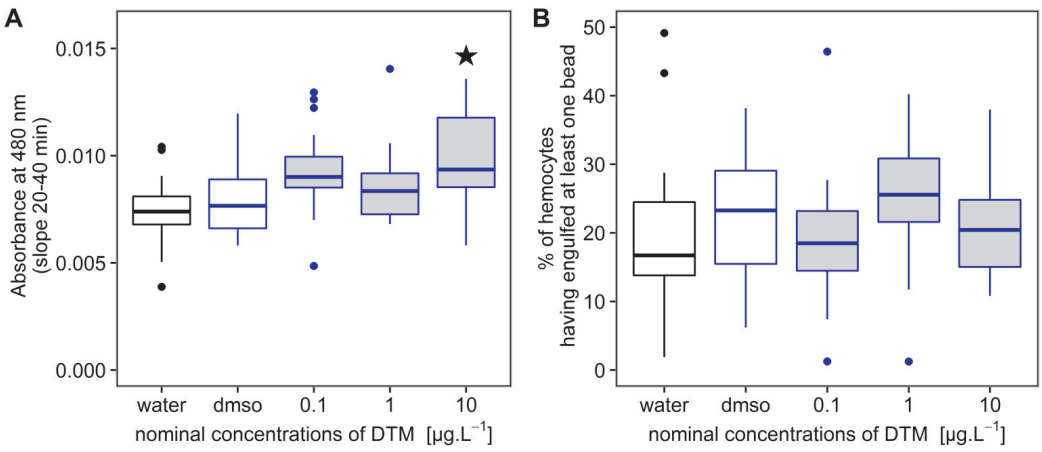


Figure 7: Phenol-oxidase-like activity (A) and Phagocytosis capacity (B)

The phenol-oxidase-like activity of snails at the day 9 (A) of the implementing exposure period was evaluated by spectrofluorimetry. Only the condition of nominal 10 $\mu g.L^{-1}$ resulted in a statistical significant difference compared to the control without carrier solvent. The phagocytosis capacity of hemocytes from snails at the day 44 (B) was evaluated by flow cytometry.

The dmso controls seemed to have an effect on the reproduction outputs as well as on the feeding rate. The proportion was set at 0.004% because the common recommendation for aquatic ecotoxicity tests (*e.g.*, OECD guidelines) is to be lower than 1 mL of solvent per liter of water medium (*i.e.*, 0.01% of carrier solvent). The necessity to use solvents in ecotoxicology is debated for several reasons. On the one hand, many detractors argue that the use of carrier solvent, even for xenobiotics with little hydrosolubility, do not mimic the fate of the molecule in natural environments (*e.g.*, pesticide sprays). On the other hand, the use of carrier solvent is closer to the worst case scenario (*i.e.*, maximization of chemical entrance into the body) from natural environments where the molecule may interact with other xenobiotics (*i.e.*, surfactants, emergent molecules, etc) that may exert synergistic effects.

L. stagnalis is known to host a myriad of parasites and most of the populations in natural environments are parasitized. The snails were collected on the field (fig. 8 in supplementary materials). We observed external saprophytes nematodes but no parasites of *L. stagnalis* have been observed. Hence, without clues of parasitism, we cannot consider them as being parazited. The parazitation in environmental immunotoxicology may constitute a confounding factor (Minguez et al. 2012). The xenobiotic will have a toxic action on both, the host and the parasites. Hence, the sensitivities of the respective protagonists toward which xenobiotic they are exposed may lead to drastically dissimilar host immunocompetences. In *L. stagnalis* we know that the infection with trematodes led to a modulation of immune resources (Van der Knaap et al. 1987, Hoek et al. 1996).

The non-functional markers of immunocompetence defined here as constituting the bottom line of defense (*i.e.*, immunocapacity) were not affected by the expo-

sure to DTM. No immunosuppression was observed. Functional markers such as the oxidative activities from hemocytes and the phenol-oxidase-like activities were affected. This indicates possible loss in the capacity to destruct phagocytized pathogen and so an impaired immunocompetence. Similarly, Russo et al. (2007) observed a reduction in the hemocyte "oxidative burst" responsiveness to E. Coli stimulation when *L. stagnalis* was exposed to the herbicide fomesafen. Significant effects were observed for exposure concentrations ranging from 10 $\mu g.L^{-1}$ to 270 $\mu g.L^{-1}$. Regarding the hemolymph phenol-oxidase-like activities, Seppälä and Leicht (2013) observed that pathogen molecular patterns did affect the phenol-oxidase activity of hemocytes in *L. stagnalis*. It is well known that phenol-oxidases from immune cells are essential immune function in invertebrates. They will entomb the pathogen in melanin capsule, limiting thereby the target mobility and facilitating its phagocytosis by hemocytes. The present study reports the stimulation of this activity by an immune elicitor of non-biological nature (*i.e.*, deltamethrin). The stimulation of phenol-oxidases (PO) in response to xenobiotics had been observed in other studies (Bado-Nilles et al. 2008, Mottin et al. 2010, Arambourou and Robby 2015). Many clues underline the protective capacity of melanins to tissues against chemical toxicity (Fogarty and Tobin 1996, Roberto et al. 1996, Svensson et al. 2003, Bridelli et al. 2006). The patterns of PO responses in ecotoxicology deserve to be further studied, particularly in environmental immunotoxicology since the PO-like activities would be implied in both, immunocompetence and tissue protection. Complex interaction between chemical-PO stimulations and pathogen susceptibility are likely occurring (Nosanchuk and Casadevall 2003, 2006).

The main purpose of the study was to evaluate the impact of DTM on markers of immunocompetence in *L. stagnalis* and compare with life-history traits. None of the life-history traits differences among the exposure conditions can be attributed to the presence of DTM at the low environmental concentrations tested. A study from Caquet et al. (2007) on macrobenthic communities in mesocosm ponds artificially contaminated with DTM did not report negative effects on *L. stagnalis* population over a period of 14-month. This, strengthens the confidence that DTM exerts a weak toxicity to *L. stagnalis*. Nonetheless, Présing (1993) did observed important effects on survival for offsprings (*i.e.*, second generation) of *L. stagnalis* that were exposed to K-Othrine (with DTM as active ingredient) from 1 to 100 $\mu g.L^{-1}$. It brings the conclusion that the DTM toxicity was of cumulative nature. (i) If we focus on the survival at first generation, DTM exposures did not led to negative impact. (ii) If we focus on the reproduction or feeding rate, negative impacts were not observed. (iii) If we study only the first generation, few markers of immunocompetence were modulated. They may constitute early warning markers of DTM presence and/or physiological disturbance. Such assertions remain insufficiently demonstrated and further investigations are required to better understand the sensitivity of immunomarkers to xenobiotic exposures in an ecotoxicological context. Notably, their evolution should be put in perspective with life-history traits being affected by the presence of contamination. Plus, the drop of immunocapacity (*e.g.*, immunosuppression), whether it is transient (i.e hemocytoponia) whether more prolonged, should be put in perspective with the apparition of modulation of functional immunomarkers. It is known that the immune system takes part of the energy allocation bud-

get and so trade-offs with other physiological functions are expected. For example, differences in life-history traits have been correlated to differences in immunoresponses and so immune strategies in land snails (Russo and Madec 2011, 2013). We may hypothesize that little immunotoxicity due to chronic xenobiotic exposure will lead to important modulation in life-history traits in the very long-term with further uncontrolled negative consequences at the population level.

5. Conclusion

The pyrethroid pesticide Deltamethrin exerts likely immunotoxicity in the freshwater snail *L. stagnalis* on the very long-term. The immunoefficacity was affected by the presence of the pesticide. The relationship between life-history traits and markers of immunocompetence should be further investigated in order to better understand their respective sensitivities to xenobiotic exposures.

Acknowledgements

We thank Barbara Giroud and Gaëlle Daniele (Institut des Sciences Analytiques, Lyon-Villeurbanne) for the dosage of DTM in water samples. We are also grateful to the "Région Rhône-Alpes" which provided financial support to Paul Boisseaux in a PhD program fellowship.

References

Voir à la fin du manuscrit.

Supplementary material

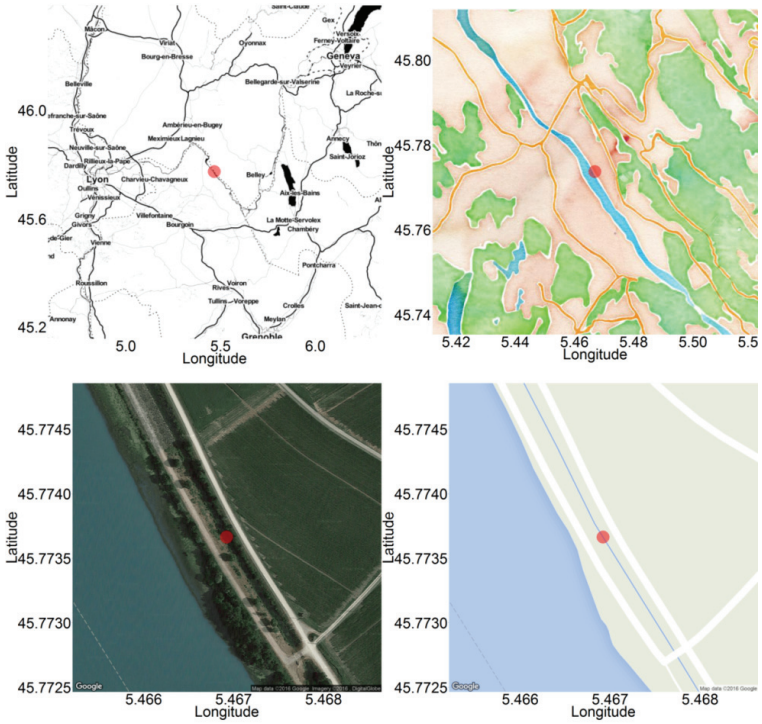


Figure 8 : Location of snails collected

The snails were collected in natural environment in a bypass channel of the Rhône river in the city of Briord (France) (long/lat 5.466922/45.773662). We used scuba diving in order to ameliorate the visibility and rate of collection of snails stretching in macrophytes.

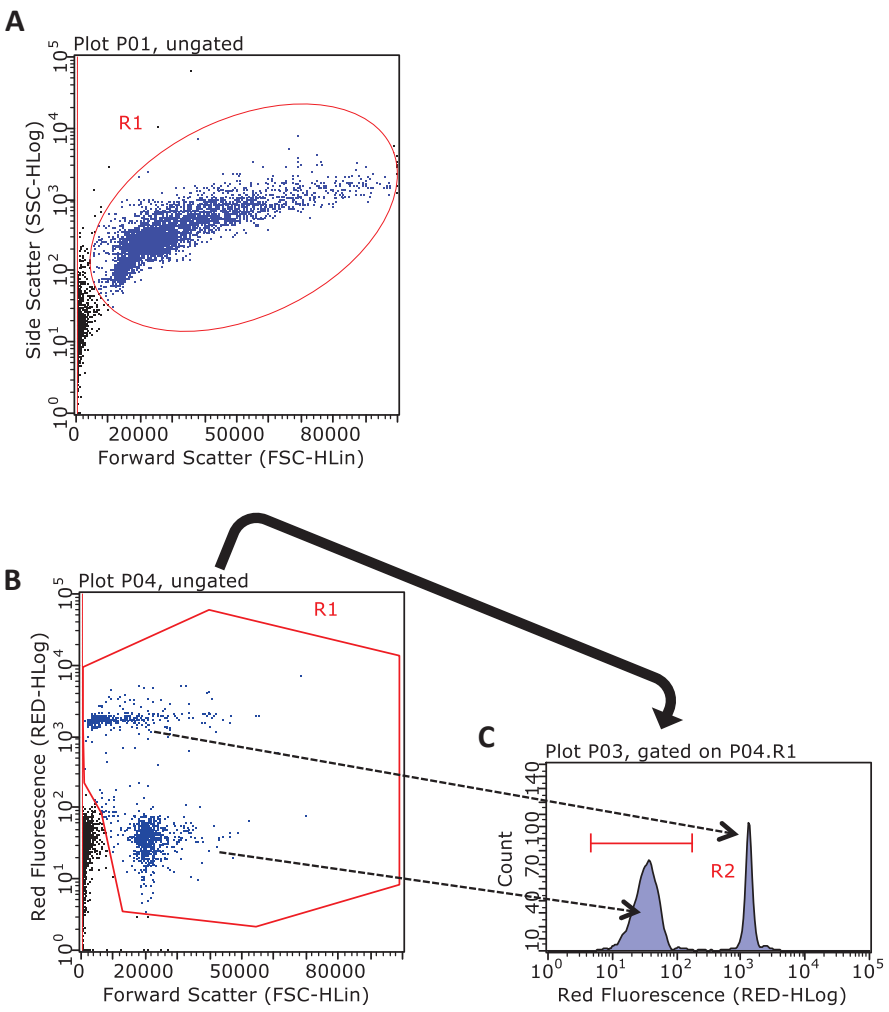


Figure 9: Flow cytometric dot plots

The hemocyte density was calculated from the acquisition of 5000 events in the live-gate R1 (A). The hemocyte viability was determined separately by acquisition of 2000 events in the live-gate R1 (B) after the addition of the lipophobic RED-fluorescent DNA-intercalating agent propidium iodide. The proportion of viable hemocytes was then calculated as the proportion of PI-negative cells (i.e. region R2 from the graph C) gated on the region R1.

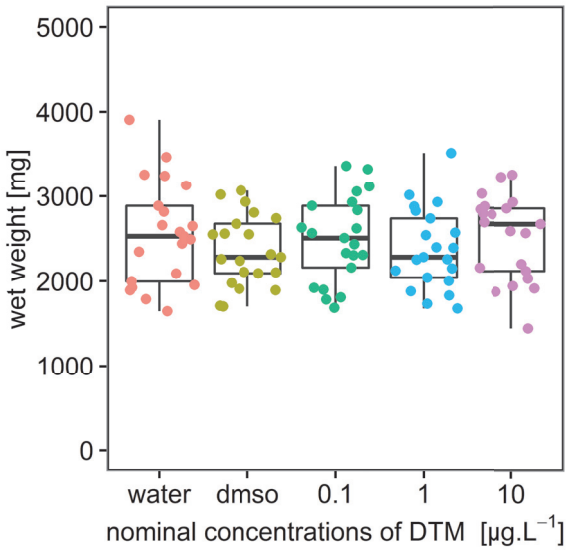


Figure 10 : Snail calibration

Homogeneity of snails' wet weights was verified at starting the experiment.

Table 2 : Details of the model retained* to describe the hemocyte density datasets

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	79.65	57.75	103.64	-
	Replicate [inter aquarium effect]	33.72	0.00	65.14	-
	Residuals [intra-individual effect]	147.50	137.10	158.84	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	555.90	526.14	585.80	37.19
	day	-2.47	-3.33	-1.60	-5.64

*** R formula : lmer(density ~ day + (1| replicate/snail))**

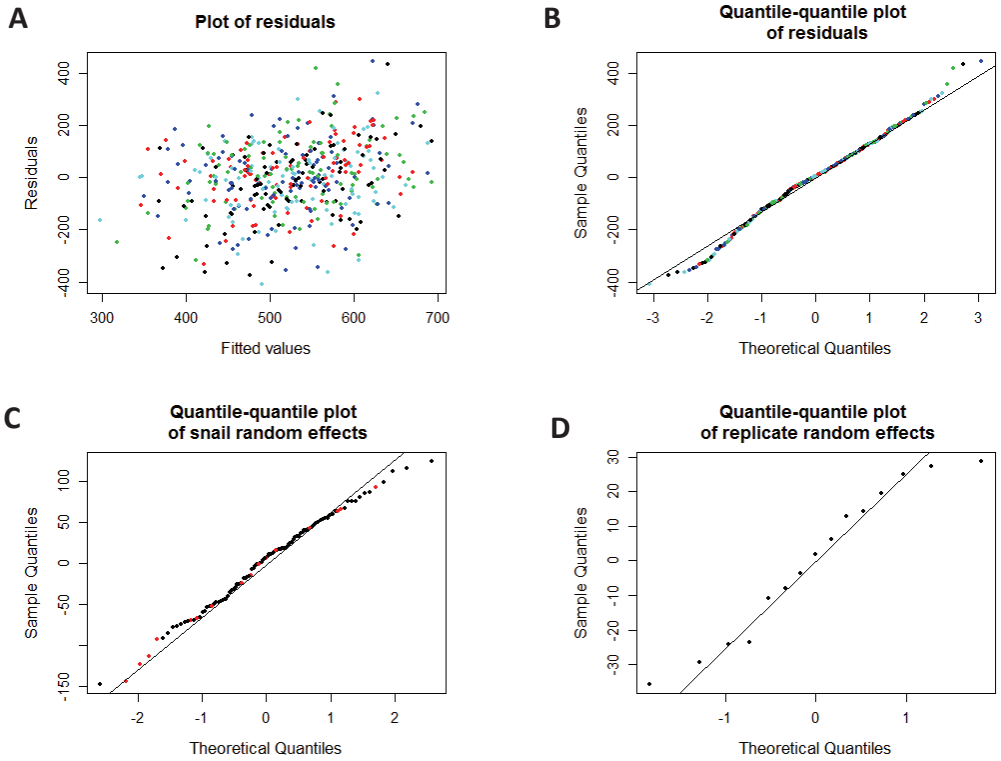


Figure 11 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte density model

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: Red dots correspond to snails that died at some point during the experiment. The normal distribution assumption of snail random effects is reasonable. The scarce outlier dots are not all red and so the snail vital prognostic is unlikely the reason of their deviation from normality. D: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

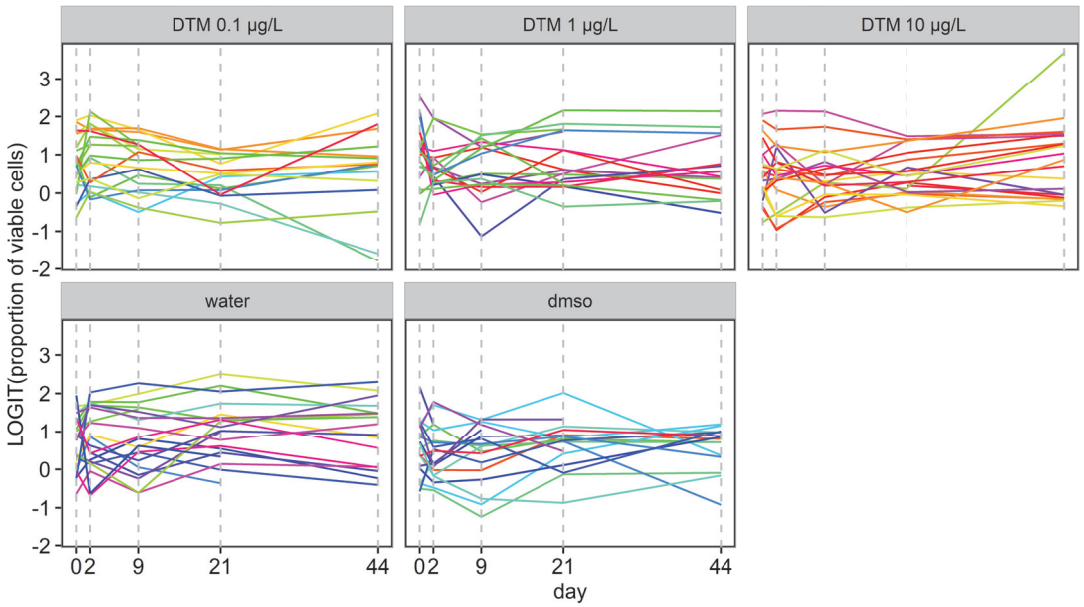


Figure 12 : Evolution of individual hemocyte viability (LOGIT transformation)

The proportions of viable cells were transformed with a *logit* function. Each solid line represents the individual snail time-course evolution of its hemocyte viability into the groups of DTM exposure. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) not interpretable flow cytometric data or (iii) snail that did not extrude hemolymph (i.e. no retraction reflex). The vertical grey and dashed lines correspond to the days of hemocyte density quantification.

Table 3: Details of the model retained* to describe the hemocyte viability datasets

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	0.37	0.29	0.45	-
	Replicate [inter aquarium effect]	0.44	0.29	0.66	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.50	0.47	0.54	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	0.68	0.44	0.93	5.61

*** R formula : lmer(logit.viability ~ 1 + (1 | replicate/snail))**

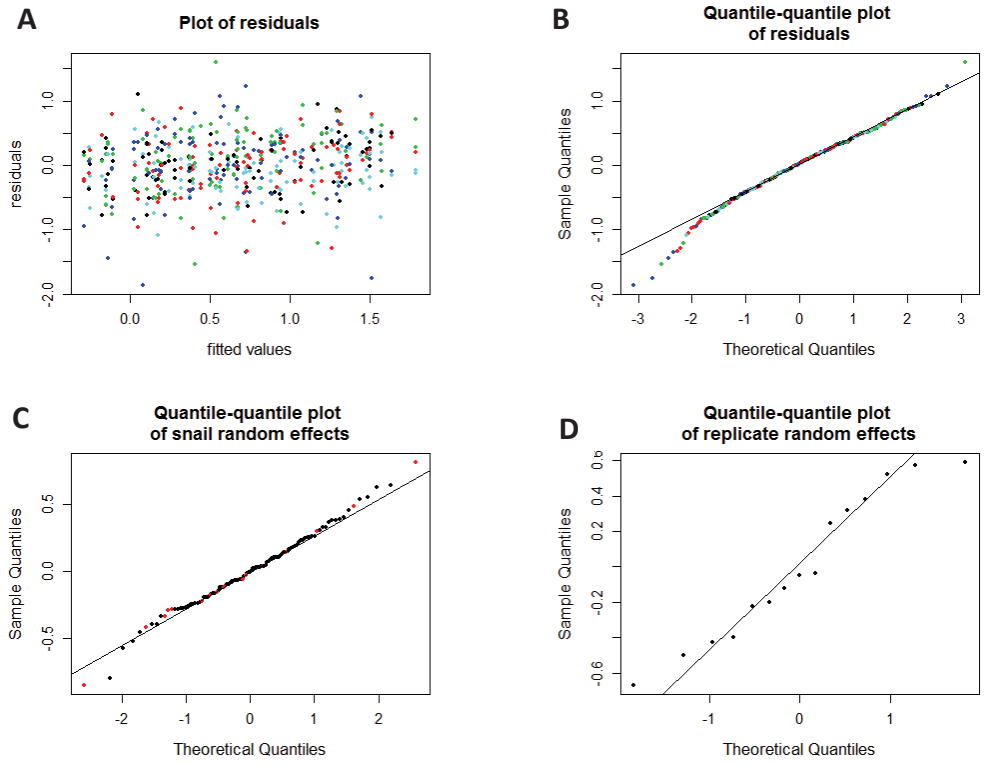


Figure 13 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte viability model

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: Red dots correspond to snails that died at some point during the experiment. The normal distribution assumption of snail random effects is reasonable. The scarce outlier dots are not all red and so the snail vital prognostic is unlikely the reason of their deviation from normality. D: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

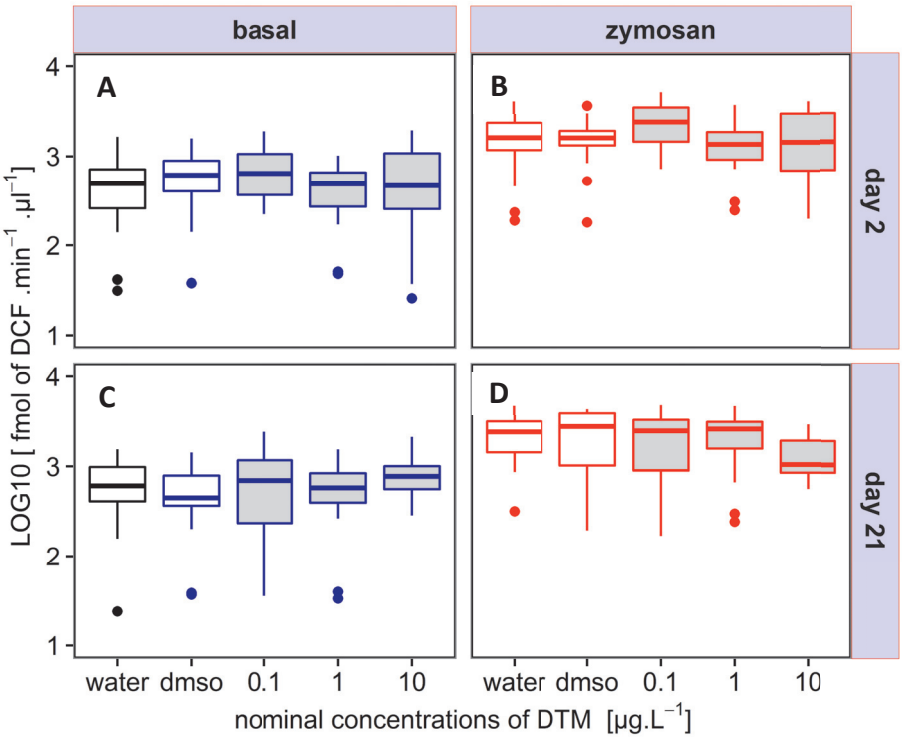


Figure 14 : Individual hemocyte-related oxidative activity (LOG_{10} transformation)

The values were transformed by a $\log_{10}$ function. The hemocyte-related activity was evaluated at the **day 2 (A and B)** and at the **day 21 (C and D)**. For every snail and on both days of measurement, the activity was assessed in the **basal status (A and C)** and also with the stimulation by **zymosan particles (B and D)**.

Table 3: Details of the model retained* to describe the hemocyte oxidative activities datasets for the day 21

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Aquarium replicate [inter-aquarium effect]	0.15	0.00	0.20	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.39	0.34	0.43	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	2.74	2.52	2.96	21.78
	zymosan	0.57	0.32	0.81	4.49
	Exposure conditions :				
	Dmso control	-0.16	-0.46	0.16	-0.87
	DTM 0.1 µg.L^{-1}	-0.06	-0.37	0.25	-0.32
	DTM 1 µg.L^{-1}	-0.15	-0.46	0.16	-0.84
	DTM 10 µg.L^{-1}	0.14	-0.16	0.44	0.80
	Interactions zymosan and exposure conditions :				
	zymosan and dmso	0.06	-0.29	0.42	0.34
	zymosan and DTM 0.1 µg.L^{-1}	-0.06	-0.41	0.30	-0.32
	zymosan and DTM 1 µg.L^{-1}	0.12	-0.24	0.47	0.64
	zymosan and DTM 10 µg.L^{-1}	-0.36	-0.70	-0.02	**-2.04**

*** R formula : lmer (ROS.log ~ zymosan + condition + zymosan:condition + (1 | replicate))**

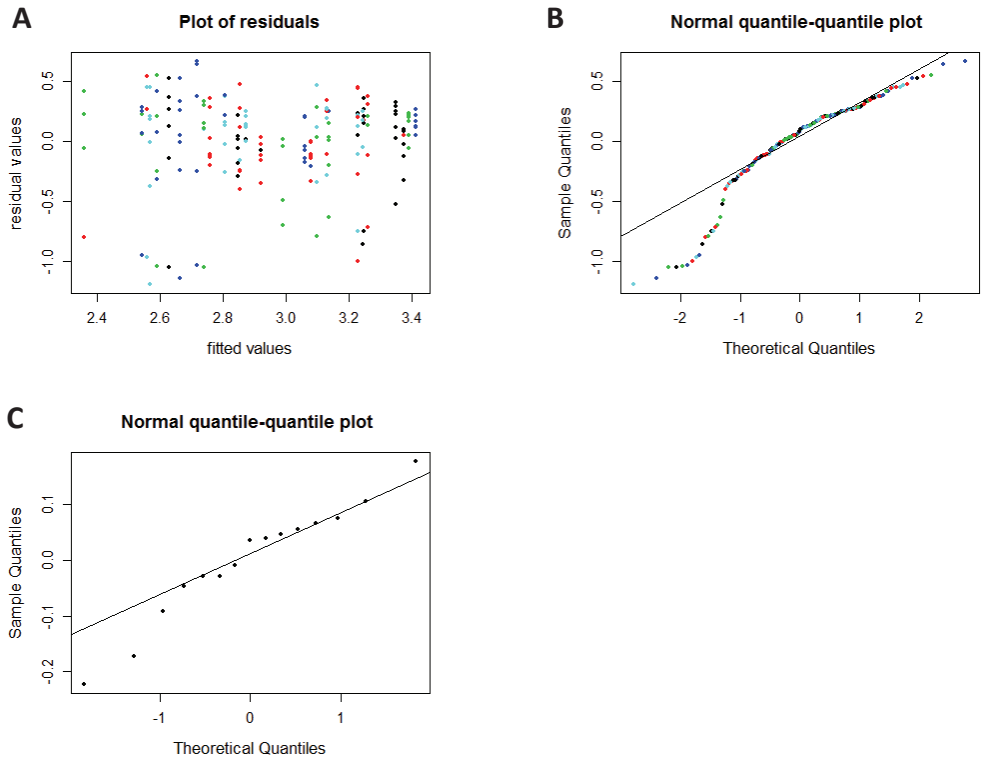


Figure 15 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte oxidative activities for the day 21

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals may be discussed since the lower outliers are importantly afar from the normal values. However, they do not correspond to only one color (i.e. not one condition) and so the possible bias would rather be independent from the exposure condition. C: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

Table 3: Details of the model retained* to describe the phenol-oxidase-like datasets

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	96-well replicate [inter-plate effect]	$0.99 .10^{-3}$	$0.28 .10^{-3}$	$1.4 .10^{-3}$	-
	Aquarium replicate [inter aquarium effect]	$0.73 .10^{-3}$	$0.00 .10^{-3}$	$2.4 .10^{-3}$	-
	Residuals [inter-individual effect]	$1.59 .10^{-3}$	$1.37 .10^{-3}$	$1.89 .10^{-3}$	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	$7.57 .10^{-3}$	$6.02 .10^{-3}$	$9.22 .10^{-3}$	8.74
	Exposure conditions :				
	Dmso	$0.34 .10^{-3}$	$-1.32 .10^{-3}$	$2.27 .10^{-3}$	0.34
	DTM 0.1 µg.L^{-1}	$1.64 .10^{-3}$	$-0.01 .10^{-3}$	$3.55 .10^{-3}$	1.67
	DTM 1 µg.L^{-1}	$0.89 .10^{-3}$	$-0.77 .10^{-3}$	$2.82 .10^{-3}$	0.90
	DTM 10 µg.L^{-1}	$2.30 .10^{-3}$	$0.60 .10^{-3}$	$4.05 .10^{-3}$	**2.36**

*** Rformula : lmer (PO ~ r.condition + (1 | batch/replicate))**

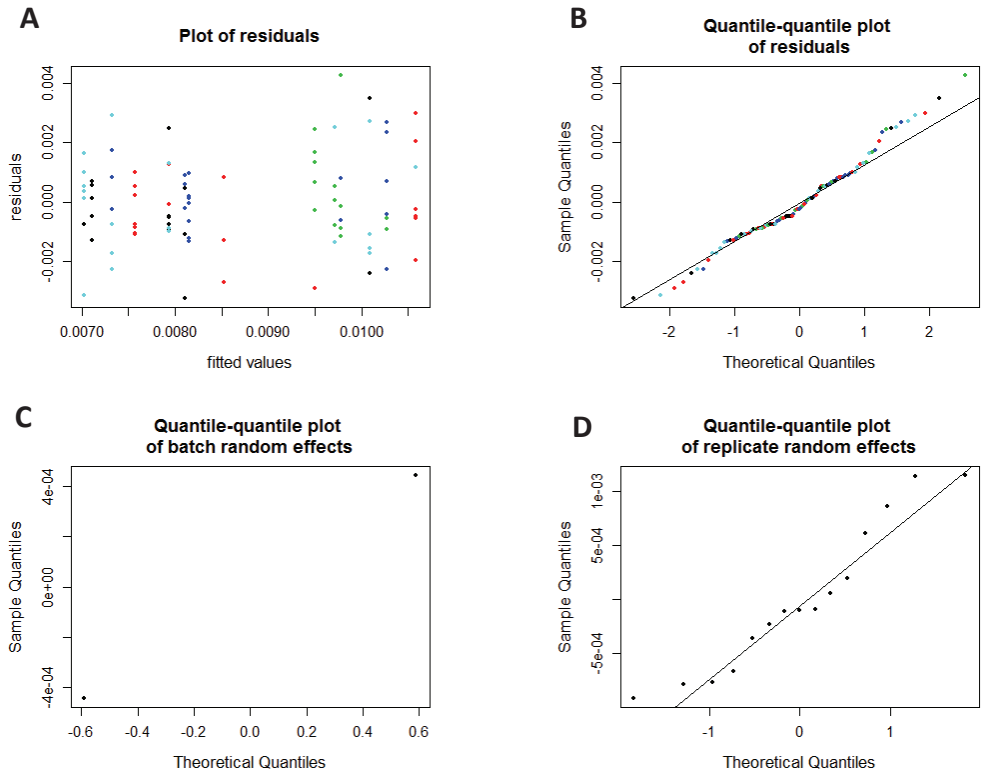


Figure 16 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the phenol-oxidase-like activity

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. Two clusters are observed (i.e. left and right); they correspond to the batch effect which was taken into account in the model. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. The upper outliers do not correspond to one particular color. C: The points correspond to the two batches of measurement. D: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

Table 4: Details of the model retained* to describe the phagocytosis datasets

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Aquarium replicate [inter aquarium effect]	0.16	0.00	0.33	-
	Residuals [inter-individual effect]	0.84	0.71	0.96	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	-1.71	-2.11	-1.32	-7.68
	Exposure conditions :				
	Dmso	0.34	-0.23	0.90	1.06
	DTM 0.1 µg.L^{-1}	0.27	-0.28	0.84	0.84
	DTM 1 µg.L^{-1}	0.50	-0.06	1.08	1.55
	DTM 10 µg.L^{-1}	0.32	-0.21	0.85	1.08

*** R formula : lmer (logit.phagocytosis ~ condition + (1 | replicate))**

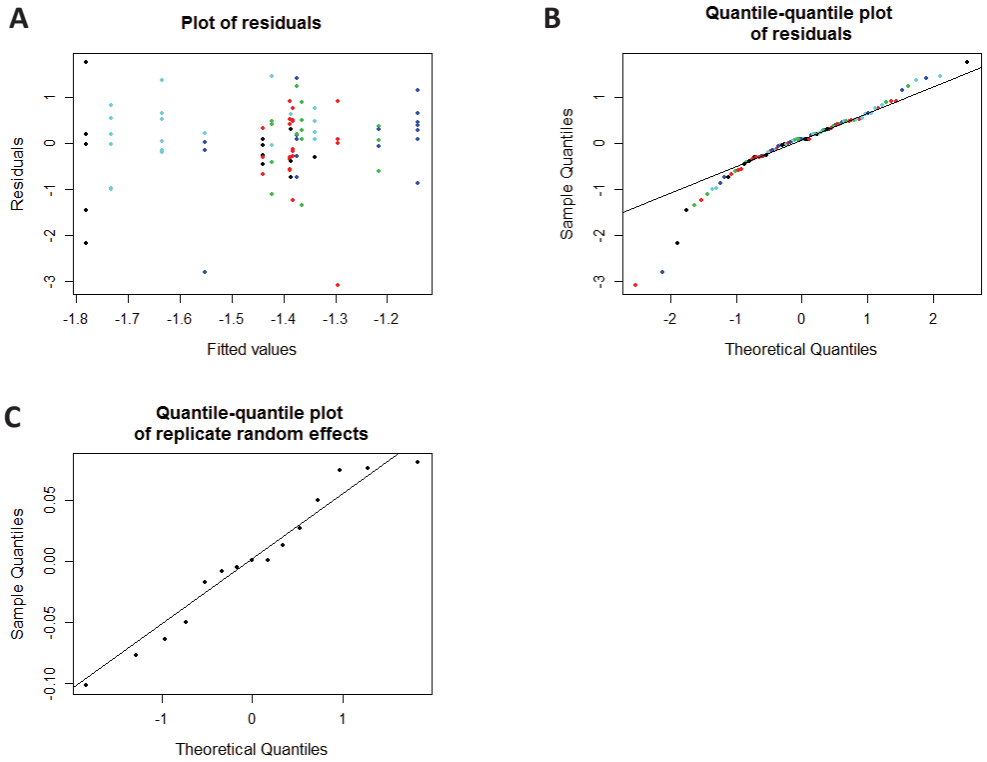


Figure 17 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the phagocytosis activity

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. The few lower outliers are not all from the same color. C: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

Des nématodes ont été observés dans les *feces* des organismes au cours de l'expérience (fig. 5.2).

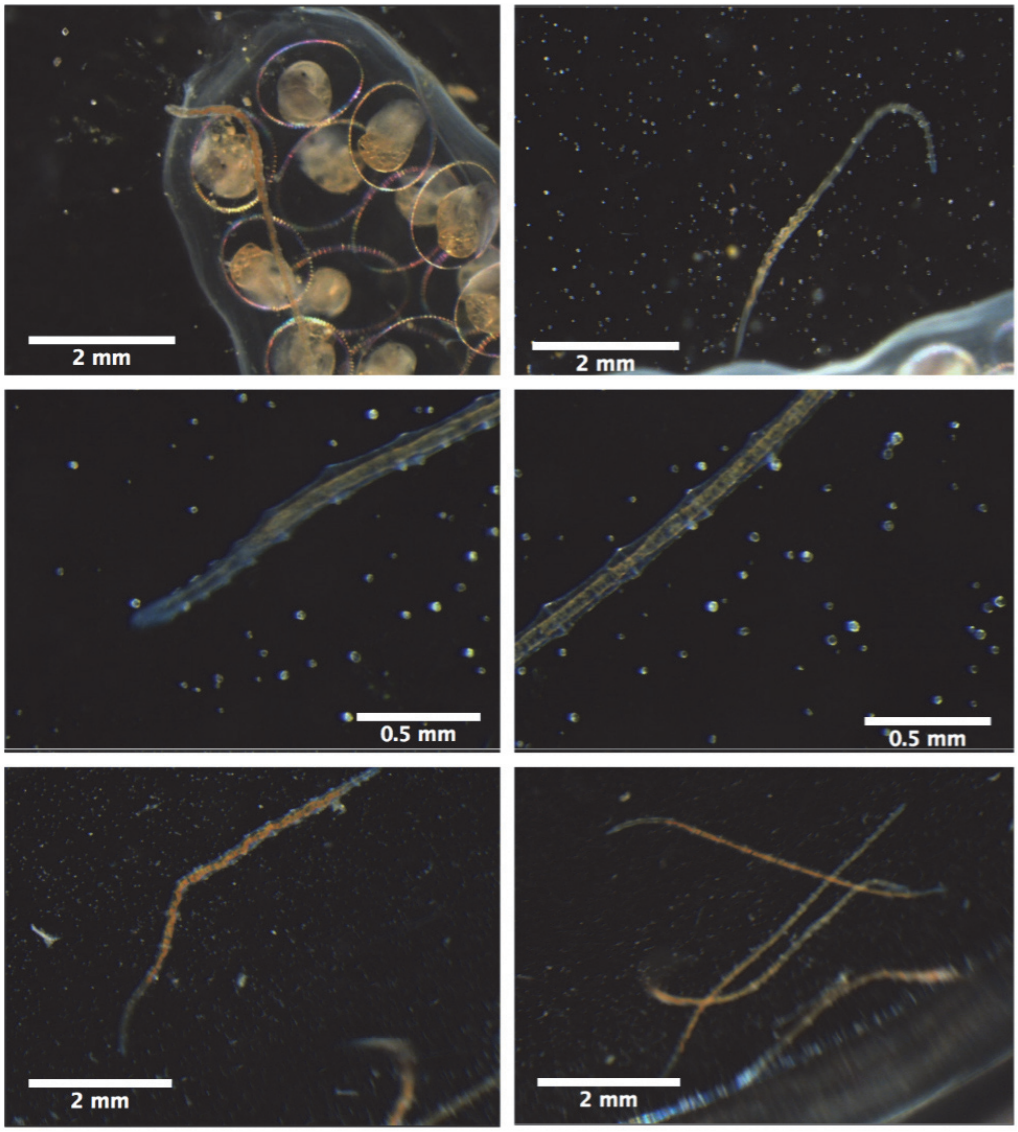


FIGURE 5.2 – Parasites saprophytes (nématodes non identifiés) observés dans les feces des organismes pendant l'expérience

Nous venons de voir que l'on pouvait détecter des signes d'immunotoxicité lors d'expositions à des concentrations de contaminants réalistes dans l'environnement.
Jusqu'à présent dans ce manuscrit, les interactions de xénobiotiques avec le système immunitaire des limnées sont relativement subtiles à détecter avec les immunomarqueurs évalués, à l'exception de l'expérience sur l'Etoposide. L'expérience avec la Deltaméthrine montre qu'une faible diminution de l'immunocompétence peut être suspectée alors qu'aucun effet sur d'autres traits de vie ne l'est. Sur le long-terme, une faible immunomodulation ou immunotoxicité pourrait engendrer des effets dévastateurs pour les espèces avec notamment l'apparition de ***trade-offs*** physiologiques ou sur d'autres traits d'histoire de vie. Cette expérience illustre la zone de sensibilité et de **subtilité** dans laquelle s'inscrit l'approche multibiomarqueurs d'immunocompétence dans un contexte de contamination réaliste de l'environnement. Aucun effet n'a été mesuré sur les traits de vie.
Pour mieux asseoir l'intérêt d'évaluer les marqueurs d'immunocompétence sélectionnés chez cette espèce dans un contexte écotoxicologique, il semble nécessaire de mettre en perspective des impacts significatifs de ces marqueurs (*e.g.*, immunosuppression) avec l'apparition d'impacts significatifs sur d'autres traits d'histoire de vie dans un contexte d'exposition à un xénobiotique non-spécifique du système immunitaire (*i.e.*, large spectre de toxicité et donc immunotoxicité indirecte). En effet, cela permettrait de valider de manière ferme la précocité physiologique, éventuellement la précocité en terme de temps de réponse (*e.g.*, aiguë vs chronique). Ces critères sont importants pour quantifier le degré de pertinence d'utilisation de ces immunomarqueurs dans un contexte écotoxicologique.
C'est dans ce contexte que le chapitre suivant s'inscrit. Les organismes ont été exposés au **cadmium sur 40 jours à des concentrations beaucoup plus élevées que la réalité environnementale**. Des **traits immunitaires** (approche multibiomarqueurs) et des **traits de reproduction** ont été mesurés en parallèle. Ce chapitre vise à fournir des éléments de réponse aux questions 6 (sensibilité), 7 (rapidité de réponse) et 9 (précocité physiologique).

Chapitre 6

Exposition de longue durée au Cadmium à des concentrations beaucoup plus élevées que la réalité environnementale

Sommaire

6.1 Contexte et objectifs 265

6.2 Article 7 : Exploration de l'immunotoxicité du cadmium sur une population urbaine de *Lymnaea stagnalis* 267

6.1 Contexte et objectifs

Le Cadmium (Cd) appartient à la classe des *éléments traces métalliques*. Le Cd est présent naturellement dans la croûte terrestre et peut être rejeté lors d'éruptions volcaniques dans l'atmosphère. Le Cd intervient dans plusieurs fabrications industrielles (accumulateurs électriques, électronique, photographie, cigarettes [1] etc) [Bisson, 2014] et peut constituer *in fine* une contamination importante de certains milieux aquatiques [2] (10 — 4000 $ng.L^{-1}$). La norme environnementale Européenne concernant le Cd pour une bonne qualité des eaux douces est fixée à une concentration de 0.08 $\mu g.L^{-1}$ [Directive 2013/39/EU, 2013]. Ce polluant est très toxique [3]. Sa classification SGH (système général harmonisé) est la suivante : (i) *Toxique*, (ii) *Sensibilisant, mutagène, cancérogène, reprotoxique* et (iii) *Danger pour le milieu aquatique* (voir la classification dans l'annexe F.2, p. 427). Un des mécanismes d'action décrit est la substitution du cadmium avec le calcium des cellules, générant une importante fuite calcique. Cependant, le spectre toxique du Cd reste large et peu spécifique. Chez de nombreuses espèces il a été observé qu'il induit des génotoxicités, néphrotoxicités, hépatotoxicités, reprotoxicités, et immunotoxicités.

Récemment, un protocole OCDE de test de reprotoxicité a été validé [Ducrot *et al.* , 2014] puis optimisé [Charles *et al.* , 2016] chez *L. stagnalis* avec l'utilisation du Cd comme contaminant toxique modèle. Pour cette raison principale, le Cd a été utilisé comme contaminant dans ce chapitre. Par ailleurs le cadmium est très étudié en écotoxicologie et donc de nombreux éléments de comparaisons sont disponibles. *L. stagnalis* a été exposée au Cd dans le but de comparer la précocité d'altérations de marqueurs d'immunocompétence (immunotoxicité) par rapport à des altérations de la fonction reproductrice (**précocité physiologique**). Une autre raison qui a motivé le choix du Cd est que c'est un toxique fort au spectre toxique large (peu spécifique). Il est attendu qu'il induise des altérations sur plusieurs fonctions physiologiques et le caractère d'*alerte précoce* de l'état de santé des organismes des marqueurs d'immunocompétence pourrait être démontré avec ce type de toxique peu spécifique qui affecte plusieurs fonctions physiologiques et possiblement le système immunitaire de manière plus précoce.

Les expositions ont duré 40 jours et les immunomarqueurs ont été mesurés à différents

1. Les fumeurs ont en moyenne des concentrations sanguines en Cd de 1.4 — 4.5 $\mu g.L^{-1}$ alors que les non-fumeurs de 0.4 — 1 $\mu g.L^{-1}$ [Elinder *et al.* , 1985].
2. www.cadmium.org/environment/level-of-cadmium-in-the-environment
3. La SSD (sensitivity species distribution) de différents tests de longue durée révèle une toxicité globale à de très faibles concentrations [CWQG, 2014]

temps d'exposition afin de gagner des informations sur la **rapidité** de réponse/altération des immunomarqueurs. Les concentrations étaient plus élevées que la réalité environnementale dans le but d'induire des effets immunotoxiques et reprotoxiques significatifs (**sensibilité** en terme de réponse face aux concentrations en xénobiotiques) car le chapitre précédant a montré un faible impact sur les traits immunitaires aux concentrations environnementales testées et l'objectif était d'induire une forte altération immunitaire. Enfin, l'accumulation du Cd dans les viscères des organismes a été mesurée afin de voir s'il existe une relation directe entre la concentration dans les organes internes et des effets immunotoxiques.

Pour résumer, un *design* similaire à l'expérience précédente a été mis en place mais les différences concernent : (i) le contaminant (cadmium, large spectre toxique), (ii) la population de *L. stagnalis* (mare urbaine), (iii) le niveau de contamination (beaucoup plus élevé que la réalité environnementale), (iv) les conditions d'exposition (semi-statiques), (v) la mesure d'accumulation du cadmium dans les viscères.

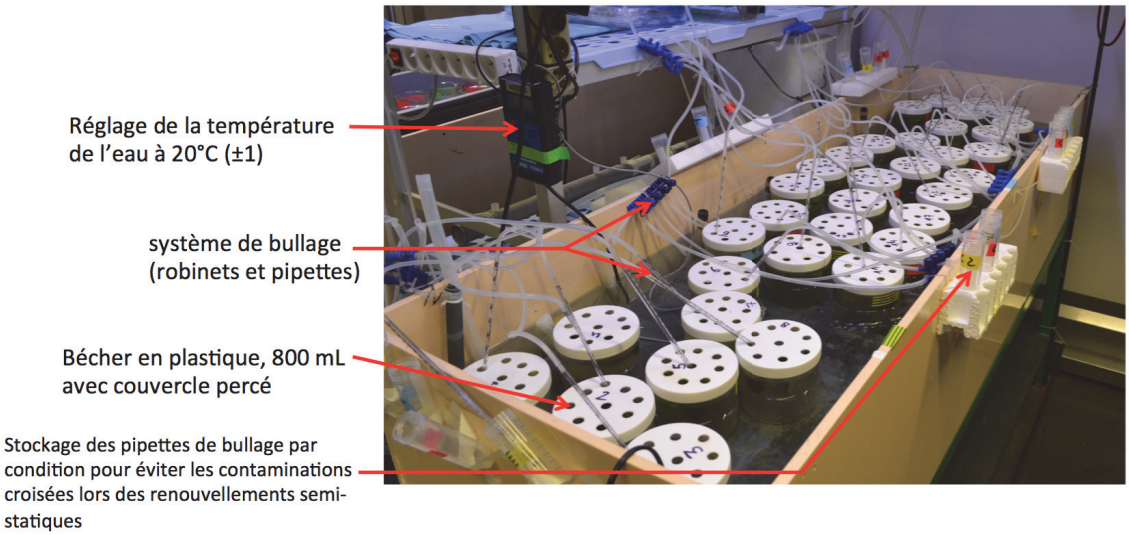


FIGURE 6.1 – Schéma du dispositif expérimental mis en place pour l'expérience d'exposition au Cadmium présentée ci-après

6.2 Article 7 : Exploration de l'immunotoxicité du cadmium sur une population urbaine de *Lymnaea stagnalis*

Article 7 (à soumettre)

Type : *full-length article*

Résumé de l'article

Introduction et objectifs : Cet article représente la première investigation des effets immunotoxiques du cadmium (Cd) *in vivo* chez un gastéropode d'eau douce (*Lymnaea stagnalis*). Nous voulions voir si l'évaluation de marqueurs d'immunocompétence chez ce gastéropode permettait de détecter une toxicité (immunotoxicité) avant que n'apparaissent des effets sur d'autres traits de vie. Cela avait pour objectif d'évaluer la possibilité d'utiliser les marqueurs d'immunocompétence comme des marqueurs précoces d'alerte de l'état de santé des organismes. Pour ce faire, des expositions au Cadmium à de fortes concentrations (*i.e.*, pas du tout réalistes au regard de l'environnement) ont été réalisées en évaluant en parallèle des marqueurs d'immunocompétence et d'autres traits de vie (survie et reproduction).

Matériel et méthodes : Les organismes ont été collectés dans un étang à Renens en Suisse puis acclimatés 2 semaines au laboratoire. Ils ont été exposés pendant 40 jours au cadmium à des concentrations nominales allant de 15 à 122 $\mu g.L^{-1}$ en conditions semi-statiques (béchers, renouvellement toutes les 96h ; voir la fig. 6.1 p.266). Les témoins étaient exposés à de l'eau de forage utilisée pour les autres expositions et puisée sous le laboratoire.

Plusieurs marqueurs d'immunocompétence ont été évalués à une échelle individuelle tout au long de l'expérience : densités et viabilités hémocytaires (j= 0, 3, 10, 20, 30, 40), activité oxydative immunocompétente des hémocytes (j= 3 et 20), activité phénol-oxydase non spécifique (j=10 et 40) et capacité de phagocytose (j=30). Pour le suivi de la reprotoxicité, le protocole OCDE (n ° 243, 2016) a été utilisé. La concentration en cadmium a été mesurée dans l'eau des béchers au début (t=0h) et à la fin des renouvellements manuels (t=96h). La concentration en cadmium dans les viscères des organismes a été mesurée au jour 40 pour 1 organisme par bécher (*i.e.*, 35 organismes au total).

Résultats : Les viscères des organismes ont accumulé le cadmium de manière linéaire en fonction de la concentration dans leur milieu. Le cadmium n'a pas induit d'effet remarquable sur la survie des organismes, ni sur leur reproduction (oviposition et fécondité). De faibles impacts sur les traits immunitaires ont été observés. La capacité de phagocytose au jour 30 a été significativement diminuée pour les organismes exposés au Cd à 61 $\mu g.L^{-1}$. Une altération de l'immunocompétence est aussi suspectée pour la densité hémocytaire et l'activité phénol-oxydase mais celles-ci n'étaient pas statistiquement significatives.

Conclusions et discussions : Aux concentrations évaluées, la faible immunotoxicité du Cd qui a été observée reste cohérente avec plusieurs autres études sur des mollusques aquatiques. Sur le long terme, de faibles immunotoxicités peuvent avoir des effets dévastateurs sur des populations en milieu naturel car celles-ci sont plus vulnérables aux agents infectieux. Aucun effet remarquable du Cd n'a été détecté sur la survie, ni sur la reproduction. La population étudiée et les critères de calibration sont probablement des sources importantes de variabilité parmi les études existantes dans la sensibilité toxique de *L. stagnalis* au Cd. D'autres études sont nécessaires pour comprendre le caractère d'alerte précoce de l'état de santé des organismes, obtenu via l'analyse de marqueurs d'immunocompétence, chez cette espèce.

Mots-clés : cadmium, immunotoxicité, gastéropode d'eau douce, traits d'histoire de vie

Exploring the immunotoxicity of cadmium to urban freshwater snails (*Lymnaea stagnalis*)

Paul Boisseaux[a], Marie-Laure Delignette-Muller[b,c], Patrice Noury[a], Josiane Gahou[a], Hélène Thomas-Guyon[d], Jeanne Garric[a]

[a]*Irstea Centre de Lyon-Villeurbanne, UR MAEP, 5 rue de la Doua, 69626 Villeurbanne (France)*
[b]*Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 Bd du 11 novembre 1918, 69622, Villeurbanne, France*
[c]*Université de Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France*
[d]*LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle*

Abstract

This is the first exploration of *in vivo* cadmium (Cd) immunotoxicity to a freshwater gastropod (*Lymnaea stagnalis*). Snails have been exposed for 40 days to Cd ranging from 15 to 122 $\mu g.L^{-1}$ of nominal concentrations. Individual time-course analysis of markers of immunocompetence have been performed (*i.e.*, hemocyte density and viability, hemocyte oxidative activities, hemocyte phenol-oxidase-like activities and phagocytosis capacity). In parallel, life-history traits have been evaluated (survival, oviposition and fecundity), notably to compare the precocity/sensitivity of immunotoxic versus lethal or reprotoxic endpoints. Viscera of snails did accumulate Cd in a linear manner relatively to the concentration in the external medium. Weak impacts on immune traits have been observed. At the tested concentrations, it is coherent with studies on other species. The phagocytosis capacity at 30 days of Cd exposure was jeopardized at 61 $\mu g.L^{-1}$. Impaired immunocompetence is also suspected for hemocyte density and phenol-oxidase activity but the latter were not statistically significant. Over the long-term, weak Cd-induced immunotoxicity can have devastating effects on natural populations since they are more vulnerable to infectious agents. No remarkable effects on snail survival nor reproduction have been evidenced. Population and calibration criteria are likely important sources of variation in *L. stagnalis'* sensitivity to Cd toxicity.

Keywords:
Lymnaea stagnalis, cadmium, bioaccumulation, immunotoxicity, hemocytes, reprotoxicity

1. Introduction

Many xenobiotics exert adverse effects on the immune system of aquatic species in the environment (Galloway and Handy 2003, Russo and Lagadic 2004, Canesi et al. 2007, Gopalakrishnan et al. 2009, Zhou et al. 2010, Gust et al. 2013, Boisseaux et al. 2014). They may target directly the immune system or indirectly by chain reaction of an unbalanced homeostasis. The resulting immunotoxicity may have important consequences for the individual or even the population. Indeed, the immune system is a key physiological function because it constitutes the first internal barrier against microbes and so it will determine the animal vulnerability to contracting infectious diseases. Furthermore,

in mollusks the circulating immunocompetent cells — called hemocytes — are involved as well in tissue and shell reparation (Sminia et al. 1973, T. Suzuki et al. 1991, Franchini and Ottaviani 2000, Li et al. 2016) and in nutrient transport (Cheng 1984, Matozzo 2016). Immune and reproductive traits are both highly important for population dynamics and species interactions. Hence, an important goal in environmental immunotoxicology is to understand what precocity of response offer the analysis of immunomarkers compared to life-history traits (*i.e.*, physiological precocity and time-precocity), what physiological specificity (*i.e.*, xenobiotic targeting uniquely the immune system or non-specific immunotoxicity) and what are their sensitivity to environmental realistic concentrations (*i.e.*, concentration sensitivity) (Galloway and Depledge 2001).

Cadmium was studied for several reasons. (i) An inter-laboratory OECD reprotoxicity test has been validated with cadmium in *L. stagnalis* (Ducrot et al . 2014) and so as data exist, it was relevant to compare reprotoxic vs immunotoxic endpoints with the same toxicant. Furthermore, several other studies with *L. stagnalis* and Cd toxicity had been conducted with reprotoxic endpoints but no clues about immunotoxicity are available. (ii) As a heavy metal, its toxicity spectrum is wide (*i.e.*, unspecific toxicity relatively to cells, organs, systems) and so we may expect immunotoxicity, although sensitivity/precocity of response is unknown. (iii) Cd is included in the list of the 33 priority substances under the European Water Framework Directive (Directive 2008/105/EC 2008). Cd has been reported to be immunotoxic to a wide variety of animals, from humans (Descotes 1991) to mice (Dan et al. 2000), fishes (Zelikoff et al. 1995), arthropods (Victor 1993), bivalves (Coles et al. 1995) and tunicates (Franchi and Ballarin 2013). However, to our better knowledge, this study is the first exploring the *in vivo* immunotoxicity of Cd to a freshwater gastropod species. We focused on *L. stagnalis* because (i) it is ecologically representative of lentic freshwater ecosystems of Holarctic regions; (ii) invertebrates deserve attention in environmental immunotoxicology (Galloway and Depledge 2001) and among mollusks, gastropods are less often studied; (iii) this species is an OECD model organism for reprotoxicity tests (Ducrot et al. 2014) and (iv) it presents great advantages in immunotoxicology since the hemolymph can be collected repeatedly in a relatively non-invasive manner on the same individual (Boisseaux et al. 2016a). We exposed adult specimens of *L. stagnalis* to high concentrations of cadmium (non-environmentally realistic) up to 122 $\mu g.L^{-1}$ because it was the $LC50_{56d}$ from OECD protocol validation ring tests. All along the experimentation, individual time-course evaluation of markers of immunocompetence was performed. In parallel, the snail survival and the reproduction outputs were recorded (*i.e.*, oviposition and fecundity). Immunocapacity was defined as the combination of hemocyte density and viability (*i.e.*, non-functionnal immunomarkers) and they have been assessed at days 0, 3, 10, 20, 30 and 40. Immunoefficiency was defined as the combination of functional immunomarkers. They have been assessed at days 3 and 20, 10 and 40, and 30 respectively for hemocyte oxidative activities, phenol-oxidase-like activity and the capacity of phagocytosis. At the day 37, part of snails were challenged with lyophilized *E-Coli* in order to see if multiple stress (*i.e.*, chemical + lyophilized *E-Coli*) impacts their survival and/or their immune traits.

2. Material and methods

2.1. Snails

Calibrated adult *Lymnaea stagnalis* (39 mm shell-length, sd= 1.8) were collected in a pond in the city of Renens (Switzerland) (long/lat 6.595983/46.535750). This population has been chosen because they are representative of free-living specimens in urban areas and we intend to understand the potential use of immunomarkers in this species in an environmental context. Prior starting the experiment, they were acclimated for two weeks in the laboratory in a flow-through system of clean groundwater (see Table S1 for details on the water quality and fig. S1 for details on geographic location of collected snails, supplementary material [SM]). No parasite has been observed (test of sporocyst emission). A total of 140 snails were selected; 28 snails of identic heterogeneity calibration criteria were assigned per condition (fig. S2, SM) and then randomly attributed to beakers with water volume adjusted at 800 mL (35 beakers in total, 7 beakers per condition, 4 snails per beaker, 200 mL per snail). Pierced-lids were placed on the top of beakers to prevent snails from evading their recipient but allowing them to breathe and move properly. Snails were individually identified with honey bees marks (Ickowicz Apiculture, Bollene, France) placed on the top of their shell. Organisms were fed lettuce *ad libitum* all along the experimentation. Mortality was daily recorded. Snails at the end of exposure were frozen at -80°C in order to shorten the animal suffering.

2.2. Cadmium

2.2.1. Experimental design and chemical exposure

The experimentation was run for 40 days. The exposure mediums were replaced manually every 96 h (*i.e.*, semi-static system). Cadmium chloride anhydrous ($CdCl_2$, CAS 10108-64-2) was purchased from Fluka. A stock solution of cadmium at 12.26 $mg.ml^{-1}$ (expressed in Cd, not $CdCl_2$) was first prepared (kept at 4°C, shielded from light and changed twice during the experimentation) from which volumes ranging from 8 to 1 mL were introduced in polypropylene beakers to achieve the expected exposure concentrations (volumes adjusted at 800 mL per beaker). Four Cd exposure concentrations were set up : 15.3 $\mu g.L^{-1}$, 30.6 $\mu g.L^{-1}$ 61.3 $\mu g.L^{-1}$, 122.6 $\mu g.L^{-1}$ by reference to nominal concentrations as well as a water control consisting in clean groundwater. Beakers were randomly placed in water-bathes in which the temperature was set at 20 ± 1°C (verified with Tinytags recorders). A neon tube-lightning at 800 lux (± 200) provided a photoperiod of 16h/8h [light/dark]. The same groundwater than for the acclimation period was used for controls and Cd exposures. The quality parameters (ammonia cation, nitrite anion, pH, conductivity and oxygenation) were measured twice a week on 5 random beakers (one per exposure condition) (Table S1, SM).

2.2.2. Chemical analysis

Dissolved cadmium in water samples :. Water samples have been collected at t= 0 h and t= 96 h of three different semi-static medium renewals during the experimentation, in different replicates, in each exposure condition (*i.e.*, 30 samples in total). Water was sampled with polypropylene syringes and passed through 0.45 μm filters (VWR, ref 514-1127) into polypropylene falcon tubes. The collected samples were immediately acidified with HNO_3 (Suprapur Merck) 0.5 % (v/v) and placed in darkness at 4°C until chemical analysis. Beforehand, syringes and filters were rinsed three times

with milliQ water. The concentration of cadmium in samples was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, X7, serie II from Thermo Electron) according to the AFNOR NF EN ISO 17294.2 standard for water quality using ICP-MS. Limit of quantification was 0.01 $\mu g.L^{-1}$.

Viscera. The internal concentration of Cd was measured in viscera. Snails that survived until the end were selected for analysis (*i.e.*, 1 snail per beaker, 7 snails per exposure condition, 35 snails in total). At the end of the experimentation (day 40) snails were frozen at -80˚C (minimization of animal suffering) and then defrost at room temperature. They were removed from their shell, viscera were separated from the foot sole using non-metallic material and placed in polypropylene tubes. The viscera content included digestive tract, kidney, heart, lung, and reproductive apparatus as described in Gomot and Pihan (1997) and Coeurdassier et al. (2003). They were refrozen at -80˚C and then freeze-dried for 72 h at -55˚C (Bioblock scientific). Dry weights were measured and then mineralized with HNO3 SUPRAPUR in microwave digestion machine (MARS-6, CEM) for 40 min in reactors at 160˚C. Resulting mineralized sample was diluted with milliQ water for further chemical analysis. Afterwards, the concentration of cadmium in samples was determined by ICP-MS as described for water samples analysis above; the limit of quantification was 0.02 $\mu g.g^{-1}$ of dry weight (dw). Calculations of bioconcentration factors for cadmium in viscera of *L. stagnalis* have been adapted from Présing et al. (1993b) :

$$BCFviscera = \left(\frac{C(viscera\ at\ day\ 40)condition - C(viscera\ at\ day\ 40)controls}{C(water\ at\ t{=}\ 0\ h)condition - C(water\ at\ t{=}\ 0\ h)controls}\right)$$

where C stands for the concentration of cadmium in $\mu g.g^{-1}$ of dw (dry weight) for viscera and in $\mu g.L^{-1}$ for water samples.

2.3. Reproductive outputs

The oviposition was defined as the mean number of clutches laid per individual per day, whereas the fecundity corresponds to the mean number of eggs produced per individual per day. First, clutches were collected daily and photographed with a binocular microscope. Second, the number of eggs into each clutch was counted with the image J software. Third, the number of individual-days for the whole experiment was calculated as described in Delignette-Muller et al. (2014). Fourth, as recommended by the OECD protocol (Ducrot et al. 2014), the oviposition was calculated as the cumulated number of clutches laid over the experimentation per beaker divided by the number of individual-days. Similarly, the fecundity was calculated as the cumulated number of eggs per beaker divided by the number of individual-days.

2.4. Markers of immunocompetence

2.4.1. Hemolymph sampling

The hemolymph collection was realized as described by Sminia (1972). By tickling the foot sole of the snail with the tip of a micropipette, it retracts into its shell and extrudes hemolymph through the hemal pore. This method is relatively non-invasive (Boisseaux et al. 2016a). Samples were kept into 500 μl conical skirted polypropylene tubes (Dutscher, Dumath, France) in ice and they were not pooled. The laps of time between hemolymph collection and flow cytometry measurements was minimized and the order of beakers collection was randomized. Thus, possible bias coming from small differences in the waiting time of samples (*i.e.*, possible hemocyte adhesion) before biomarkers

quantifications was reduced. All analysis of markers of immunocompetence were performed at an individual scale.

Flow cytometry measurements were performed on the Guava easyCyte^{TM} 6-HT apparatus (^{TM}Millipore). Every acquisition was run with the Incyte module from the GuavaSoft 2.7 software at a flow rate of 0.59 $\mu l.s^{-1}$. Note that the accuracy of counts was regularly verified using the manufacturer's calibration protocol (Guava easyCheck Kit, Hayward, CA, USA).

2.4.2. Immunocapacity

Hemocyte densities and viabilities were measured by flow cytometry as described in Boisseaux et al. (2016a) at the days 0, 3, 10, 20, 30 and 40. Briefly, for hemocyte density, a total of 5000 events were acquired in the live-gate realized on size (forward scattering, FSC) and granulometry (side scattering, SSC) from samples in 500 μl tubes. For hemocyte viability, hemocytes were first adjusted to 50 000 $cells.well^{-1}$ in a 96-well plate (Greiner, polystyrene, U-bottom), then 2 μl of propidium iodide (1 $mg.ml^{-1}$) were added to each well. A total of 2000 events were acquired per sample in a live-gate realized on RED-FSC and the proportion of viable hemocytes was calculated from histograms obtained from this gate.

2.4.3. Immunoefficiency

Oxidative activity of hemocytes. The oxidative activity of hemocytes was evaluated both in basal (*i.e.*, ROS generation from cellular machinery metabolism) and in immunostimulated status, in order to induce the immunocompetent oxidative activity (*i.e.*, ROS from NADPH-oxidase activity) (Adema et al. 1993). This inducible system is important for the clearance of microorganisms by hemocytes and so for the animal immunocompetence. The stimulation was realized with zymosan particles. The hemocyte oxidative activities were evaluated at the day 3 and at the day 20. The method employed was the one from Boisseaux et al. 2016b [accepted]. Briefly, a volume of 25 μl of hemolymph per animal was gently deposited onto a 96 well plate (Greiner, polystyrene, flat bottom) in duplicate for both, the basal and the zymosan-stimulated oxidative activity. Plates were centrifuged (100 g, 20 min), the lymph was removed and replaced by snail saline buffer (SSB) (adjustments at 200 $\mu l.well^{-1}$). The stimulation of the activity consisted in an addition of zymosan (Sigma Z4250, 250 mg) of 125 $\mu g.well^{-1}$. The generation of ROS was detected by addition of the fluorescent probe H_2DCFDA (Sigma, France) at 80 μM. Measurements were done with a spectrofluorimeter (TECAN, Safire) every 2 minutes for 1 hour with EX/EM 480/530 nm wavelength settings. First, the raw fluorescence units were converted into the amount of fluorescent product dichlorofluorescein (DCF) resulting from reaction of ROS with H_2DCFDA probe. Second, the slope between 20 and 40 min of kinetics was calculated and normalized by the volume of hemolymph.

Phagocytosis capacity. The phagocytosis capacity corresponds to the capacity of hemocytes to internalize foreign microparticles (*e.g.*, bacterias) into the intracellular compartment for further destruction. It is an important activity of efficient immune systems. It was artificially evaluated, at the day 30, as the capacity to ingest latex microbeads. Hemolymph samples were first diluted at 500 $cells.\mu l^{-1}$ with a final volume of 200 μl per well in order to achieve 100 000 $hemocytes.well^{-1}$. Dilutions were done by using SSB pre-warmed at room temper-

ature, in a 96-well plate (Greiner bio one, for cell cultures, sterile, F-bottom, polystyrene). Samples with a hemocyte density lower than 500 $cells.\mu l^{-1}$ were not diluted and so 200 μl of the raw sample were added per well. Then, a quantity of 7.2 $.10^5$ fluorescent microbeads (polyscience YG 2.0 μm latex microsphere) were gently mixed with each sample, what corresponds to a hemocyte-to-bead ratio of 1:7 for 100 000 hemocytes. Plates were laid in the dark under slow agitation for 24h in a thermostatically controlled incubator (Aqualytic, TC Serie 140G) set at 20˚C. Then, the supernatant was removed and cells were fixed (SSB containing 0.5% of formaldehyde (v/v) and 0.2% (w/v) of sodium azide). 10 000 events were acquired and read in the YELLOW photomultiplicator (583/26 nm). Then, the phagocytosis capacity was calculated as the percentage of hemocytes that engulfed at least one microbead among the gate done on hemocyte population.

Phenol-oxidase-like activity. The phenol-oxidase-like activity plays important role in invertebrates' immunocompetence by entombing microbes into melanin capsules, reducing thereby their motility and facilitating their phagocytosis by hemocytes. This activity was evaluated at the day 10 and 40. The protocol was adapted from Seppälä and Leicht (2013). Briefly, 50 μl of hemolymph per snail were deposited in triplicates in a 96 well-plate (Greiner, polystyrene, flat bottom). A volume of 50 μl of L-DOPA (purchased from Sigma and prepared extemporaneously at 5 $mg.ml^{-1}$ of SSB) was added in the wells. The absorbance at 480 nm was measured every 2 minutes over a kinetic of 60 min. The activity was then calculated as the slope between 20-40 min (relative fluorescence units).

Immune challenge. At the day 37, a challenge of lyophilized *E-Coli* (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) was realized for four out of the seven replicates per exposure condition. First, a mixture was prepared in SSB (20 $mg.ml^{-1}$) and homogenized. Second, the appropriate volume was introduced in the respective replicate to achieve an exposure of 20 mg of *E-Coli* per surviving snail into the beaker. The concentration was adapted from the study of Seppälä and Leicht (2013) where a decrease of phenol-oxidase-like activities from hemolymph samples of *L. stagnalis* was observed after challenge with lyophilized *E. Coli* within the internal body (50 $\mu g.snail^{-1}$). We desired to expose snails to *E. Coli* in their water medium (*i.e.*, not internal body) because it mimics environmental scenario (*e.g.*, waste water treatment plants). As we assumed a gap between microorganisms in water medium and microorganisms reaching the internal body, and also because we intended to induce strong effects, a factor 400 has been arbitrary applied to the exposure of snails to lyophilized *E. Coli* relatively to the above mentioned study.

2.5. Statistical analysis

Software. The statistical analysis was performed with the R software (Team 2016). Graphs were realized with the ggplot2 package (Wickham 2009). The survival plot was obtained using the survival package (Therneau 2015) after pooling all organisms from each exposure condition. Data were right-censored (as all the organisms do not die during the experiment). The logrank test was run to enquire about statistical significant differences among the survival curves of respective exposure conditions. For reproduction analysis, 95% confidence intervals (CI) of the mean number of clutches oviposited per individual-days (*i.e.*, oviposition) and

of eggs per individual-day (*i.e.*, fecundity) were calculated and plotted from a Poisson distribution using the pois.exact function from the epitools package (Aragon Tomas J. 2012).

Hemocyte density and viability. For hemocyte density and viability analysis, linear mixed-effect models (LMEMs) were fitted using the lmer function from the lme4 package (Bates et al. 2014). They were first built with one fixed factor, the day, and an interaction term of the day and the exposure condition. Two nested random factors were included, the snail and the replicate (beaker). Note that the impact of the exposure condition was only considered in an interaction term with the day, as there cannot be any impact of the exposure condition at starting the experiment (*i.e.*, day 0), but an effect of the condition over time (*i.e.*, interaction of respective effects). Beforehand, a logit transformation was applied to proportions of viable hemocytes to normalize the distributions.

oxidative activities. For oxidative activities analysis, a $\log_{10}$ transformation to the data of oxidative activity was applied. LMEMs were fit to the oxidative activity datasets. For better clarity in interpretation and because the activity was evaluated at only two dates, we decided to build separate models for the day 3 and the day 20. Thus, no snail random effect has been included because it would not make sense anymore. LMEM were first built with two fixed factors, the "zymosan" and the "exposure condition", and one random factor, the replicate (beaker). The interaction between the exposure condition and the zymosan was included in the initial models.

Phenol-oxidase-like activity. For phenol-oxidase-like activity, the statistical analysis was performed separately for the day 10 and 40. LMEM were first built with one fixed factor, the "exposure condition", and two nested random factors, the "replicate" and the "batch" resulting from technical source of variation due to different freshly prepared L-DOPA solutions (*i.e.*, factor with two modalities "first" and "second"). The "replicate" and the "batch" random effects are nested since all samples from each aquarium replicate were included in the same batch. For the LMEM at the day 40, we included an additional fixed effect "challenged" (*i.e.*, with two modalities "yes" or "no") and an interaction term with the exposure condition.

Phagocytosis capacity. For phagocytosis capacity, a logit transformation was applied to the phagocytosis capacity in order to normalize the distributions. LMEM were first built with one fixed factor, the "exposure condition", and one random factor, the "replicate".

Interpretations. For interpretations of LMEMs, homoscedasticity of residuals and normality of distributions of residuals and of random effects of all LMEMs were visually verified using plots of residuals and quantile-quantile plots of residuals and random effects (fig. S4, S6 and S7, SM). Each model mentioned above was simplified by removing the effects that did not appear significant. An effect was considered statistically significant when the 95% CI of its coefficient did not contained "0" (*i.e.*, t-value > |2|).

3. Results

3.1. Chemical analysis

The cadmium concentrations in freshly replaced mediums (t= 0 h) were within 80% of the nominal concentrations for the two lowest concentrations, whereas

they were of 75 and 62% for the two highest concentrations (Table 1). Percentages of measured versus nominal concentrations of Cd in water samples are coherent with the OECD prevalidation and validation ring tests for reprotoxicity test using *L. stagnalis* (Ducrot et al. 2014, Charles et al. 2016). After 96 h of exposure (*i.e.*, intervals of medium renewals), a decrease in Cd concentrations of approximately 60 % has been measured compared to their corresponding concentrations at t=0 h. In the procedure of exposure renewal, mediums were first prepared in the beakers, then ad libitum lettuce leaves were added and finally the water samples were collected for further chemical analysis. Adsorption to leaves, beakers and shells (specimens were voluminous) was likely occurring, what may partly explains the lower measured concentrations compared to the expected ones and the remaining dissolved cadmium at 96 h of exposure (feces may be an additional adsorption matrix). In average, Cadmium was measured in viscera at 135 $\mu g.g^{-1}$ dw (sd= 21.1) following 40 days of exposure at 76.7 $\mu g.L^{-1}$ (sd=22.9), what allows calculating BCFs of 2.1 ±0.4 (Table 1). These values are consistent with the studies of Coeurdassier et al. (2003) and Présing et al. (1993) in which Cd concentrations in viscera were approximately of 65 and 150 $\mu g.g^{-1}$respectively for a 4 week exposure of Cd at 100 $\mu g.L^{-1}$. In the present study we observe a linear relationship between the concentrations of Cd in water and in viscera (fig. 1). The absence of plateau indicates that saturation was not reached at the day 40. The snail excretion rate of food is likely higher than 24 h and so it is unlike that food ingested for 24 h concentrate as much Cd as for explaining the concentrations measured in viscera for the highest exposures. Thus, we suppose that measured Cd in viscera corresponds indeed to bioaccumulation in tissues. The water quality criteria from OECD protocol (Ducrot et al. 2014) were all met during the experimentation (ammonium cation, dissolved oxygen, pH, conductivity, temperature). Note that an additional water parameter was analyzed: nitrite anion ranged from 0.2 to 0.4 $mg.L^{-1}$, regardless the exposure conditions (Table S1, SM).

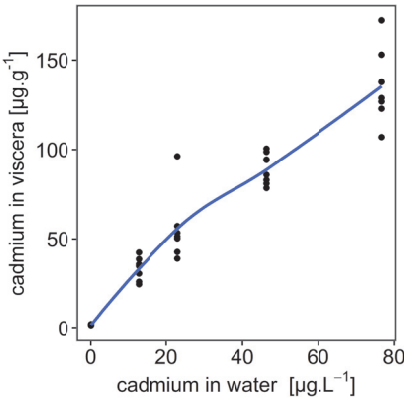


Figure 1: Cadmium in viscera (day 40) and water samples (t= 0h)

3.2. Life-history traits

The water control group had a survival rate of 82 % at the end of the exposure, while survival was of 75 % at the highest Cd concentration (fig. 2). Survival curves among all exposure conditions do not show substantial different trends and logrank test does not suggest statistically significant differences (p>0.05).

Table 1: Cadmium in viscera and water samples

Nominal concentrations of Cd in exposure mediums ($\mu g.L.^{-1}$)	**Measured concentrations of Cd in water samples** ($\mu g..L^{-1}$)		Proportions of measured vs nominal Cd concentrations in exposure mediums	Measured concentrations in viscera ($\mu g.g^{-1}$ of dry weight)	BCFs (viscera)
	at t=0h (n=3)	at t=72h (n=3)	at t= 0h	at day 40 (n=7)	
0	<0.1	<0.1	—	1.78 (sd= 0.3)	—
15.3	12.6 (sd= 0.3)	3.3 (sd= 0.6)	82%	33.36 (sd= 6.5)	2.5
30.6	22.9 (sd= 3.1)	7.8 (sd= 2.2)	82%	55.76 (sd= 18.9)	2.4
61.3	46.3 (sd= 6.8)	17.7 (sd= 3.3)	75%	88.92 (sd= 8.8)	1.9
122.6	76.7 (sd= 22.9)	36.5 (sd= 10.6)	62%	135.36 (sd= 21.1)	1.7

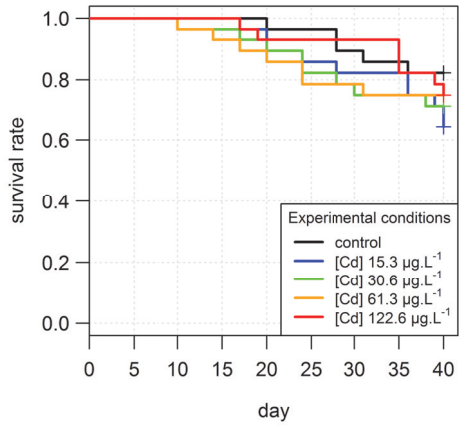


Figure 2: Survival rates of snails in the respective exposure conditions.

Neither the oviposition nor the fecundity were affected by the exposure conditions (fig. 3 A and B). A strong inter-replicate variability occurred and the data are of non-Gaussian nature. Hence, we did not develop models to statistically analyze those data. Coolidge effect in this simultaneous hermaphrodite species (Koene and Ter Maat 2007) resulting from mortality differences may explain the high replicate effect. The oviposition was between 0.02 and 0.2 clutches per snail per day, what corresponds to approximately 1 to 9 clutches laid per snail over the 40 days. The fecundity was between 4 and 20 eggs per snail per day, what corresponds to a production of approximately 160 to 800 eggs per snail over 40 days. These values are coherent with another study carried out on a natural population of *L. stagnalis* from the Rhône river, although slightly less variability occurred (oviposition of 0.1-0.2 and fecundity of 4-12) (data not published yet). These values are also coherent with other studies [oviposition of 0.11-0.35 (Ducrot et al. 2014), oviposition of 0.16 and fecundity of 8 from the study of Giusti et al. (2014) and oviposition of 0.13 and fecundity of 6.7 in the study from Coutellec and Lagadic (2006)). Note that values from the two last cited articles have been approximated because data were not presented in mean number of clutches (or eggs) per individual-days but in cumulated number of respective occurrences.

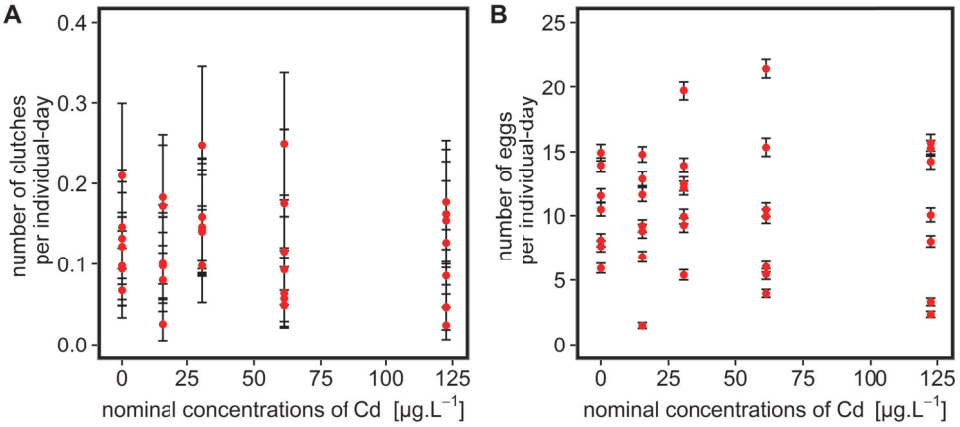


Figure 3: Reproductive outputs

Red dots : mean per beaker — over a period of 40 days of experimentation — of the oviposition (A) and the fecundity (B) into the exposure conditions. The error bars represent the 95% confidence interval calculated from a Poisson distribution.

3.3. Markers of immunocompetence

3.3.1. Immunocapacity

The individual hemocyte density was decreasing over time for all exposure conditions (graphs not shown here because of redundancy with fig. 4, but graphs are presented in fig. S3, SM). No strong effect of exposure conditions was observed (t-values < |1|). The trends were similar for most of individuals.

Linear mixed-effect models (LMEMs) for the analysis of hemocyte density dataset suggests indeed an important "day" effect of -5 $cells.\mu l^{-1}.day^{-1}$ (Table S2, SM) what corresponds to a decrease of 200 $cells.\mu l^{-1}$ per snail over the course of the experiment. The mean estimate of hemocyte density per snail over the experimentation was 655 $cells.\mu l^{-1}$ (95% confidence intervals (CI) of 632 – 677). The standard deviation (SD) of the snails, interpreted as the inter-individual variability, was estimated at 110, what was lower than the intra-individual variability (SD, 127). Intra-individual variability corresponds to variability in the number of cells with time (see Boisseaux et al, 2016a).

The hemocyte viability was also decreasing over time (fig. 4), although it is less obvious than for hemocyte density. No strong effect of exposure condition was observed. LMEMs do not suggest significant effect of the exposure condition, although the t-value for the group Cd 122.6 $\mu g.L^{-1}$ was estimated at -1.2 and so a small deleterious effect is suspected. The mean estimate of logit transformed proportion of viable hemocytes was 1.173 (95% CI of 1.044-1.301) (Table S3, SM), what corresponds to an hemocyte viability of 76.4 % (95% CI of 74.0-78.6). LMEMs suggest a significant negative effect of the "day". Interestingly, if the LMEM is built with the "day" effect coded as a qualitative variable, then a significant increase in hemocyte viability is suggested at day 10 and 20, while a significant decrease is suggested at later days. It means that hemocyte viability decreased on the whole (*i.e.*, day as quantitative

variable) but during the first stage it increased at days 10 and 20 before decreasing importantly at days 30 and 40 (*i.e.*, day as qualitative variable).

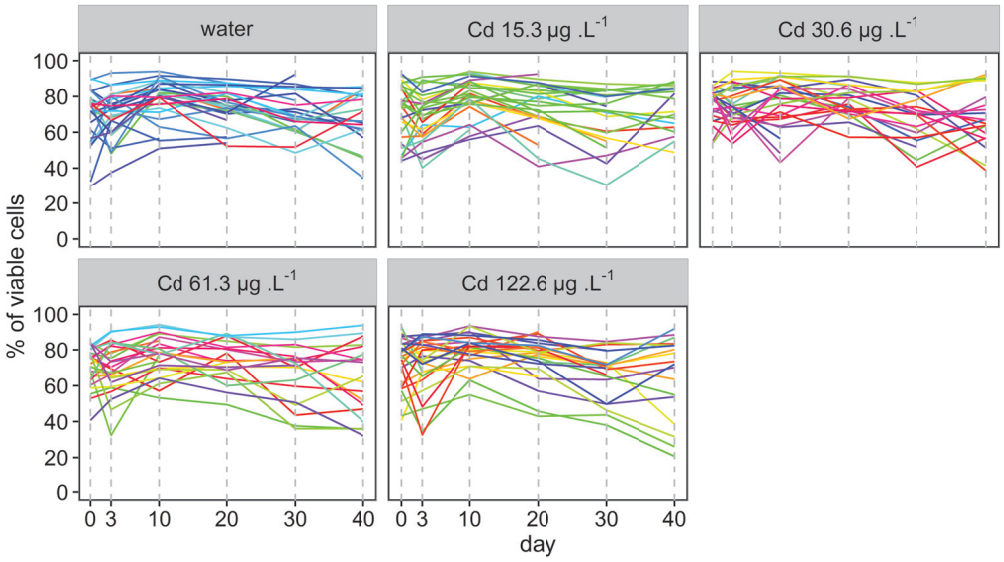


Figure 4: Evolution of individual hemocyte viability

Each solid line represents the individual snail time-course evolution of its hemocyte viability into the respective exposure conditions. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) not interpretable flow cytometric data or (iii) snail that did not extrude hemolymph (*i.e.*, no retraction reflex). The vertical grey and dashed lines correspond to the days of hemocyte density measurements.

3.3.2. Immunoefficiency

The hemocyte-related oxidative activities were not affected by the exposure conditions, neither at day 3 nor 20 (fig. 5). At day 3, we observe a relatively high basal activity (mean estimate of 398 $fmol.\mu l^{-1}.min^{-1}$ from LMEMs) compared to the day 20 (219 $fmol.\mu l^{-1}.min^{-1}$). However, the immunostimulated activity at day 3 (646 $fmol.\mu l^{-1}.min^{-1}$) was low compared to its basal activity and compared to the success of immunostimulation at day 20 (977 $fmol.\mu l^{-1}.min^{-1}$). LMEMs do not suggest any significant effect of the exposure conditions at both days assessed. However, at day 3 the interaction of zymosan with the condition Cd 61.3 and Cd 122.6 $\mu g.L^{-1}$ had a t-value of -1.93 and -1.71, respectively, and so a small negative impact is likely occurring, although at the lower limit of the statistical significance.

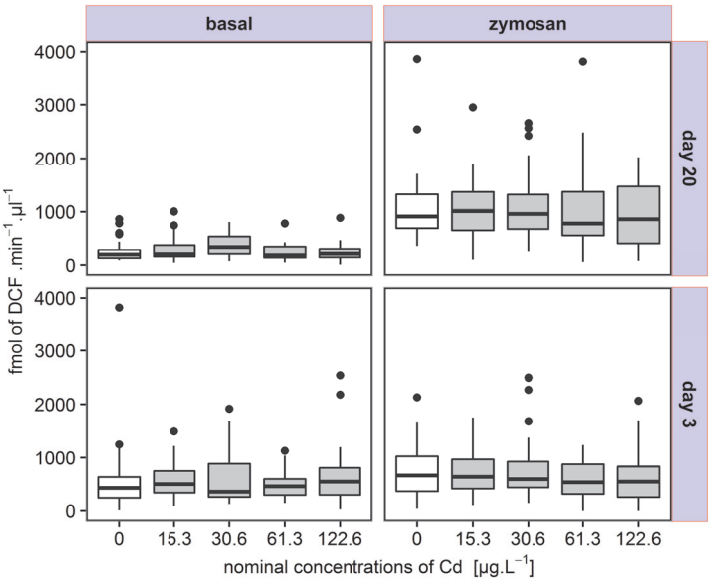


Figure 5: Hemocyte-related oxidative activities (basal and zymosan-stimulated)

The individual snail hemocyte-related oxidative activities were evaluated at the day 3 and at the day 20. For every snail and on both days of measurement, the activities were assessed under their basal status and also under *ex vivo* stimulation with zymosan particles. Data are expressed in amount of converted fluorescent product DCF (dichlorofluorescein) per minute per μl of hemolymph

The phagocytosis capacity of hemocytes, at the day 30, was affected by the exposure conditions (fig. 6). The groups exposed to cadmium had a lower capacity to phagocytize microbeads than the water controls. The LMEMs suggest a statistically significant difference for the group Cd 61.3 $\mu g.L^{-1}$ compared to the water controls. Hence, the snail's capacity to phagocytize hypothetical intruders is jeopardized by the presence of Cd at this concentration at the day 30. Furthermore, other conditions with Cd have a t-value ranging from -1.5 to -1.7 and so a negative impact is highly suspected, although at the lower limit of the statistical significance.

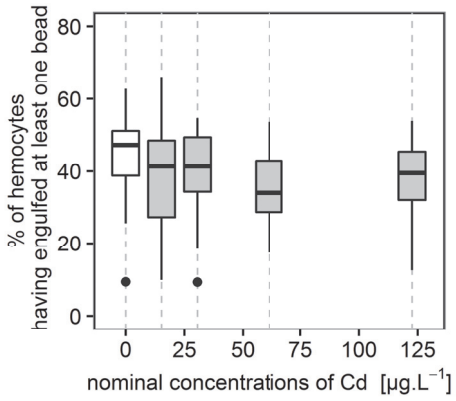


Figure 6: Phagocytosis capacity of hemocytes at day 30

The phagocytosis capacity of hemocytes from snails at the day 30 was evaluated by flow cytometry. All snails exposed to Cd had a lower phagocytosis capacity and it was statistically significant for the condition Cd 61.3 $\mu g.L^{-1}$.

The phenol-oxidase-like (PO) activity at day 10 does not show a strong effect of the exposure condition (fig. 7A). At day 40, the PO activity for the group not challenged with lyophilized *E-Coli* was increased for the exposure condition Cd 15.6 $\mu g.L^{-1}$ and decreased for the Cd 122.6 $\mu g.L^{-1}$ compared to the water control (fig. 7B). However, no statistical significance is suggested by the LMEMs. The group challenged with lyophilized *E-Coli* had a PO activity slightly higher than the non-challenged group, although LMEMs did not suggest significant increase in the activity by the factor "challenged" (fig. 7C). In this group, the PO activity of the 15.6 $\mu g.L^{-1}$ Cd exposure condition is not higher than the water control group anymore, but the 122.6 $\mu g.L^{-1}$ Cd exposure condition remains lower; statistical differences were not significant. The t-value for the interaction term between the condition 15.3 $\mu g.L^{-1}$ and the challenge with *E-Coli* was of -1.9, and so a significant effect is likely occurring.

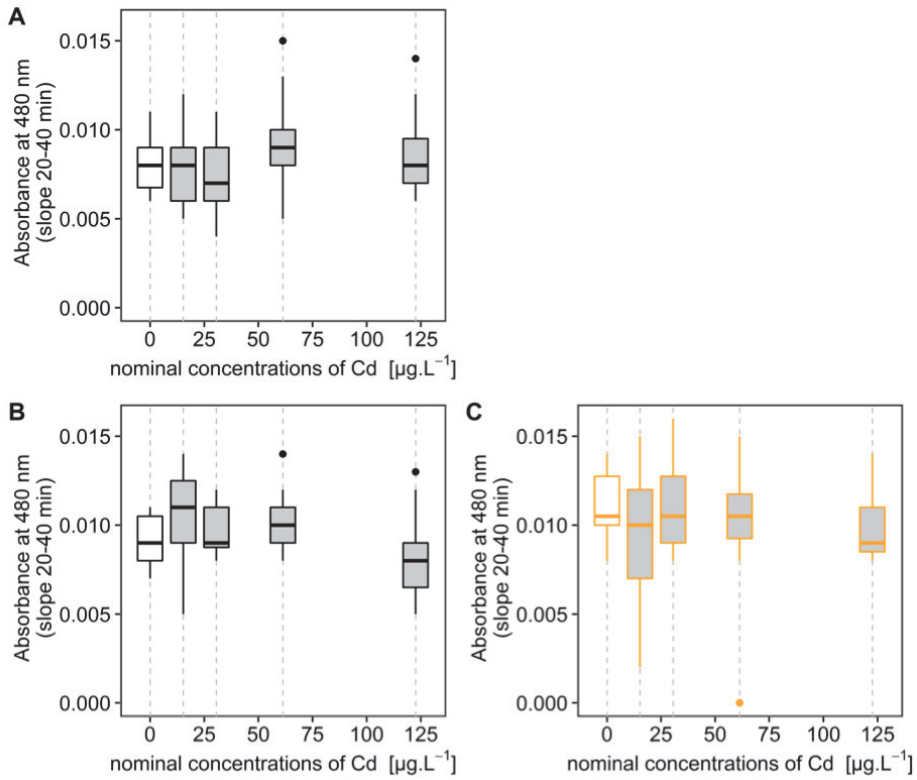


Figure 7: : Phenol-oxidase-like (PO) activities of hemolymph samples

The PO activity was assessed at the day 10 (A). At the day 40, the PO activity was assessed (B) and four out of the seven beakers per exposure condition were challenged with lyophilized *E-Coli* mixture three days before PO activity assessment (C).

4. Discussion

Cadmium was accumulated in *L. stagnalis*' viscera in an almost-linear manner relatively to the external medium exposures. Coeurdassier et al. (2003) and also Présing et al. (1993) observed similar pattern of Cd accumulation in *L. stagnalis* viscera. In the latter study, a plateau was observed in soft tissues at 200 $\mu g.g^{-1}$ dw (following 26 days of exposure at 100 $\mu g.L^{-1}$ of nominal Cd concentration), what was not reached in our study. They reported considerable high concentrations of Cd in lettuce and argue that phosphate fertilizers, commonly used in intense lettuce cultivations, are polluted with Cd (Stenström and Vahter 1974, Satarug et al. 2003). Plants can accumulate Cd from the ground (Van Bruwaene et al. 1984, Kabata-Pendias 1993, Satarug et al. 2003), what is – for instance – a route of Cd-uptake in terrestrial snails (Gomot-de Vaufleury and Kerhoas 2000, De Vaufleury 2015). It may be hypothesized that our lettuce was contaminated in a similar way; in such case it constitutes a source for Cd accumulation found also in viscera of snails from water controls. According to Stoeppler (1991), when dissolved Cd is below 0.1 $\mu g.L^{-1}$ it corresponds to unpolluted water, what was the case in the present study for water controls. Cadmium has been measured at 1.78 $\mu g.g^{-1}$ dw in viscera of snails from water controls. As an element of comparison with natural populations, Cd has been measured in soft tissues in *L. stagnalis* at 12.6 $\mu g.g^{-1}$ dw, in average, in areas of the lower Nelson river (Canada) in which Cd was below 0.1 $\mu g.L^{-1}$ in water samples (Pip 1992). In another study, *L. stagnalis* organisms were sampled in three different biotopes in the environs of Lake Balaton (Hungary) and cadmium was found at approximately 3 $\mu g.g^{-1}$dw in soft tissues (Katalin et al. 1988). Authors assert it was lower than polluted areas from the study of Nikanorov A. M. et al. (1985) (in russian). Thus, we assume that these snails were collected from a pond not heavily polluted by Cd, despite the fact that they may have depurated, as initial concentrations at collection was not evaluated.

None of the life-history traits have been affected by the contaminant. Coeurdassier et al. (2004) observed that old specimens were more resistant to Cd contamination than young ones. Because the snails were collected from the field, their age was unknown, but they were large individuals (figure S2, SM) what may partly explain their tolerance. It is difficult to have precise age estimation due to the numerous biotic and abiotic factors which influence the age-size-mass relationships. Anyhow, the population of *L. stagnalis* assessed in the present study exerted tolerance, although not considerable, to Cd toxicity compared to available studies. The $LC50_{56d}$ in adult *L. stagnalis* (laboratory origin and smaller shell-length size than in the present study) has been reported to be of approximately 122 $\mu g.L^{-1}$ and the $EC10_{56d}$ for the number of eggs per individual-day (fecundity) ranged approximately from 19 to 58 $\mu g.L^{-1}$ in an inter-laboratory OECD reprotoxicity ring test (pre)validation (Ducrot et al. 2014). Next, in the validation ring test (Charles et al. 2016) with equal laboratory snail population origin and initial rearing conditions, median estimates of $EC10_{56d}$ (fecundity) between laboratories ranged from 0.08 to 38 $\mu g.L^{-1}$ of Cd. Coeurdassier et al. (2004) reported a $LC50_{8d}$ of 1.25 $mg.L^{-1}$ and at 2 $mg.L^{-1}$ the whole cohort died (8 days of exposure). Pais (2012) determined LC5096h of 347 $\mu g.L^{-1}$ (25 mm shell-length) and a LC508d at 94 $\mu g.L^{-1}$ (15 mm specimens). Young specimens were reported to accumulate Cd faster than old adults and the

saturation concentration was much higher. Considering all the above, the Cd exposures in the present study intended to range from concentrations being sublethals (*i.e.*, 15.3 $\mu g.L^{-1}$) to concentrations inducing significantly more mortality (and thereby being reprotoxic) (*i.e.*, 122 $\mu g.L^{-1}$) than other exposures, but without reaching 100 % of snail mortality along with the 40 days of exposure. However, the above observations together with the present study strengthen the particular necessity, in *L. stagnalis*, to take greater account of the differences in the calibration criteria and also the variability in intraspecies inter-population sensitivity to xenobiotic toxicity within ecotoxicological studies implementing *L. stagnalis*. To that regard, a recent paper from Côte et al. (2015) highlighted the disparity in population sensitivity to Copper toxicity in *L. stagnalis*. They recommend performing toxicity tests in at least three to four populations with different genetic origins in order to picture properly the xenobiotic toxicity, notably for regulatory purposes. In particular, Gnatyshyna et al. (2011) proved the involvement of Methallotioneins in the high capacity of adaptation of *L. stagnalis* to Cd polluted areas. The Cd had very low immunotoxicity to *L. stagnalis* in the present study. It is worth noting that, based on the results of the study, it is impossible to conclude on the selected immunomarkers as early warning biomarkers. Again, this corresponds to the fact that none of the life-history traits nor immune traits (except phagocytosis) have been affected by the cadmium at the different exposure concentrations. In particular, no conclusions can be written regarding the concentration sensitivity to Cd of the assessed immunomarkers, their time-precocity (*i.e.*, effect of days not substantially different with or without Cd), their physiological precocity (*i.e.*, no early warning markers of health disturbance) or their physiological specificity (*i.e.*, immune function not specifically targeted by the xenobiotic). However, this study highlights the weak toxicity of Cd to *L. stagnalis* (*i.e.*, low molecular specificity) because at such high concentration and the wide variety of assessed endpoints, almost none have been significantly affected. Comparisons with other studies reveal Cd LC50s being higher than for many other contaminants. Comparative studies evidenced an important immunotoxicity of copper to marine bivalves (Matozzo et al. 2001, Gomez-Mendikute and Cajaraville 2003) and to go further in the assessment of the relevance of immune biomarkers in *L. stagnalis*, Cu could be a good case-study. Nevertheless, an important decrease in intra-individual hemocyte density has been observed in the course of the experiment, regardless the exposure condition. We previously observed such a decrease, altough to a lesser extent, in a study with snails first collected in a river and then maintained in the laboratory. In the latter study, survival was slightly higher and nitrite anion concentration remained below 0.1 $mg.L^{-1}$ (flow-through system), what brings to question about the possible effect of nitrite anion on snail survival and hemocyte density. To our knowledge, such information is lacking in the literature. In humans, relevant early warning immunomarkers of Cd exposures involve gene signatures (Dakeshita et al. 2009), particularly Methallothioneins (Lu et al. 2005). Other type of endpoint include immune cell ultrastructural analysis (*e.g.*, autophagy determination) as proposed by Di Gioacchino et al. (2008). For aquatic molluscan species, we summarized to the best of our knowledge the studies that investigated the immunotoxicity of Cd (Table 2), whether *in vivo* (upper part of the table) or *in vitro* (lower part of the table). No studies had been conducted before on freshwater gastropods. The

first striking remark is that a broad disparity in inter-species immunotoxic effects of Cd exists. Hormesis (Calabrese 2008) occurs but no consensual pattern of Cd immunotoxicity can be retained since they are contradictory each other's. Range of toxicities are species and immunomarker-dependants. Globally speaking, immunotoxicity is evidenced at high concentrations of Cd exposures. In some *in vivo* studies, survival impact and immunotoxicity occur at low concentrations (*i.e.*, $ng.L^{-1}$ range), without dose-response pattern (lower exposures may impact more importantly immune traits and survival). Immunotoxicity also is observed at high concentrations (*i.e.*, $mg.L^{-1}$ range) and the immune endpoints follow different pattern (increasing/decreasing). Hemocyte density is increased at very high Cd exposures in some studies while it is decreased significantly at concentration much lower. Some hemocyte endpoints were reported to be affected by Cd exposure in a dose-response manner (*e.g.*, phagocytosis), while this endpoint remained unaffected on other species at higher concentrations for comparable durations of exposure. Furthermore, worth is to note that several studies report the absence or the low immunotoxicity of Cd to aquatic molluscan species. Phenomenon of hemocytoponia, which corresponds to a sharp but transient drop in hemocytes are maybe occurring. It can explain partly the difficulty to picture properly the time-effect of xenobiotic immunotoxicities and the disparity between studies and species. Hence, in the present study we did not observe strong immunotoxicity of Cd exposure at the days assessed for the hemocyte endpoints assessed. Other hemocyte endpoints may be more sensitively affected by the presence of Cd, such as genes of interest (*i.e.*, Methallothioneins) at the transcriptomic level as it was observed in a previous study where phychiatric class of xenobotics increased significantly the transcription of TLR4 gene (toll-like receptor) in hemocytes of *L. stagnalis* (Gust et al. 2013). Many *in vitro* works have also been conducted to investigate the cytotoxicity of Cd to hemocytes of marine molluscan species (Table 2, lower part). No data about freshwater gastropods have been found in this context. At environmental realistic concentrations, no effects of Cd have been evidenced, whereas high concentrations (*i.e.*, higher than $mg.L^{-1}$) did induce cytotoxicity. The focus at the transcriptomic level of Methallothioneins seem to be appropriated for exposure biomarker (*i.e.*, greater sensitivity than viability endpoint).

Table 2: Compilation of immunotoxicity studies of Cd to aquatic molluscan species

species	**duration**	**concentrations**		**endpoint**	**study**
		range of exposure	**more specifically**		
In vivo					
oyster *Crassostrea gigas*	60 days	50 to 500 $ng.L^{-1}$ of Cd	50 $ng.L^{-1}$	↓ animal survival ↓ phagocytosis activity	(Bouilly et al. 2006)
			500 $ng.L^{-1}$	↑ animal survival phenol oxidase stable (dropped in controls)	
oyster *Ostrea edulis*	7 days	1 to 100 μM of Cd	1 μM	=hemocyte density ↑ ROS-positive hemocytes ↑ granulocyte membrane alteration	(Auffret et al. 2002)
			10 μM	↑ hemocyte density ↑ ROS-positive hemocytes ↑ granulocyte membrane alteration	
			50 μM	↓↓ animal survival ↑ hemocyte density ↓↓ ROS-positive hemocytes ↑ granulocyte membrane alteration	
atlantic oyster *Crassostrea virginica*	14 days	1 ppm of Cd^{2+}	1 ppm of Cd^{2+}	↓ hemocyte density (24h) ↑ hemocyte density (3, 7 and 14 days)	(Cheng 1988)
mediterranean mussel *Mytillus galloprovincialis*	96 h	$CdCl_2$ (0.4 μM)		↑ abcc-like gene expression in hemocytes ↑ Ca-AM efflux	(Della Torre et al. 2014)

part 2 of Table 2

In vivo					
common mussel *Mytillus edulis*	7 days	40 and 400 $\mu g.L^{-1}$ of Cd	40 $\mu g.L^{-1}$	↓ hemocyte density ↓↓ release acetyl-P-D-glucosaminidase after zymosan-stimulation	(Coles et al. 1995)
			400 $\mu g.L^{-1}$	↑ hemocyte density ↑ uptake of neutral red ↑↑release acetyl-P-D-glucosaminidase after zymosan-stimulation =hemocyte types =hemocyte ROS production =phagocytosis	
	7 days	0.04 and 0.4 ppm of Cd	0.04 and 0.4 ppm of Cd + challenge (*Vibrio tubiashi*)	= animal survival ↑ hemocyte density ↑ circulating eosinophils	(Pipe and Coles 1995)
marine Clam, *Tapes philippinarum*	7 days	0, 150, 300, and 450 $\mu g.L^{-1}$ of $CdCl_2.H_2O$		= phagocytosis activity = lysosomal stability index (60 min) =hemocyte superoxide dismutase activity =cytochrome oxidase index (except ↑ at 300 $\mu g.L^{-1}$)	(Matozzo et al. 2001)
freshwater clam *Corbicula fluminea*	30 days	3, 10, 21.4, 46.5 and 100 $\mu g.L^{-1}$ of cadmium	day 7, > 10 $\mu g.L^{-1}$ day 15 and 30, > 3 $\mu g.L^{-1}$ (except 10 $\mu g.L^{-1}$)	↓ phagocytic activity in a dose-response manner ↓ phagocytic activity ↑ (transient) at day 15 of time-effect on phagocytosis activity at 46 and 100 $\mu g.L^{-1}$	(Champeau et al. 2007)
freshwater snail *Lymnaea stagnalis*	40 days		60 $\mu g.L^{-1}$ at day 30	= animal survival ↓ phagocytic activity	current study

part 3 of Table 2

In vitro					
sea snail *Haliotis Tuberculata*	24h	1 and 100 $\mu g.L^{-1}$		= hemocyte viability =phagocytosis activity	(Ladhar-Chaabouni et al. 2015)
pacific oyster *Crassostrea gigas*	4 and 24h	3.10^{-11} to 3.10^{-4} M (of $CdCl_2$)		= hemocyte viability	(Gagnaire et al. 2004)
atlantic oyster *Crassostrea virginica*	72h	10 to 1000 $\mu mol.L^{-1}$		↑ hemocyte apoptosis (dose-dependent manner up to 100 $\mu mol.L^{-1}$) ↑ hemocyte necrosis	(Sokolova et al. 2004)
	20h	0.0016 to 356 μM of $CdCl_2$	5 to 36 μM ($CdCl_2$)	=viability ↑ hemocyte mRNA of methallothioneins = ROS production	(Roesijadi et al. 1997)
			36 to 356 μM ($CdCl_2$)	= viability hemocyte ↓ mRNA of methallothioneins ↓↓ ROS for oxidative burst	
	24h	$52,21.10^5$ to 1120.10^5 $\mu g.ml^{-1}$ of $CdCl_2.2(H_2O)$	400 μM	↓ hemocyte viability (LC50 of 400 μM) = ROS production	(Gomez-Mendikute and Cajaraville 2003)
	24h	10 to 2000 μM ($CdCl_2$)		LC50 neutral red uptake: 750 μM LC50 XTT assay : 400 μM ↑ acid phosphatase ↑ phagocytic ability	(Olabarrieta et al. 2001)
			(>100 μM)	disruption of actin cytoskeleton	
common mussel *Mytillus edulis*		10^{-3} to 10^{-9} mol		↓ hemocyte viability ↓ phagocytosis	(Rault et al. 2013)

5. Conclusion

On the whole, weak impacts on immune traits have been evidenced. At the tested concentrations, it is coherent with studies on other molluscan species. The phagocytosis capacity at 30 days of exposure was slightly jeopardized at 61 $\mu g.L^{-1}$. Reduced immunocompetence is also suspected for hemocyte density and phenoloxidase activity but the latter were close but lower than statistical significance. Over the long-term, weak Cd-induced immunotoxicity can have devastating effects on natural populations since they would be more vulnerable to infectious agents. No effects on snail survival nor reproduction have been observed. Viscera did accumulate Cd in a linear manner relatively to the concentration in the external medium. Population origin and calibration criteria are likely important sources of variation in the sensitivity of *L. stagnalis*' to general Cd toxicity.

Acknowledgements

The Rhône-Alpes region is thanked for the financial support granted to Paul Boisseaux in a PhD program fellowship (ARC3 Environnement). We also gratefully thank Dr. Nathalie Menetrey and the city of Renens that allowed us to get snails for carrying out the experimentation.

References

Voir à la fin du manuscrit.

Supplementary materials

Table S1 : Information about the groundwater used

Main parameters of water mediums (after 96 h of exposure) during the study	
Conductivity ($\mu S.cm^{-1}$)	570 – 650
Dissolved oxygen (%)	> 60 %
NH_4^+($mg.L^{-1}$)	< 0.1 ppm
NO_2^- ($mg.L^{-1}$)	0.2 – 0.4 ppm
pH	7.5 – 8.5

Chemical analysis of the groundwater (same origin than the one used during the study) in the course of the year	
HCO_3^- ($mg.L^{-1}$)	176 - 239
SiO_2 ($mg.L^{-1}$)	7.9 - 8.0
COT ($mg.L^{-1}$)	0.7 – 1.15
Cl^- ($mg.L^{-1}$)	15.0 – 17.1
SO_4^{2-} ($mg.L^{-1}$)	38.2 – 38.5
Na^+ ($mg.L^{-1}$)	10.5 – 11.7
K^+ ($mg.L^{-1}$)	2.2 – 2.5
Mg^{2+} ($mg.L^{-1}$)	7.5 – 7.8
Ca^{2+} ($mg.L^{-1}$)	63.1 – 85.3
NH_4^+ ($mg.L^{-1}$)	< 0.05
NO_2^- ($mg.L^{-1}$)	< 0.05
NO_3^- ($mg.L^{-1}$)	2.5 – 10.1
PO_4^{3-} ($mg.L^{-1}$)	< 0.1

The clean groundwater was pumped beneath the laboratory.

Table S2 : Details of the model retained to describe the hemocyte density datasets*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	110	93	127	-
	Replicate [inter aquarium effect]	0	0	46	-
	Residuals [intra-individual effect]	127	120	134	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	655	632	677	-
	day	-5	-6	-4	-14.3

*** R formula : lmer(density ~ day + (1| replicate/snail))**

Table S3: Details of the model retained to describe the hemocyte viability datasets*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	0.430	0.362	0.511	-
	Replicate [inter aquarium effect]	0.275	0.149	0.399	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.500	0.472	0.528	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	1.173	1.044	1.301	-
	Day	-0.007	-0.010	-0.005	-5.4

*** R formula : lmer(logit.viability ~ 1 + (1 | replicate/snail))**

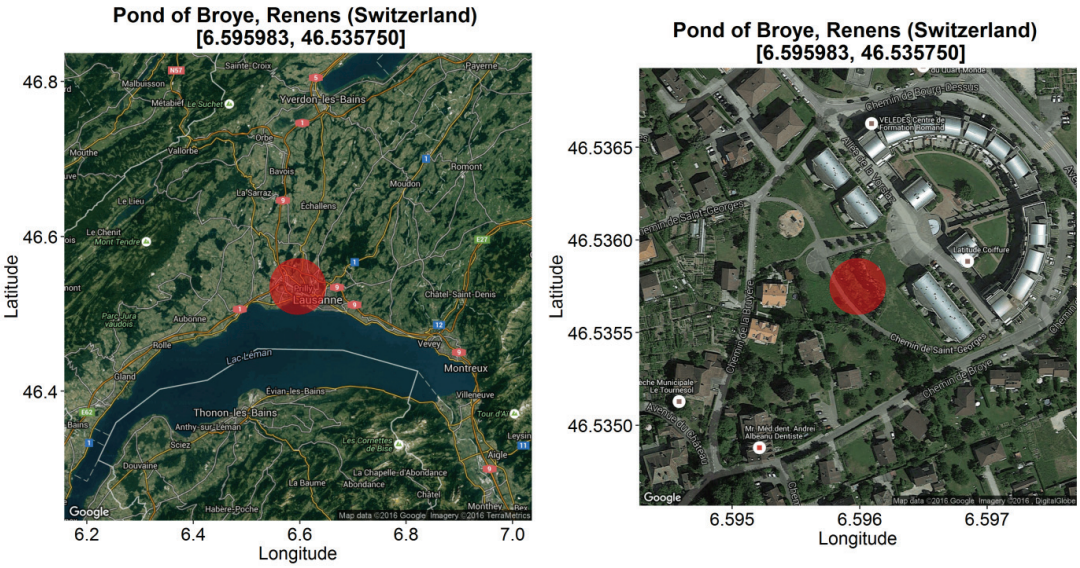


Figure S1 : Geographic information on snails' initial biota

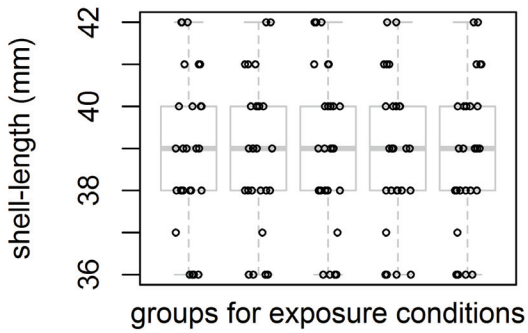


Figure S2 : Snail calibration by shell-length (39±3 mm)

At starting the experimentation, five groups of snails of identic heterogeneity in shell-length calibration criteria were established. Then, they were randomly assigned to beaker replicates into each corresponding exposure condition.

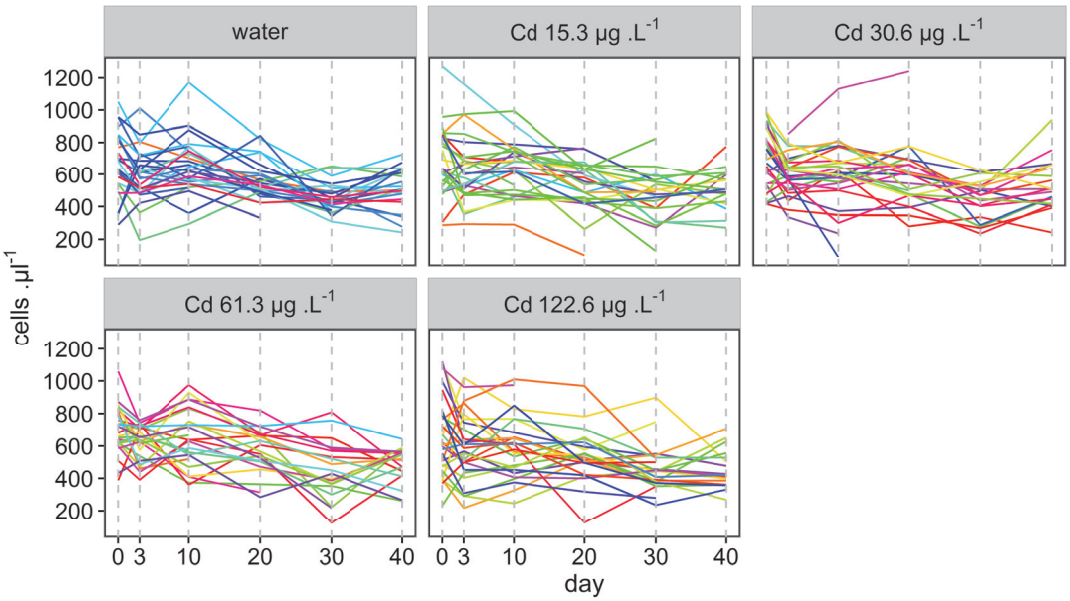


Figure *S3*: Evolution of individual hemocyte density. Each solid line represents the individual snail time-course evolution of its hemocyte density into the respective exposure conditions. When the line stops, it corresponds to (i) snails that died the following days or (ii) not interpretable flow cytometric data or (iii) snail that did not extrude hemolymph (i.e. no retraction reflex). The vertical grey and dashed lines correspond to the days of hemocyte density measurements.

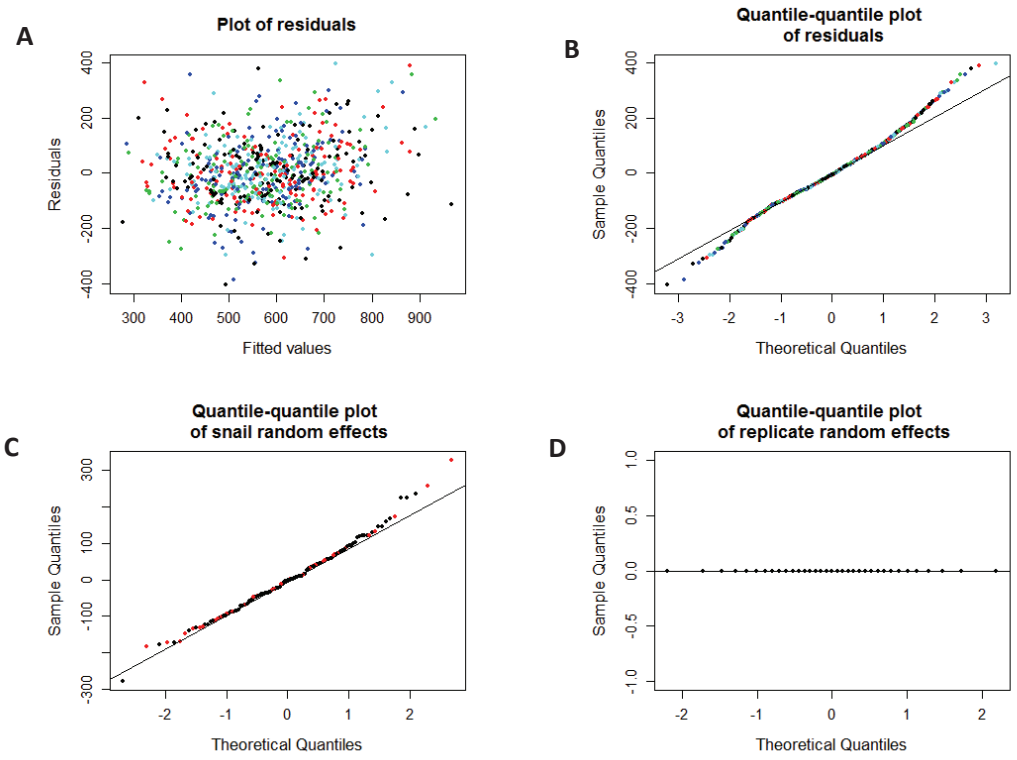


Figure S4 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte density model

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: Red dots correspond to snails that died at some point during the experiment. The normal distribution assumption of snail random effects is reasonable. The scarce outlier dots are not all red and so the snail vital prognostic is unlikely the reason of their deviation from normality. D: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

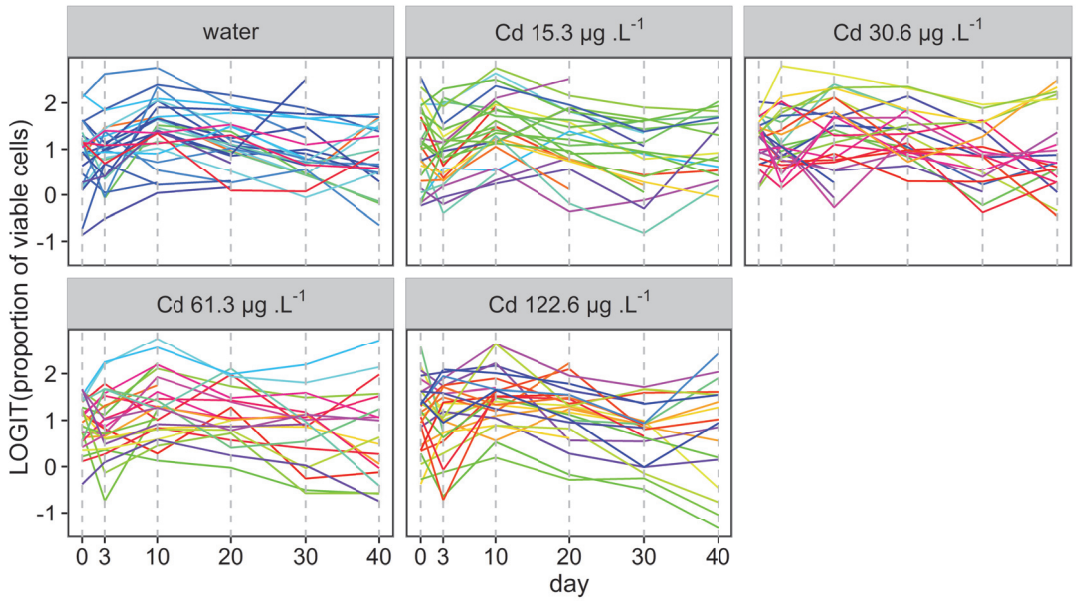


Figure S5 : Individual hemocyte viability (LOGIT of the proportion of viable cells) in the exposure conditions over time

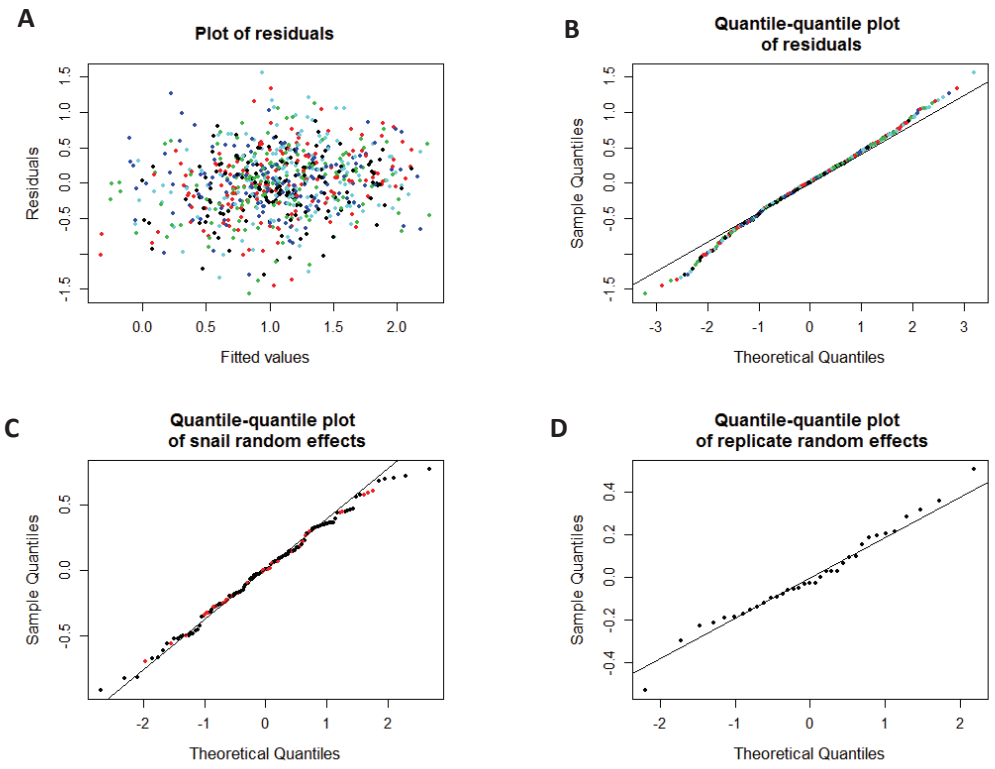


Figure S6 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte viability model

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: Red dots correspond to snails that died at some point during the experiment. The normal distribution assumption of snail random effects is reasonable. The scarce outlier dots are not all red and so the snail vital prognostic is unlikely the reason of their deviation from normality. D: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

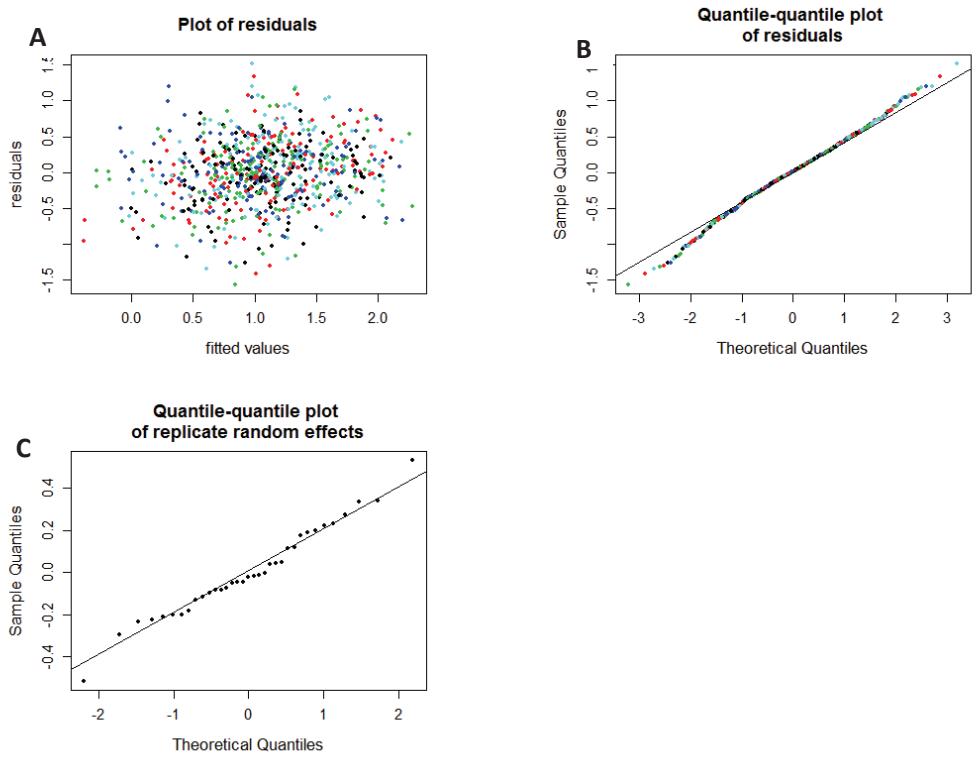


Figure S7 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the phagocytosis capacity model

A: Colors correspond to exposure conditions. This plot suggests that residuals are homoscedastic. B: Colors correspond to exposure conditions. The normal distribution assumption for residuals is reasonable. C: The normal distribution assumption for replicate random effect seems reasonable.

La contamination au cadmium à des concentrations beaucoup plus élevées que la réalité environnementale a induit une immunotoxicité très modérée. De manière similaire, l'expérience du chapitre 5 avec l'exposition au pesticide deltaméthrine — à des concentrations environnementalement réalistes dans ce cas — a révélé un faible impact immunotoxique sur *L. stagnalis*. Des effets potentiellement dévastateurs en milieu naturel peuvent survenir pour cause d'un affaiblissement léger mais chronique de la compétence immunitaire des organismes. En revanche, pour l'affirmer, il est nécessaire de mener des études sur le très long-terme mais cela complique les designs expérimentaux. Ce projet de thèse visait à déterminer la pertinence d'utilisation de marqueurs d'immunocompétence dans un contexte de contamination de **moyenne durée** ou subchronique. Toutes les expositions réalisées jusqu'à présent ont été faites à des concentrations plus ou moins élevées mais toujours avec des xénobiotiques uniques, c'est-à-dire sans mélanges de plusieurs contaminants. Il se peut que certains polluants intéragissent spécifiquement avec le système immunitaire de *L. stagnalis* a l'instar des PEs (perturbateurs endocriniens) qui interagissent spécifiquement avec le système hormonal de certaines espèces à de faibles concentrations. Ainsi, la probabilité de rencontrer des xénobiotiques avec une affinité particulière pour le système immunitaire de *L. stagnalis* est augmentée dans le contexte d'une **multicontamination urbaine**. Par ailleurs, il se peut que l'interaction avec le système immunitaire ne soit effective que par la résultante d'une synergie de plusieurs xénobiotiques. Dans les **milieux aquatiques anthropisés**, une source majeure de multicontamination provient des **effluents de stations d'épuration** qui se déversent dans les rivières. En exposant les organismes à des effluents bruts (*i.e.*„ non dilués dans l'eau de rivière) mais traités (*i.e.*„ en sortie de STEP), nous **maximisons le scénario de pression chimique** d'origine anthropique auquel *L. stagnalis* est susceptible de faire face en milieu naturel. C'est dans ce contexte que l'approche multibiomarqeurs d'immunocompétence a été évaluée dans le chapitre suivant.

Chapitre 7

Exposition de longue durée à une multicontamination anthropique réaliste : effluents bruts de station d'épuration

Sommaire

7.1 Contexte et objectifs 303
7.2 Article 8 : Réponses immunitaires de l'escargot *Lymnaea stagnalis* face à des effluents urbains traités de station d'épuration 304

7.1 Contexte et objectifs

Les effluents de station d'épuration des grandes zones urbaines représentent une source importante de la contamination chimique d'origine anthropique des milieux aquatiques. Ces effluents contiennent de multiples micropolluants et de multiples agents infectieux. Dans ce contexte multistress réaliste, ce chapitre présente une étude d'exposition de *L. stagnalis* à des effluents de STEP bruts (100%) et dilués (12.5%).

L'objectif est de fournir des éléments d'information sur la **sensibilité** de réponse des immunomarqueurs face à des **concentrations** environnementalement réalistes en micropolluants et agents infectieux. Les expositions ont duré 29 jours et les immunomarqueurs ont été mesurés à différents intervalles de temps afin de gagner des éléments d'information sur leur **rapidité de réponse**.

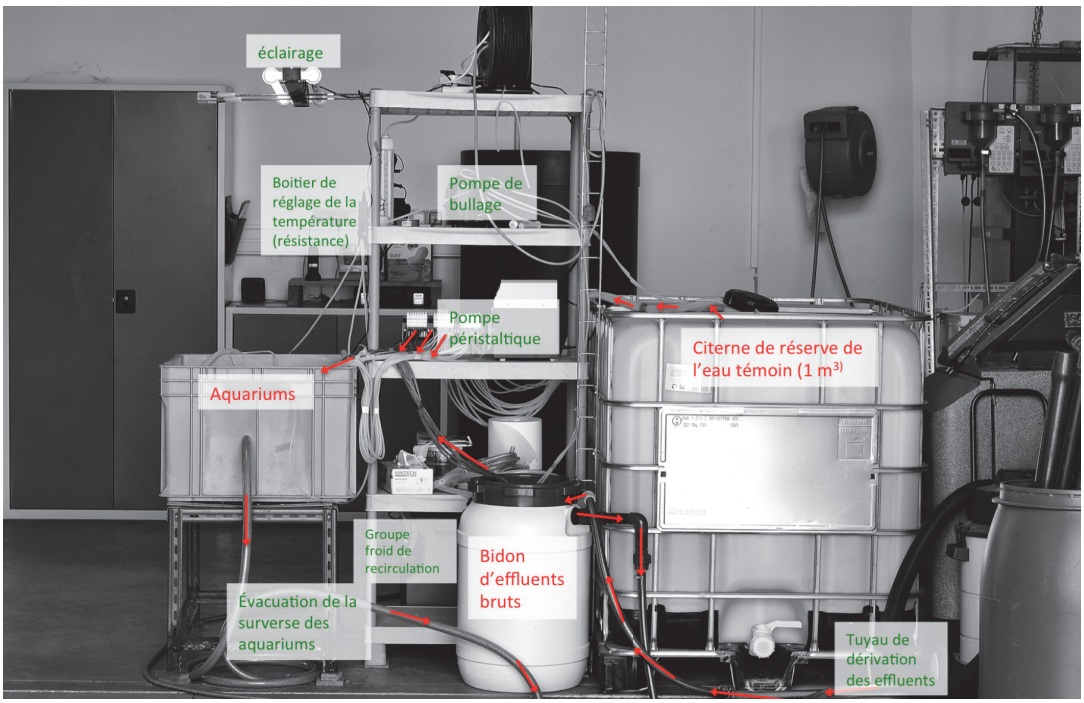


FIGURE 7.1 – Photographie de l'installation mise en place dans le hall expérimental, à côté de la STEP, où les expositions ont eu lieu

7.2 Article 8 : Réponses immunitaires de l'escargot *Lymnaea stagnalis* face à des effluents urbains traités de station d'épuration

Article 8 (à soumettre)

Type : *full-length article*

Résumé

Introduction et objectifs : Des études préalables ont montré que les marqueurs d'immunocompétence chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* étaient peu impactés par la présence de xénobiotiques isolés (*i.e.,* non mélangés), à des concentrations environnementales ou à de plus fortes concentrations. La réalité environnementale de ces expositions est faible car dans l'environnement, la pression chimique d'origine anthropique sur la biocénose comporte de très nombreuses substances différentes. Des effets biologiques peuvent apparaitre en réponse à une synergie entre contaminants (*i.e.*, effet cocktail). Par ailleurs, dans les milieux aquatiques les organismes sont soumis à de multiples stress de différentes natures, en particulier des microbes. Les effluents de station d'épuration de grandes zones urbaines sont connues pour constituer un intrant majeur de la multipollution chimique et microbiotique dans les rivières. Dans ce contexte multistress, l'étude présentée s'est attachée à évaluer si l'exposition des effluents de station d'épuration pouvait impacter les marqueurs d'immunocompétence chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea stagnalis* et ainsi fragiliser son système de défense interne, ce qui pourrait le prédisposer aux infections pathogènes ou parasitaires dans les milieux.

Matériel et méthodes : *L. stagnalis* a été exposé pendant 29 jours à des effluents de station d'épuration de la zone urbaine de Lyon. Trois conditions ont été mises en places : effluents bruts (100 %), effluents 12.5% et témoins (eau de forage [1]). Les expositions ont été réalisées avec un système à renouvellement continu de l'eau (aquariums et pompes péristaltiques ; voir la fig. 7.1 p.303). Le poids frais des organismes a été mesuré au début et à la fin de l'expérience. Plusieurs marqueurs d'immunocompétence ont été évalués à l'échelle individuelle : densité et viabilité hémocytaire (j= 0, 3, 10, 29), activité phénol-oxydase

1. eau pompée directement dans la nappe phréatique sous le laboratoire

non spécifique (j=10), activité oxydative immunocompétente (j= 3 et 29) et activité de phagocytose (j= 29).

Résultats : Une augmentation du poids frais des organismes a été mesurée pour le groupe exposé aux effluents 12.5% et encore plus pour celui des effluents 100%, cependant aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre les trois groupes. Concernant les marqueurs d'immunocompétence, les résultats montrent qu'une subtile réponse inflammatoire induite par les effluents 100% est suspectée mais les différences entre les témoins et les groupes exposés sont à la limite de la significativité statistique ($t>|2|$) avec les modèles linéaires à effets mixtes utilisés. Bien que non significatif, nous supectons un effet des effluents 100% qui se traduit par une légère augmentation des densités hémocytaires (tendance globale sur l'ensemble de l'expérience), une augmentation de l'activité phénol-oxydase hémolymphatique au jour 10, une augmentation de l'activité oxydative immunocompétente des hémocytes au jour 29 et une diminution de la capacité de phagocytose au jour 29.

Discussion : De tels effets inflammatoires, faibles mais prolongés (dans le temps) peuvent mener à des effets délétères à l'échelle des populations. Cela peut provoquer des *tradeoffs* physiologiques et impacter *in fine* la *fitness* des individus. D'autres études sont requises pour évaluer les effets immunitaires et les effets sur d'autres traits de vie des effluents de station d'épuration lors d'expositions de très longue durée, par exemple supérieures à 50% du temps de vie des organismes. C'est ce type d'investigation qui permettrait de mieux identifier les réels effets immunotoxiques ou immunomodulateurs causés par un stress chronique venant des rejets urbains auxquels les organismes doivent faire face en permanence dans les milieux. Enfin, il se peut que les effluents de la station d'épuration étudiée aient une bonne qualité chimique. Des essais de détection de modifications comportementales sur un autre organisme d'eau douce ont montré que ces effluents n'avaient pas ou peu d'effets, alors que d'autres effluents fortement contaminés issus d'une autre station d'épuration avaient des effets beaucoup plus marqués (résultats non publiés).

Conclusion et perspectives : Plusieurs marqueurs d'immunocompétence semblent avoir été légèrement impactés par les effluents de cette station d'épuration. Afin de mieux

comprendre la sensibilité de ces marqueurs d'immunocompétence dans un contexte multistress réaliste de l'environnement (plusieurs contaminants et plusieurs microbes) et donc pour aller plus loin dans la caractérisation de la pertinence de leur évaluation en écotoxicologie, il serait nécessaire de réaliser une exposition à des effluents de station d'épuration (i) connus pour être "plus contaminés en micropolluants que la normale", (ii) évaluer les immunomarqueurs de manière répétée dans le temps et évaluer les performances de reproduction et tout cela (iii) pendant plus de 5-6 mois.

Mots-clés : *Lymnaea stagnalis*, STEP, réponses immunitaires, hémocyte, multicontamination

The immune system of the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* facing treated urban wastewaters

Paul Boisseaux[a], Patrice Noury[a], Nicolas Delorme[a], Lucile Perrier[a], Didier Coupet[a], Hélène Thomas-Guyon[b], Jeanne Garric[a]

[a]*Irstea Centre de Lyon-Villeurbanne, Laboratoire d'Écotoxicologie, MAEP, 5 rue de la Doua, 69626 VILLEURBANNE (France)*
[b]*LIttoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs) - UMR 7266, Bâtiment ILE 2, rue Olympe de Gouges, 17 000 La Rochelle*

Abstract

Freshwater snails *Lymnaea stagnalis* were exposed for 29 days to raw effluents of a waste water treatment plant from the urban area of Lyon (France). Exposures were set in a flow-through system. A time-course analysis of individual markers of immunocompetence were performed (hemocyte density and viability, hemocyte NADPH-activity, phenoloxidase activity and capacity of phagocytosis) and compared to water controls. Subtle inflammatory responses induced by the effluents 100% are highly suspected. This can bring to devastating population effect in natural environments since such very long-term stress from anthropogenic activity will likely provoke life-history tradeoffs. Further studies are needed for longer periods of exposure in order to better picture the stress that wild organisms are chronically facing.

Keywords:

Lymnaea stagnalis, WWTP, immune responses, hemocytes, multicontamination

1. Introduction

Domestic, industrial and hospital waste waters constitute complex mixtures that will undergo treatments directly through WWTP before they are released in surface waters. All this anthropogenic activity generates a wide variety of chemical micropollutants coming from multiple usages. Few examples encompass alimentation products (*e.g.*, caffeine), pharmaceuticals (mother molecules and metabolites) (Ferrari et al. 2003, Ferrari et al. 2004, Besse and Garric 2008, Leclercq et al. 2009, Besse et al. 2012, Aminot et al. 2016), pesticides (*e.g.*, leachates or surface runoffs) (Gerecke et al. 2002, Köck-Schulmeyer et al. 2013), personal care products (Miege et al. 2009a), surfactants (Schröder 1993) and fluosurfactants (*i.e.*, Perfluorooctanesulfonic acids) (Ahrens et al. 2009, Yu et al. 2009), composite materials (*e.g.*, PCBs (Polychlorinated biphenyl)) (Urbaniak and Kiedrzyńska 2015), Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Mailler et al. 2015, Ozaki et al. 2015), metal contamination (Gagnon et al. 2014). The treated effluents will then be discharged in rivers and by extension aquatic wildlife will be under chronic chemical pressure from anthropogenic origin. Among the likely encountered xenobiotics, a wide range of known ecotoxic effects are now under attention from scientific community. Effluents from WWTPs are known to contain endocrine-disruption contaminants (Fent et al.

2008, Miege et al. 2009b, Dagnino et al. 2010, Cédat et al. 2016). Adverse effects on life-history traits of ecotoxicological relevant organisms have been evidenced, in particular reprotoxic (Brion et al. 2004, Gust et al. 2010, Gust et al. 2014) and genotoxic effects (Lacaze et al. 2013, Wigh et al. 2016).

A growing body of evidences highlights prospective or retrospective hazards of contaminants on immune system of non-target organisms (Fournier et al. 2001, Galloway and Depledge 2001, Auffret et al. 2002, Auffret et al. 2004, Gagnaire et al. 2007, Russo et al. 2009, Segner et al. 2012, Gust et al. 2013a, Boisseaux et al. 2014, Renault 2015, Le Guernic et al. 2016) and notably from waste water treatment plant effluents (Gagné et al. 2002, Akaishi et al. 2007, Salo et al. 2007, Gagné et al. 2008, Müller et al. 2009, Farcy et al. 2011, Gust et al. 2013b). The immune system is of particular importance because animals in natural environments are facing multiple stress, among which the microbiological threat. The organisms' immunocompetence plays determinant role into their vulnerability to contracting infectious diseases and so into their health condition. Furthermore, analysis of immune parameters of surrogate species may be used as environmental pollution exposure biomarkers. The snail *Lymnaea stagnalis* is a freshwater gastropod living in natural environments of Lyon's areas. It is a promising model organism in environmental immunotoxicology, notably because the hemolymph can be collected mechanically with a relative confidence in the non-detrimental effect of the method (Boisseaux et al. 2016). It has been previously observed that river samples downstream a WWTP of Montreal area (*i.e.*, < 0.1 km, 1 km, 5 km and 10 km) had notable effects on immune parameters of *L. stagnalis* following 7 days of exposures (Gust et al. 2013b). The mixing zone ratio of WWTP effluents to the river flow is often likely higher than 1:500. Hence, the present study was designed to investigate the potential immunotoxicity of WWTP effluents (*i.e.*, before mixing zone in river) because we intended to maximize the anthropogenic multicontamination pressure that wildlife is chronically facing. To that aim, we exposed the treated effluents (100%) directly to *L. stagnalis* in a flow-through system for 30 days. An intermediate exposure consisting in 1 : 8 dilution with groundwater control was set to see if dose-responses occurred. Individual time-course assessments of markers of immunocompetence have been performed all along the experiment. All analysis have been realized on hemocytes which are the circulating immunocompetent cells of this species. The rationale of the study was both (i) to investigate the potential immunotoxicity of raw WWTP effluents to the snail *L. stagnalis* and (ii) to provide greater insights into the ecotoxicological relevance of the assessed immunomarkers in environmental multicontamination context.

2. Material and methods

2.1. Experimental system

The experimentation lasted for 29 days. The system was run for one week before starting the experimentation (*i.e.*, before adding snails in their respective conditions).

Three exposure conditions were set (one per aquarium) : (i) water control consisting in clean groundwater (see SM), (ii) 12.5 % of effluents (mixture with clean groundwater) and (iii) 100% of effluents. Effluents are referred to the unfiltered effluents coming directly from the output of the WWTP on the site before they are dis-

charged in the river. To that aim, a derivation from the WWTP effluent output pipe disposal was realized into a 60 L storage tank from which the effluent was pumped (flow-though system). With respect to the groundwater control, a storage tank of 1 m^3 capacity was brought on the site and regularly filled by transporting the water from our laboratory. This water was the same as used for rearing the snails (see SM).

Exposures took place in an experimental hall located next to the WWTP. Three 15-L glass aquaria were disposed in a water-bath set at 20±1 ˚C (monitored with tynitag recorders) and they were adjusted at 10L with an outflow disposal. Organisms were exposed in a flow-through system. Peristaltic pump (Ismatec BVP) were used to deliver a water flow of 23±1 $ml.min^{-1}$ into each aquarium in order to achieve approximately 3.3 renewals of the aquarium's body water per day. A neon-tube lightning provided a photoperiod to the snails (16h/8h light/dark daily cycles).

2.2. Informations about the WWTP and the effluents

With approximately 2.24 billion of people, Lyon is the second most inhabited urban area of France (Insee). The wastewater treatment plant (WWTP), from which the municipal effluents came from, is implanted in this urban area. It was built/designed to achieve a treatment capacity of 300 000 population-equivalent (*i.e.*, 91 000 $m^3.j^{-1}$). Briefly, this WWTP consists in pretreatment of the influent municipal waste waters (screening, grit removal, fat skimming off, and primary lamella settling) and then the biological treatment will reduce carbonated pollution by oxygenation and the azoted pollution by nitrification/denitrification steps. Sludges are treated separately. To date and to our knowledge, no thorough chemical micropollution analysis of effluents have been done in this WWTP but it is classified as being in accordance with French regulation for no alert classification (see details in supplementary material (SM)).

2.3. Snails

A total of 72 snails were selected from the breeding stock of our laboratory according to shell-lengths (37 ±2 mm) and wet-weights (3±0.6 g) calibration criteria. They were split into three cohorts of 24 snails of similar calibration homogeneities and assigned to the three aquaria (*i.e.*, one cohort per condition). Organisms wet weights were recorded (blotted dry) at the day 0 and the day 29 (see details in SM). The fold-increase in wet weight of each organism was then calculated as the weight at day 29 divided by the weight at day 0. Note that during the experimentation, all organisms were fed lettuce *ad libitum*.

2.4. Markers of immunocompetence

The hemolymph was collected at different days by stimulation of the shell-retraction reflex provoking extrusion of hemolymph through the hemal pore. Hemolymph was thus collected with a micropipette into 500 μl polypropylene tubes (Dutscher, Dumath, France). The laps of time between collection and further biomarker assessments was minimized and the order of snails analyzed was randomized between conditions and days in order to troubleshoot possible artefact coming from hemocyte adhesion to the tube, as discussed in Boisseaux et al. (2016).

Several markers of immunocompetence have been evaluated. Immunocapacity is defined as the combination of hemocyte density and viability (*i.e.*, non-functionnal markers of immunocompetence) and immunoefficiency was defined as the combination hemocyte-related oxidative activities, phenol-oxidase activities

and capacity of phagocytosis (functional markers of immunocompetence).

Hemocyte density and viability. were assessed at days 0, 3, 10, 20 and 29. The methods employed are described in Boisseaux et al. (2016). Briefly, they were separately assessed in flow cytometry (Guava easyCyte™ 6-HT apparatus, Millipore). Hemocyte density was determined directly in the tubes without addition of any extra-medium in order to be close to the physiological status. For hemocyte viability, cells were adjusted at 50 000 per well replicate (Greiner, polystyrene, U-bottom) and propidium iodide (PI) was used for discrimination of dead hemocytes.

Hemocyte oxidative activities. were assessed at days 3 and 29. Briefly, 50 μl of hemolymph per snail were deposited in duplicate in a 96-well plate (Greiner, polystyrene, flat bottom). After centrifugation, the lymph was replaced by buffer solution. This corresponded to the basal oxidative activity. Additional analysis (other duplicates) was performed by challenging the hemocytes *ex vivo* with zymosan particles (125 $\mu g.well^{-1}$). This addition intended to stimulate the NADPH-oxidase activity which corresponds to the immunocompetent oxidative activity of *L. stagnalis*' hemocytes involved in microbe destruction.

Phenol-oxidase activity. was assessed at the day 10. The method was adapted from Seppälä and Leicht (2013). Briefly, 50 μl were deposited in duplicate into a 96-well plate (Greiner, polystyrene, flat bottom). The activity was monitored by absorbance measurement (480 nm, TECAN microplate reader, 60 min kinetic with 2 min interval measurements) after addition of 50 μl of L-DOPA at 5 $mg.mL^{-1}$ dissolved in SSB pre-warmed at room temperature.

Phagocytosis capacity. was assessed at day 29. First, hemolymph samples were diluted at 500 $cells.\mu l^{-1}$ with a final volume of 200 μl per well in order to achieve 100 000 $hemocytes.well^{-1}$. Dilutions were realized by using SSB pre-warmed at room temperature, in a 96-well plate (Greiner bio one, for cell cultures, sterile, F-bottom, polystyrene). Samples with a hemocyte density lower than 500 $cells.\mu l^{-1}$ were not diluted and so 200 μl of the raw sample were added per well. Then, a quantity of $7.2 .10^5$ fluorescent microbeads (polyscience YG 2.0 μm latex microsphere) were gently mixed with each sample, what corresponds to a hemocyte-to-bead ratio of 1:7 for 100 000 hemocytes. The plate was shielded from light and slowly agitated for 24h in a thermo-controlled chamber (Aqualytic, TC Serie 140G). Afterwards, hemocytes were fixed (SSB containing 0.5% of formaldehyde (v/v) and 0.2% (w/v) of sodium azide) and samples were read in the Green photomultiplicator of the flow cytometer (10 000 events were acquired per sample). Phagocytosis capacity was finally calculated as the percentage of hemocytes that engulfed at least one bead.

2.5. Statistical analysis

The R software was used (R Core Team 2016). Survival curves were plotted using the survival package (Therneau 2015). Data were right-censored as all organisms did not die during the experiment. The logrank test was run to enquire about statistical significant survival differences between conditions. For analysis of fold-increase in weights of organisms between exposure conditions, the kruskal-wallis test was run. Linear mixed-

effect models (LMEMs) were fit to the markers of immunocompetence datasets by using the lmer function from the lme4 package (Bates et al. 2015). For hemocyte density and viability, models were first built with one fixed effect, the day, and an interaction term of the day with the condition (coded as a qualitative variable). The snail was included as a random effect. Note that beforehand, the data of hemocyte viability – expressed in proportions – were transformed into logit values for normalization of its distribution. For the phenol-oxidase activity, models were built with the condition as fixed effect and as random effect the plate series' in which kinetics were monitored by spectrofluorimetry. For the phagocytosis capacity, models were built with the condition as fixed effect and as random effect the plate series' in which microbeads were mixed with hemocytes. Note that beforehand, dataset of the phagocytosis capacity was logit-transformed for normalization. For oxidative activities, two independent analysis were done for the day 3 and the day 29. Models were built with the factor "zymosan" (two modalities, "presence" or "absence"), the condition and an interaction term between zymosan and the condition. The plate series' was included as a random effect. In each model, an effect was considered statistically significant when the 95% confidence interval (CI) of its regression coefficient did not contain the value "0". The unbiased pattern of models, their homoscedasticity and normality assumptions were verified by looking at the residuals and normal quantile-quantile plots of the respective effects (SM).

3. Results

3.1. Survival and weight increases

Snail mortality was low since all exposure conditions ended with a snail survival higher than 80% (survival curves in fig. S1, SM). The logrank test did not suggest significant differences among the exposure conditions. Snails exposed to effluents have a higher weight-increase than water controls (fig. 1). Median of fold-increase in wet weights are approximately 1.15, 1.30 and 1.40 for water control, effluent 12.5% and effluent 100% exposure conditions, respectively. However, the kruskal-wallis test did not suggest the difference between conditions to be statistically significant (p>0.05).

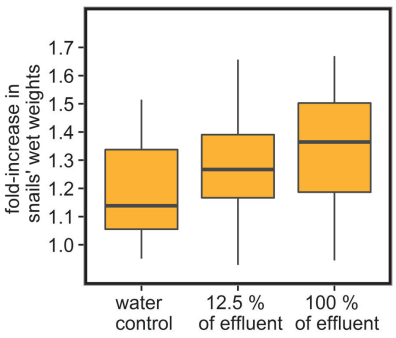


Figure 1: Weights increases

This figure corresponds to the fold-increase in wet weights of individual snails of respective exposure conditions between the day 0 and the day 29. At starting the experiment, snails into each condition were homogeneously calibrated by weights (fig. S2, supplementary material).

3.2. Immunocapacity

Figure 2 shows the time-course evolution of snails immunocapacity. Over the whole experiment, the mean

of hemocyte density was 536 $cells.\mu l^{-1}$ (95% CI of 500 – 571). These values are similar to other immune studies carried out on *L. stagnalis* (Boisseaux et al. 2016). Visually, no strong effect of effluent exposures are observed along with time for the hemocyte density (fig. 2A). However, the 95% CI of the regression coefficient of the interaction term of "effluent 100%" with the "day" (LMEM) is [-0.07 – 7.67] and the corresponding t-value is 1.91 (see table S1 in SM). This is at the extreme lower limit of the statistical significance chosen (95% CI of the regression coefficient contains the value "0"). Consequently, it is highly suspected that effluent 100% had an effect by increasing the snails' hemocyte density over time compared to water control. Complementary analysis was realized by coding the day within the model as a qualitative variable. Results suggest only the day effect to be significant only at day 3 and day 10. Furthermore, one interaction was detected between the day 29 and the condition "effluent 100%" with a mean [95% CI] of its regression coefficient of 109.0 $cells.\mu l^{-1}$ [-1.8 ; 220.2]. Hence, this strengthens the likely increase effect of the "effluent 100%" compared to water control, which is significant at the day 29. Regarding the hemocyte viability, no strong effect of effluent exposures are observed (fig. 2B). The mean of logit-transformed hemocyte viability was 1.06 (95% CI of 0.90 – 1.20) what corresponds to 74.3% of cell viability (95% CI 71.1 – 76.8). These values are consistent with other immune studies carried out with *L. stagnalis* (Boisseaux et al. 2016). LMEM analysis confirms the absence of significant effect of effluents compared to controls. However, a significant negative "day" effect is suggested over the course of the experiment, but this is independent from the condition (table S2, SM).

3.3. Immunoefficiencies

The phenol-oxidase-like activity – evaluated at the day 10 – is higher for exposure conditions "effluents 12.5%" and "effluent 100%" (fig. 3A) than for the water control. However, LMEM analysis does not suggest these differences to be statistically significant. The capacity of phagocytosis at the day 29 (fig. 3B) is lower for the "effluent 100%" condition than for "effluent 12.5%" and water control. LMEM analysis does not suggest significant differences between exposure conditions. Nevertheless, the 95% CI of the coefficient of "effluent 100%" is estimated at [-0.61 ; 0.05] (logit-transformed values) (t-value of -1.7). Hence, a negative impact of the "effluent 100%" is also highly suspected.

Hemocyte oxidative activities at the day 3 are not strongly affected by exposure conditions. The stimulation of the activity by zymosan particles was significant at the day 3 but it was even more successful at the day 29. At this latter day, the basal oxidative activity of hemocytes are increased for exposure of 100% effluent compared to the water control. Both 12.5% and 100% effluent exposures have a higher zymosan-stimulated oxidative activity than the water control. Nevertheless, statistical inferences suggest that effects of exposure conditions with effluents are not significantly different from the water control, whether we consider the basal or the zymosan-stimulated oxidative activity of hemocytes. LMEMs suggest very weak interaction effects between exposure conditions and the success of stimulation with zymosan. However, the condition "effluent 100%" at the day 3 had a t-value of 1.54 what is notable and in coherence with observed boxplots, although not statistically significant. Furthermore, at the day 29, LMEM confirms the even more marked increase of "effluent 100%" in oxidative activity compared to control.

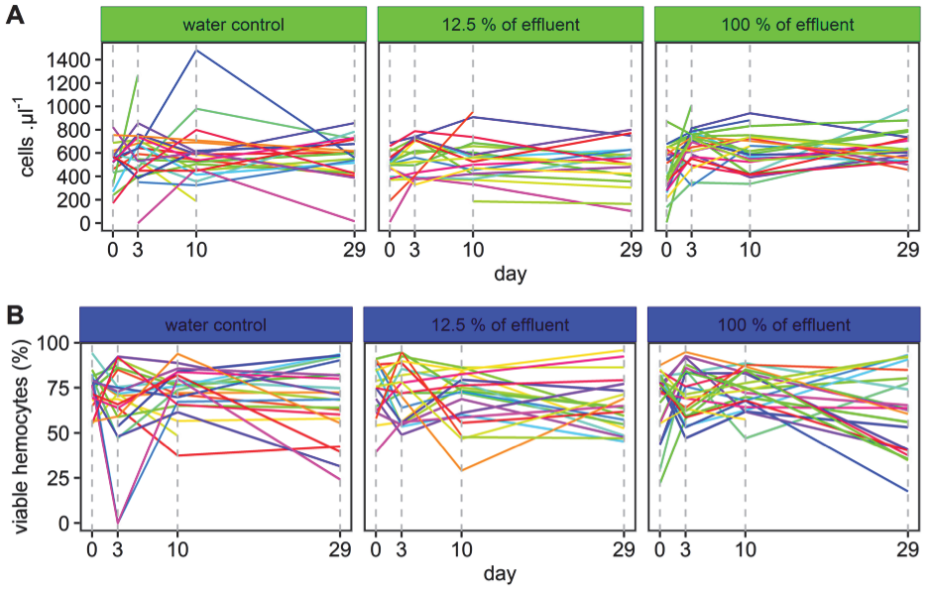


Figure 2: Immunocapacity of snails over the course of the experiment

The graph **A** corresponds to the hemocyte density while the graph **B** corresponds to hemocyte viability which were measured at an individual scale over the course of the experimentation into the three exposure conditions. The vertical grey and dashed lines indicate the days of hemolymph sampling and immunocapacity quantification.

The estimated 95% CI of the corresponding coefficient is estimated at [-0.01 ; 0.24] (log10-transformed values) (t-value of 1.80). Again, inferences are at the extreme statistical significance for this effect and so "effluent 100%" are highly suspected to increase significantly the oxidative activity of hemocytes at the day 29.

4. Discussion

Snails succesfully survived to effluents exposures (survival rate higher than 80% for all condition at the end of the 29 days implementing exposure period). All the water parameters matched the OECD recommendations for ecotoxicological tests with *L. stagnalis* (Ducrot et al. 2014). Snails exposed to effluent had a higher weight-increase over 30 days than the ones from water control. Since all organisms were fed lettuce *ad libitum*, it can be suggested than organic matter and microbial loads in effluents are partly responsible for the observed results. Markers of immunocompetence were not strongly affected by the effluents. Nonetheless, we can highly suspect increase tendencies in hemocyte densities, oxidative and phenol-oxidase activities and a reduced phagocytosis capacity resulting from exposure of effluents 100%. Many inferential analyses were at the extreme limit of statistical significance.

Such subtle inflammatory effect can have devastating consequences for wild specimens since it is well-known that immune system is a highly-demanding energetic process. Indeed, maintaining the immune system under abnormal high activity for long periods will likely induce life-history tradeoffs. To better assert this, further research is needed and particularly for longer periods because it is the only way to picture the likely in natura effects of subtle interaction of WWTP effluents with the immune system of *L. stagnalis*.

Even if no chemical quantification of micropollutants have been realized, we may reasonably consider the effluents to be contaminated by multiple xenobiotics. Furthermore, by considering the dilution factor of effluents in the mixing zone of the river higher than 500, the present study intended to elicit a stronger concentration exposure of micropollutants (from this source) than in natura reality downstream the WWTP. A previous study had investigated the effect of municipal effluents to immune responses of *L. stagnalis* (Gust et al. 2013b). Contaminated mediums were collected directly downstream the mixing zone of a WWTP discharged (from <0.1 km up to 10 km). Immune responses at the cellular level consisted in statistically significant increases in hemocyte density, ROS production, thiol groups and phagocytosis capacity and efficiency. By collecting effluents directly from the WWTP (*i.e.*, before discharge in the river), the induced immune responses were expected to be stronger. Results infirmed this expectation but direct comparison is tricky since (i) snails were not from the same population, (ii) snail calibration was different, (iii) WWTP was not the same, (iv) methodologies employed were different and (v) chemical micropollution is likely different as well as (vi) microbial effluent loads. In spite of that, similar trends were observed in regards to immunostimulation or immune inflammation of effluent-exposed snails, except for phagocytosis capacity. By exposing the snails to chemical multicontamination at environmental relevant concentrations, a high probability was expected to expose at least one xenobiotic interacting specifically with the immune system of *L. stagnalis* or eventually indirectly immunotoxic after altering other physiological function at earlier stage.

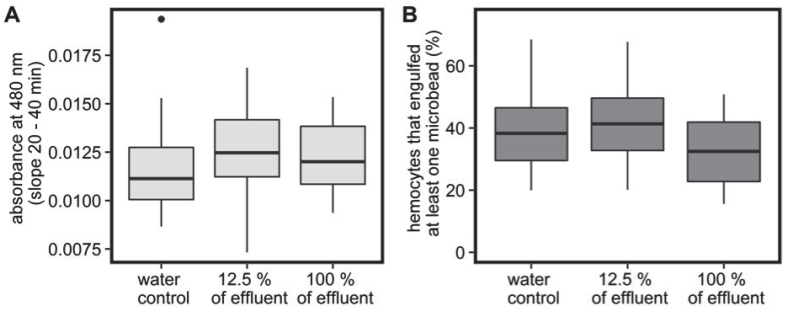


Figure 3: Immunoefficiencies explorations

The graph **A** corresponds to the phenol-oxidase-like activity of hemolymph samples at the day 10. The graph **B** corresponds to the capacity of phagocytosis of hemolymph samples at the day 29.

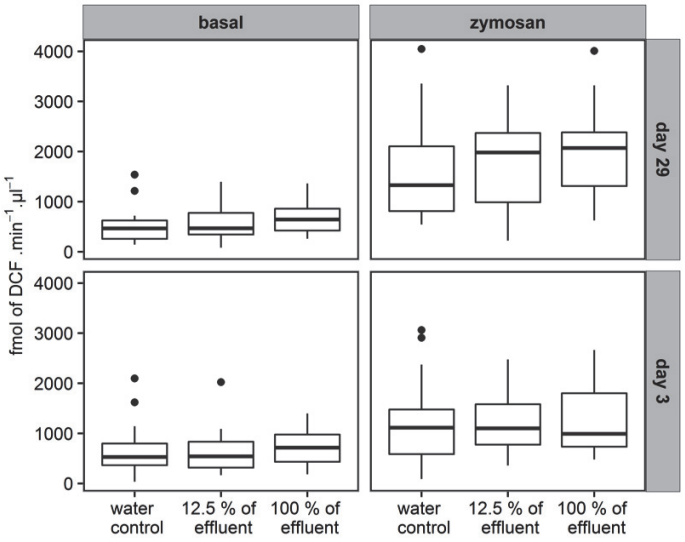


Figure 4: Oxidative activities of hemocytes

This graph represents the oxidative activity of hemocytes from snails assessed at the day 3 and 29 into the respective exposure conditions. The activity was assessed in the basal status as well as in the stimulated status consisting in an *ex vivo* challenge of hemocytes with zymosan particles in order to stimulate the immunocompetent oxidative activity (*i.e.*, likely NADPH-oxidase).

The present study reports that the studied raw WWTP effluents did not jeopardize strongly – under conservative statistically viewpoint significance – the assessed markers of immunocompetence in *L. stagnalis*. Other endpoints or focus at lower biological levels (*e.g.*, genomics, proteomics) are likely relevant to consider in further environmental immunotoxicological investigation with *L. stagnalis*.

Controls were not exposed to microbes. On the contrary, it is well-known that WWTP effluents contain multiple microbes. Even if the microbial load in raw effluents has not been quantified, we can confidently assume that snails from these conditions were continuously exposed to bacteria over the whole course of the experiment. Consequently, we pictured their a posteriori immunocompetence. For example, in the study of Gust et al. (2013b), heterotrophic bacteria (HB) have been quantified at 92.105 and 820.105 HB $CFU.g^{-1}$ (colony-forming unit) in snail tissues exposed to upstream WWTP water and downstream (<0.1 km) WWTP water, respectively. It is well-known that some microbes can stimulate some immune parameters of aquatic molluscan species (Van der Knaap et al. 1987, Oubella et al. 1993, Hubert et al. 1997, Mitta et al. 1999, Allam et al. 2000, Bianchi et al. 2015). As often in environmental immunotoxicology, immune responses are highly correlated to both chemical micropollution and microbial loads (Gagné et al. 2002, Akaishi et al. 2007, Farcy et al. 2011, Gust et al. 2013b).

Apart from micropollution, particles in suspension (*e.g.*, organic matter, nanomaterials, microplastics) other than microorganisms may interact with the immune system of aquatic species. For instance, human carbon manufactured nanomaterials (*i.e.*, graphene platelets in this example) are known to be internalized in model cell lines (Lammel et al. 2013) and to play Trojan-horse role for xenobiotics (Lammel et al. 2015). In aquatic molluscan species, immune systems are thought to be an important target of nanomaterials and immunotoxicity has already been reported in bivalves (Canesi et al. 2008, Canesi et al. 2012). These studies bring ideas about further hemocyte-related endpoints worth to assess in WWTP effluent exposures context (*e.g.*, microscopy analysis for materials, lysosomal and mitochondria activities, defense-enzyme activities, etc).

Last, in another study (unpublished data), effluents of WWTP "alpha" did not induce effects on locomotion capacity of a freshwater amphipod, whereas effluents from another WWTP did impact importantly their locomotion. Such comparisons indicate a possibly good quality of effluents from the WWTP alpha. To go further, it would be of great interest to compare immune responses of *L. stagnalis* exposed to effluents from a WWTP for which quality is clearly identified as alarming, and investigate it under a longer period (*e.g.*, few months).

Conclusion

The immune system of snails – characterized by a battery of hemocyte endpoints – faced with success exposures to urban WWTP effluents for 29 days of duration. If we consider that (i) urban WWTP effluents are a well-known source of xenobiotics and microbial multicontaminations and (ii) the dilution factor in the mixing zone in the river is likely higher than 500, then we may ascertain that these immune endpoints in this species are poorly able to detect environmental contamination from anthropogenic origin. However, it is highly suspected

that effluent 100% did induce subtle inflammatory responses and if so, consequences on the long-term can be important (life-history tradeoffs). Further work should focus on longer periods of exposures and also include other biomarkers approaches (*e.g.*, transcriptomics).

Acknowledgements

Funding

The Rhône-Alpes region provided financial support to Paul Boisseaux in a PhD fellowship program (*ARC3 Environnement*).

References

Voir à la fin du manuscrit.

Supplementary material

Table S1 : Information about groundwater and WWTP effluents quality

Main parameters of water mediums during the study		
All conditions	Dissolved oxygen (%)	> 60 %
	NH_4 (ppm)	< 0.05
	NO_2 (ppm)	0.05 – 0.1
	pH	7.5 – 8.0
Groundwater control	Conductivity ($\mu S.cm^{-1}$)	400 – 450
Effluents 12.5 %		430-500
Effluents 100%		700-750
Chemical analysis of the groundwater (same origin than the one used during		
HCO_3^- ($mg.L^{-1}$)		176 - 239
SiO_2 ($mg.L^{-1}$)		7.9 - 8.0
COT ($mg.L^{-1}$)		0.7 – 1.15
Cl^- ($mg.L^{-1}$)		15.0 – 17.1
SO_4^{2-} ($mg.L^{-1}$)		38.2 – 38.5
Na^+ ($mg.L^{-1}$)		10.5 – 11.7
K^+ ($mg.L^{-1}$)		2.2 – 2.5
Mg^{2+} ($mg.L^{-1}$)		7.5 – 7.8
Ca^{2+} ($mg.L^{-1}$)		63.1 – 85.3
NH_4^+ ($mg.L^{-1}$)		< 0.05
NO_2^- ($mg.L^{-1}$)		< 0.05
NO_3^- ($mg.L^{-1}$)		2.5 – 10.1
PO_4^{3-} ($mg.L^{-1}$)		< 0.1
Key-figures of the WWTP raw effluents over the course of the experimentation		
Treated water output flow		51447 $m^3.day^{-1}$ (sd = 12970)
Biochemical oxygen demand (5 days)		3 $mg.L^{-1}$ (sd = 1.2)
Chemical oxygen demand		25 $mg.L^{-1}$ (sd = 9)
suspended matters		6 $mg.L^{-1}$ (sd = 2.3)
NK		3 $mg.L^{-1}$ (sd = 2.2)
NH_4		2 $mg.L^{-1}$ (sd = 1.9)

Table S2 : Details of the model retained to describe the hemocyte density dataset*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	86.4	45.9	120.4	-
	Residuals [intra-individual effect]	173.9	156.3	192.7	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	536	500	571	-
	Day effect	0.8	-2.0	3.8	0.5
	Interaction of the "days" with "effluent 12.5%"	-1.6	-5.6	2.3	-0.8
	Interaction of the "days" with "effluent 100 %"	3.8	-0.07	7.7	1.9

***R formula : lmer(density ~ day + condition :day + (1|snail), data=immuno)**

Table S3 : Details of the model retained to describe the hemocyte viability dataset*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	0.23	0.000	0.387	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.80	0.727	0.888	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	1.06	0.902	1.207	-
	Day effect	-0.01	-0.019	-0.001	-2.28

***R formula : lmer(logit.viability ~ day + (1|r.snail), data=immuno)**

Table S4 : Details of the model retained to describe the hemocyte oxidative dataset at the day 29*

		estimate	Confidence intervals		t-value
			2.5 %	97.5 %	
Random effects (corresponding standard deviations)	Snail [inter-individual effect]	0.00	0.00	0.09	-
	Residuals [intra-individual effect]	0.28	0.24	0.31	-
Fixed effects (corresponding coefficients of the model)	Mean [intercept]	2.65	2.54	2.77	-
	Effluent 12.5% effect	0.01	-0.12	0.14	0.17
	Effluent 100% effect	0.11	-0.01	0.24	1.80
	zymosan effect	0.48	0.38	0.58	9.06

***R formula : lmer(log10(ROS) ~ condition + stimulation + (1 | plaque), data=a29)**

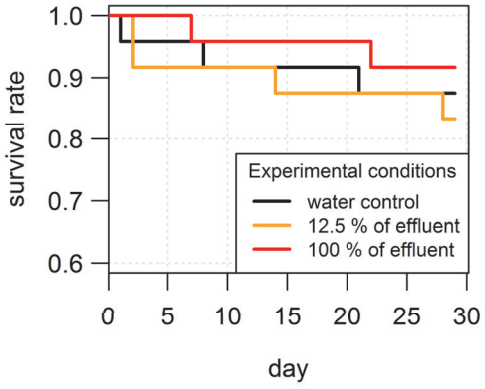


Figure S1 : Survival curves

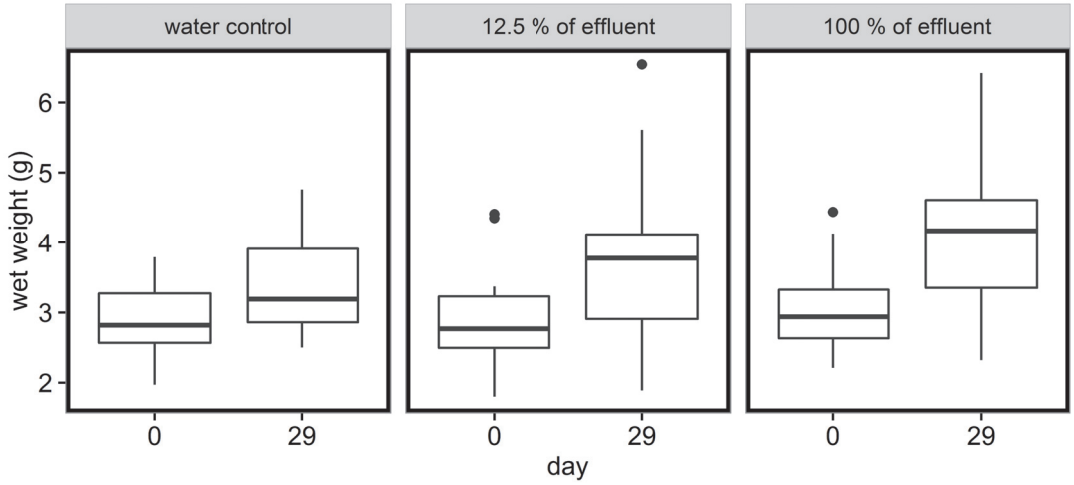


Figure S2 : Wet weights of organisms

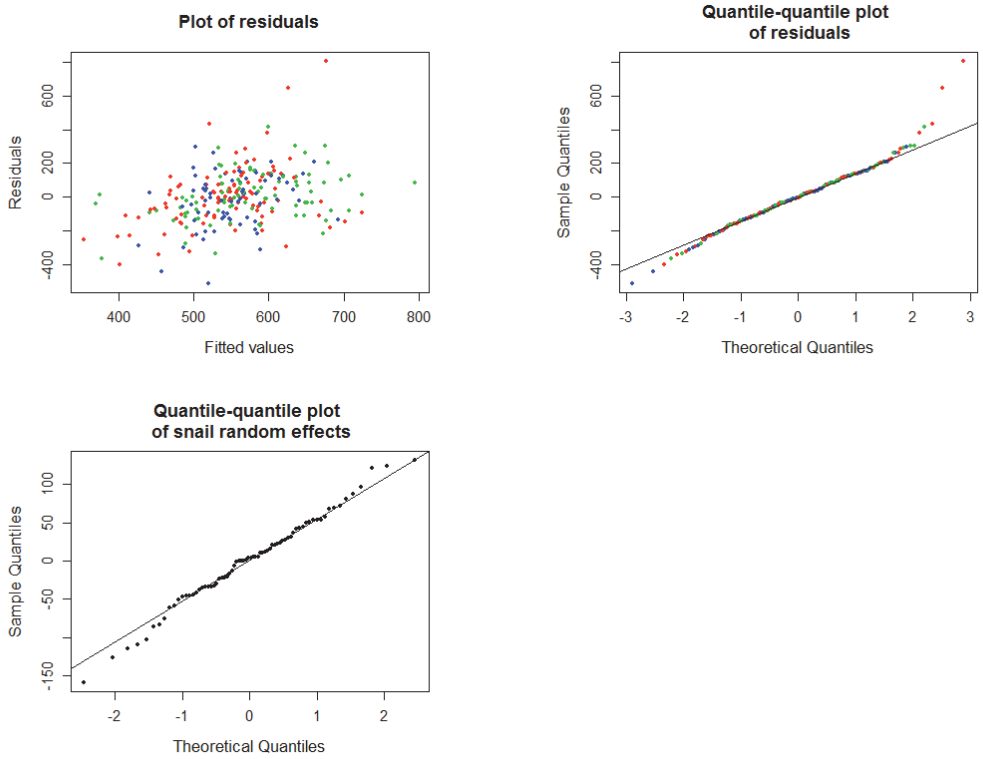


Figure S3 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte density model

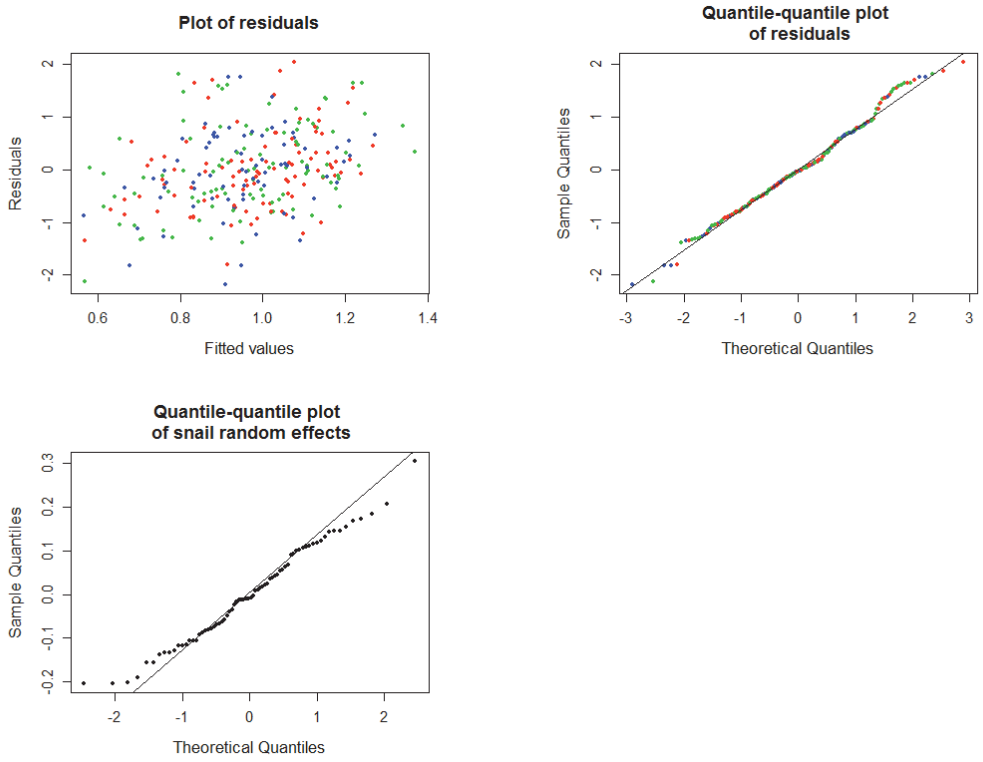


Figure S4 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the hemocyte viability model

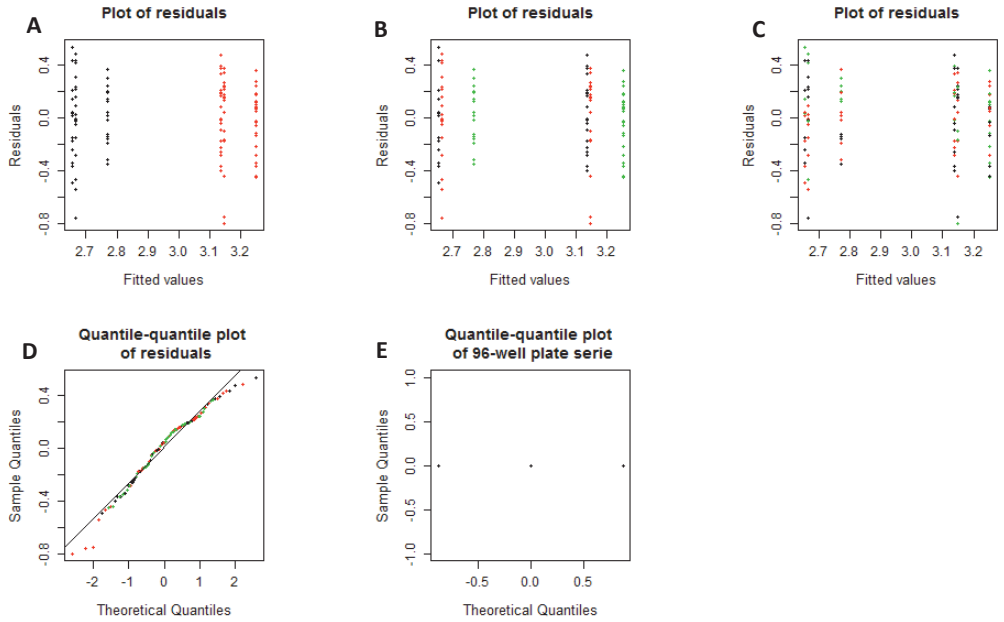


Figure S5 : Visual verification of assumptions on residuals and random effects for the oxidative activity model for the day 29 : assay with the "condition" factor

A : Colors correspond to "zymosan stimulation" factor. They explain the existence of two main clusters.

B : Colors correspond to "exposure condition" factor. They explain the existence of three groups in each previous cluster. Green dots correspond to "effluent 100%" and so we observed that they are higher than other conditions, whatever the stimulation status (t-value was of 1.80).

C: Colors correspond to the 96-well plate series. They are randomly assigned to exposure conditions.

D: The normality assumption is reasonable.

E: The 96-well plate series random effect is low.

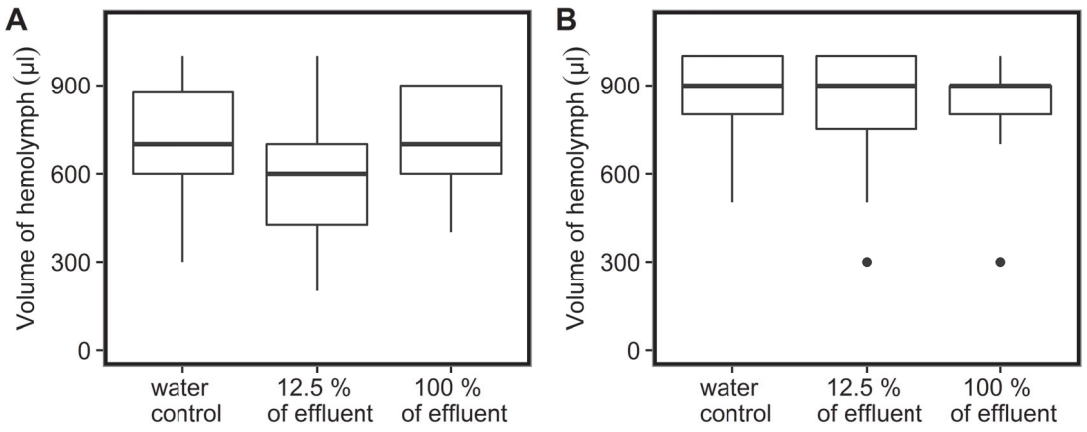


Figure S6 : Volume of individual snail's hemolymph collected

The volume was roughly quantified into categories of 100 µl increments from 100 up to 1000 µl. At the day 10 (**graph A**), a slight lower level of hemolymph volume per snail is observed for the 12.5% effluent group compared to controls and 100% of effluents. However, this difference is reverted at the day 29 (**graph B**). Overall volumes at the day 29 are higher than at the day 10.

Bilan — Objectifs et questions de la thèse

première partie : CARACTÉRISATIONS FONDAMENTALES ET MISE AU POINT DE L'APPROCHE MULTIBIOMARQUEUR

Objectif 1 Améliorer les connaissances générales sur *L. stagnalis* pour son utilisation au laboratoire.

Méthode Compiler les connaissances, acquérir des données biométriques et prospecter en milieu naturel et anthropisé.

Résultats et conclusions

1. Le poids frais et la taille me semblent être les critères de calibration les plus adaptés pour débuter une expérimentation.
2. Des élevages de *L. stagnalis* sont possibles mais nécessitent beaucoup de place et d'entretien (personnel technique nécessaire), la croissance est longue et les élevages peuvent péricliter pour des raisons que nous n'avons pas identifiées (deux fois). Il faut multiplier les aquariums en série pour pallier ce type d'écueil et éviter de soumettre les juvéniles à un débit d'eau trop élevé (des conditions semi-statiques sont appropriées).
3. Remarques générales de l'utilisation du modèle : l'acclimatation des organismes de terrain a été un succès mais pas celle d'une autre souche de laboratoire. La ouate de cellulose est à éviter pour le transport des organismes et il est préférable de ne pas les nourrir dans ce cas pour éviter des pics de nitrite trop important.
4. Il me semble pertinent de nourrir les limnées *ad libitum* avec de la salade et de compléter le régime alimentaire une fois par semaine avec des paillettes d'homogénats de poissons et crustacés (croissance, robustesse, quantité d'hémolymphe)
5. Remarques générales de l'utilisation du modèle pour évaluer les performances de reproduction : le comptage des œufs est très chronophage et la pertinence ne semble pas réellement démontrée pour justifier une première approche visant à caractériser la reprotoxicité d'un contaminant chez *L. stagnalis* (sans approfondissement des mécanismes), alors que le comptage des masses pourrait suffir comme cela a été suggéré [Charles *et al.* , 2016]. La mesure de la longueur de chaque masse comme première approximation du nombre d'œufs pourrait être réalisée dans une première approche. Il est préférable de laisser le plus de place et de volume possible pour les organismes afin de limiter les effets de surpopulation qui pourraient artificiellement mener à une stimulation de la reproduction. Cela représente mieux ce qui se passe en milieu naturel (*e.g.*, 5 organismes dans un bécher de 1L c'est trop). Le volume doit être adapté en fonction de la taille des limnées et je recommande au moins 10 mL par mm de taille de limnée (*e.g.*, 400 mL pour une limnée de 40 mm ou pour 40 limnées de 1 mm). Le système de renouvellement de l'eau (semi-statique *vs* continu) peut aussi aider à décider du *design* expérimental approprié.
6. Les organismes en milieu naturel sont plus abondants au printemps — été que le reste de l'année (en septembre — octobre il y a très peu d'organismes). La collecte en rivière est très chronophage et n'est pas pratique pour récupérer une cohorte suffisamment nombreuse et calibrée pour envisager une expérience en écotoxicologie tant que nous ne connaissons pas des lieux à fortes densités de cette espèce pour en récupérer un nombre suffisant et calibré pour faire une expérience écotoxicologique. Les limnées peuvent *a contrario* être très abondantes dans certaines mares urbaines.

Objectif 2	Fournir (i) une vision d'ensemble des études immunitaires/immunotoxicologiques chez *L. stagnalis* et (ii) une approche multibiomarqueurs — simple et robuste — pour l'évaluation de l'immunocompétence chez *L. stagnalis*.
Méthode	Faire une revue bibliographique. Mettre au point les techniques de mesure de l'immunocompétence de marqueurs fonctionnels et non-fonctionnels. Utiliser la spectrofluorimétrie et la cytométrie en flux. Utiliser un inducteur de la réponse immunitaire.
Résultats et conclusions	La revue bibliographique fait état de nombreux avantages de l'espèce *L. stagnalis* comme modèle en immunotoxicologie environnementale : avantages en écotoxicologie et en immunologie/parasitologie. La revue a permis de synthétiser l'ensemble des études réalisées sur *L. stagnalis* et de clarifier les axes de recherches futures. Une approche multibiomarqeur simple et robuste a été développée concernant des paramètres fonctionnels et non-fonctionnels hémocytaires : densité et viabilité hémocytaire, activité de phagocytose, activité oxydative immunocompétente et activité phénol-oxydase. Les particules de zymosane sont des stimulateurs puissants de l'activité oxydative et donc il est recommandé d'utiliser cette dernière pour diagnostiquer la bonne mise en place de l'activité enzymatique immunocompétente.

Objectif 3	Déterminer si le facteur « prélèvement de l'hémolymphe » est problématique pour utiliser le modèle *L. stagnalis* en immunotoxicologie environnementale lorsque plusieurs prélèvements sont réalisés par individu au cours du temps.
Question	Sommes-nous sûr que le **prélèvement répété** de l'hémolymphe par stimulation mécanique de son réflexe de rétraction n'est pas invasif ?
Hypothèse	Cela dépend de la « **fréquence de prélèvement** ». À une fréquence de prélèvement élevée, la survie et certaines caractéristiques des hémocytes peuvent être affectées.
Méthode	Étudier plusieurs fréquences de prélèvements et évaluer des paramètres fonctionnels et non fonctionnels hémocytaires (sans contamination chimique).
Résultats et conclusions	Hypothèse partiellement confirmée. À des fréquences de collecte allant de 1/96h jusqu'à 1/24h, les différences sur la survie des organismes ne sont pas statistiquement significatives. Néanmoins, si des collectes répétées sur une longue période sont envisagées, je recommande d'augmenter progressivement les intervalles de collectes de manière raisonnable. De plus, nous ne savons pas dans quelle mesure la présence de contaminant peut affecter la capacité de résilience des organismes (intéractions d'effets *prélèvement* et *contamination*). À une fréquence de 1/24h, la collecte répétée de l'hémolymphe augmente significativement la viabilité des hémocytes, alors qu'à des fréquences de 1/48h et moins, la viabilité hémocytaire n'est pas affectée par l'effet prélèvement. En revanche, la densité hémocytaire n'est pas affectée par la fréquence de collecte d'hémolymphe. Concernant des marqueurs fonctionnels, l'activité oxydative (basale et stimulée au zymosane) est affectée par une fréquence de 1/48h à partir de la troisième collecte, ce qui pousse à recommander de laisser un intervalle de temps supérieur à 48h si plus de deux collectées sont effectuées. Comme pour la survie, les collectes répétées doivent raisonnablement être espacées si l'étude se focalise une une période de longue durée car nous ne connaissons pas dans quelle mesure la présence de contaminants peut interférer avec la résilience des organismes et leur capacité à renouveler leur stock hémocytaire avec des statuts et paramètres fonctionnels identiques avant la collecte.

Objectif 4	Apporter des éléments de compréhension complémentaires concernant la variabilité des paramètres hémocytaires chez *L. stagnalis* : par individu (dans le temps, variabilité intra-individuelle), entre individus (variabilité inter-individuelle) et entre populations ou expériences.
Question	Quel facteur est prépondérant dans la variabilité hémocytaire des hémocytes ?
Hypothèse	La variabilité est fortement influencée par les individus et moins par le temps (*i.e.*, la variabilité inter-individuelle est plus élevée que la variabilité intra-individuelle). Par ailleurs, différentes populations ont des valeurs de paramètres hémocytaires assez différentes les unes des autres ce qui constitue une forte contrainte pour une approche de *biomonitoring in situ*.
Méthode	Réaliser une évaluation individuelle et répétée dans le temps de marqueurs d'immunocompétence sur plusieurs populations. Utiliser des outils statistiques adaptés (« non-classiques ») pour intégrer l'ensemble des facteurs qui peuvent influer sur la variabilité.
Résultats et conclusions	L'hypothèse est réfutée en partie. Concernant la densité et la viabilité hémocytaire, la variabilité intra-individuelle (*i.e.*, par individu au cours du temps) est de même ordre de grandeur que la variabilité entre individus (*i.e.*, variabilité inter-individuelle). Cela vaut pour les données acquises dans la première partie du travail de thèse avec la population d'élevage d'Irstea. Dans la deuxième partie, certaines expériences, notamment avec des populations de terrain, ont montré une variabilité intra-individuelle (dans le temps) plus élevée que la variabilité inter-individuelle (voir la *Discussion générale*). L'utilisation de modèles linéaires à effets mixtes est adaptée et pratique pour décrire les jeux de données sur les marqueurs d'immunocompétence. Ces outils permettent de prendre en compte l'effet de collectes répétées par individu dans le temps et selon plusieurs conditions expérimentales et réplicats. L'utilisation d'une modélisation permet de comprendre facilement la part de plusieurs effets dans les tendances d'un jeu de données complexe. Les seuils de significativités ($t>|2|$) sont assez conservatifs et permettent d'éviter les fausses conclusions positives (*i.e.*, faux positifs). Cependant, cette faible sensibilité pourrait faire passer à côté d'un faible effet (faux négatifs) et donc les tendances doivent être interprétées avec précaution. Lorsqu'un effet a une valeur de t comprise entre $|1.6–1.99|$, alors cet effet peut être suspecté.

Objectif 5	Clarifier et apporter des éléments complémentaires de connaissance sur la structure des hémocytes chez *L. stagnalis*. Apporter des éléments de réflexion concernant la pertinence de l'utilisation d'approche structurelle des hémocytes chez *L. stagnalis* dans un contexte écotoxicologique.
Question	Les différences structurelles entre hémocytes sont-elles suffisantes chez *L. stagnalis* pour envisager une quantification des populations/sous-populations hémocytaires ?
Hypothèses	Certains auteurs parlent de hyalinocytes et de granulocytes. Cela révèle une grande différence structurelle qui peut être quantifiée en cytométrie de flux et semi-quantifiée en histologie. Par ailleurs, nous ne connaissons pas suffisamment l'ultrastructure des hémocytes chez *L. stagnalis*.
Méthode	Analyser les groupes (*i.e.*, *clusters*) en cytométrie de flux des aspects hémocytaires taille-structure. Réaliser des analyses histologiques des hémocytes : colorations classiques (éosinophiles-acidophiles-neutrophiles) et microscopie électronique à transmission et balayage.
Résultats et conclusions	Hypothèse réfutée en partie. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence des types d'hémocytes différents. Il existe un seul type d'hémocytes neutrophiles et qui peuvent être polynucléaires pour certains. Leur observation peu granuleuse en microscopie photonique tend à les qualifier plutôt de hyalinocytes (agranulocytes). Un faible gradient de taille-structure existe mais celui-ci est difficilement perceptible. Cependant, les cytogrammes obtenus en cytométrie en flux confirment l'existence de trois sous-populations. La proximité des régions, leur chevauchements et les très faibles différences structurelles observées en microscopie photonique entre ces régions sont autant de raisons pour ne pas inciter à les quantifier de cette manière (peu robuste). Par ailleurs, les observations des hémocytes en microscopie électronique ont permis de compléter les connaissances et descriptions de ces cellules chez *L. stagnalis*. En particulier, deux structures inconnues et abondantes ont été décrites et observées. Cela ouvre ouvre des portes pour rechercher leur nature et leur possible fonction dans l'immunité des organismes.

deuxième partie : IMMUNOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

Objectif 6	Déterminer si l'approche multibiomarqueurs d'immunocompétence mise en place permet de rendre compte d'une perturbation d'origine chimique dans un contexte environnemental réaliste.
Question	Quelle **sensibilité** les marqueurs d'immunocompétence présentent-ils face à des contaminants ? (concentrations environnementales vs concentrations non réalistes)
Hypothèse	L'exposition à des contaminants à des concentrations réalistes de l'environnement impactent les marqueurs d'immunocompétence étudiés chez *L. stagnalis* mais cela est subtil [2]. Une multicontamination à des concentrations environnementales va perturber ces marqueurs d'immunocompétence de manière plus marquée. L'exposition d'un contaminant à de fortes concentrations (qui ne sont pas représentatives de la réalité environnementale) va impacter plus fortement ces marqueurs d'immunocompétence et mener à des immunosuppressions.
Méthode	Utiliser l'approche multibiomarqueurs mise en place lors d'expositions à court et moyen-long terme à des contaminants environnementaux et à des concentrations environnementales et beaucoup plus élevées. Réaliser une exposition à des effluents de station d'épuration (multicontamination réaliste de l'environnement).
Résultats et conclusions	Hypothèse réfutée en partie. Des modulations de biomarqueurs d'immunocompétence ont été observées à des concentrations environnementales. Celles-ci étaient en effet assez subtiles. Les modulations des marqueurs d'immunocompétence face aux contaminants testés étaient faibles. Dans nos études, ces marqueurs n'étaient pas des biomarqueurs d'exposition pertinents pour ces contaminants, à l'exception de la PO vis-à-vis de l'exposition à la DTM. La multicontamination réalisée par exposition d'effluents de STEP n'a pas induit d'effets immunomodulateurs plus marqués que lors de contaminations uniques à des concentrations environnementales. Des concentrations fortes (plus élevées que la réalité environnementale d'un facteur d'au moins 100) ont induit une seule fois une immunosuppression (Etoposide) mais pour toutes les autres molécules, les immunomodulations étaient faibles ou absentes. L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe une faible sensibilité de réponse des immunomarqueurs quelque soit les concentrations d'exposition aux xénobiotiques qui ont été testées.

2. Un effet est considéré subtil lorsque la statistique inférentielle ne permet pas de conclure à un effet significatif mais donne des résultats de significativité qui sont dans la zone « grise » de la limite du seuil de significativité. Dans ce manuscrit, cela correspond à des effets avec une valeur de t comprise entre |1.6—1.99| lors de l'utilisation des modèles linéaires à effets mixtes correspondants.

Objectif 7	Déterminer l'importance du temps d'exposition à un contaminant pour observer des modulations de marqueurs d'immunocompétence chez *L. stagnalis*.
Question	Existe-t-il une **rapidité**[3] de réponse des marqueurs d'immunocompétence à une pollution chimique ?
Hypothèse	Des expositions courtes permettent d'observer des immunoréponses (faibles vs fortes concentrations). Sur le moyen-terme, ces immunoréponses sont plus fortement marquées (*e.g.,* immunosuppressions).
Méthode	Faire des expositions de courtes et moyennes durées avec plusieurs temps de mesure des paramètres immunitaires par individu.
Résultats et conclusions	Il existe une rapidité de réponse car des expositions de courtes durées (3 jours) à divers contaminants ont révélé des immunomodulations. En revanche, des expositions de moyennes durées (29 - 44 jours) n'ont pas mis en évidence d'effets plus marqués sur les marqueurs d'immunocompétence. Des phénomènes de régulation/compensation physiologique sont probablement mis en jeu.

3. Cette notion renvoie au temps de réponse de l'immunomarqueur à partir du début de l'exposition et présente des similitudes avec la « précocité physiologique » de la question (9) ci-après. En revanche, il peut exister une précocité physiologique d'altération des immunomarqueurs (*i.e.*, effets immunitaires avant effets sur d'autres fonctions physiologique) mais si ces effets surviennent tard, alors la rapidité de réponse sera faible. Inversement, il peut être envisagé un cas de figure avec une rapidité de réponse (*e.g.,* dans les 3 jours qui suivent une exposition) mais pas de précocité physiologique si dès le premier jour apparaissent des altérations à d'autres niveaux physiologiques (*e.g.,* motricité, contraction musculaire, respiration, alimentation, etc).

Objectif 8	Apporter des éléments de réflexion et de connaissance sur l'**immunotoxicité (spécifique)** entre phylums de contaminants environnementaux chez *L. stagnalis*.
Question	Est-il possible de prédire chez *L. stagnalis* une immunotoxicité spécifique d'un contaminant pour lequel de nombreuses preuves d'immunotoxicité existent chez d'autres espèces du phylum des *chordata* (*e.g.,* humains, rongeurs, poissons) ?
Méthode	Etudier des produits pharmaceutiques (*e.g.,* anticancéreux, anti-inflammatoire, anti-rejet de greffes) spécifiquement conçus pour provoquer des effets immunomodulateurs/immunotoxiques/immunosuppresseurs chez l'humain et/ou les rongeurs. Etudier un pesticide pour lequel des effets immunotoxiques ont été observés sur plusieurs vertébrés.
Résultats et conclusions	Hypothèse réfutée en partie. Des produits immunotoxiques ou immunomodulateurs avérés chez les humains ne le sont pas nécessairement chez *L. stagnalis*. Il a été observé dans de nombreux cas que les concentrations doivent être très élevées pour induire des immunotoxicités chez *L. stagnalis*. Le pesticide a induit une immunomodulation mais les effets ne sont pas très marqués, tout comme pour l'exposition au cadmium. Il faudrait dans tous les cas réaliser des expositions chroniques afin de réellement évaluer le danger immunotoxique des contaminants dans un contexte encore plus réaliste au regard de l'environnement (*e.g.*, durée >50% du cycle de vie complet des organismes et donc au moins 6 mois d'exposition).

Objectif 9	Mieux comprendre l'occurrence précoce de perturbations immunitaires d'origine xénobiotique par rapport à celles d'autres fonctions physiologiques ou traits d'histoire de vie. En d'autres termes, vérifier s'il est fréquent de voir apparaitre une altération de traits immunitaires (par des contaminants) avant une altération sur d'autres traits d'histoire de vie.
Question	Existe-t-il une **précocité physiologique** [4]de perturbation des marqueurs d'immunocompétence dans un contexte de contamination chimique ?
Hypothèse	L'altération des marqueurs d'immunocompétence prend place avant que n'apparaissent des effets induits par la contamination chimique sur d'autres traits d'histoire de vie (reproduction, survie, alimentation).
Méthode	Faire des expositions de longue durée à des contaminants environnementaux, évaluer les marqueurs d'immunocompétence par individu dans le temps et mesurer d'autres traits d'histoire de vie. Etudier l'immunotoxicité d'un contaminant environnemental qui a un large spectre toxique et n'est pas spécifiquement toxique pour le système immunitaire (*e.g.,* le cadmium est aussi largement reprotoxique).
Résultats et conclusions	Les expériences sur la deltaméthrine et le cadmium suggèrent fortement que ces contaminants impactent l'immunocompétence des organismes, bien que les effets restent subtils. Aucun effet ne peut être attribué aux contaminants concernant les variation des autres traits d'histoire de vie (alimentation, reproduction, survie). Ainsi, bien que ces deux expériences suggèrent l'existence d'une précocité physiologique d'altération des marqueurs d'immunocompétence par ces contaminants, aucune conclusion ferme ne peut être établie. En effet, les traits d'histoire de vie n'ont pas été affectés de manière significative, même à des concentrations beaucoup plus élevées que la réalité environnementale (cas du Cd) et les immunomarqueurs n'ont pas été fortement impactés. La conclusion est une « non-conclusion ». L'exposition aux effluents de STEP suggère également des effets sur l'immunocompétence des organismes et sur leur prise de masse. Cependant, aucune différence entre les groupes pour les traits immunitaires et la prise de poids n'est statistiquement significatve, mais les deux sont à l'extrême limite des seuils de significativité statistique (voir article 8). Je suis intimement persuadé que ces traits de vie et marqueurs d'immunocompétence ont été affectés par l'exposition aux effluents de STEP. Dans une démarche de précaution, il me semble plus dangereux d'établir une conclusion erronée sur l'absence d'effet (faux négatifs) qu'une conclusion erronée sur la présence d'effets (faux positifs). Cela m'amène à proposer que lorsque la fourchette de significativité de la valeur de t est de |1.6—1.99|, l'absence d'effets ne peut peut pas être statistiquement justifiée et la présence d'effet doit alors être considérée. Lorsque t>|2|, alors la présence d'effets est statistiquement justifiée. Enfin, pour poursuivre l'objectif visé, il semble pertinent pour des expériences futures de réaliser une expérience sur le très long-terme avec des concentrations environnementales et d'autres beaucoup plus fortes avec l'apparition effective d'effets très marqués et avec des niveaux de significativités statistiques élevés.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Sommaire

8.1 *Lymnaea stagnalis* comme modèle écotoxicologique 340

8.1.1 Approvisionnement 340

8.1.2 Biométrie et calibration 341

8.1.3 Bioaccumulation, sensibilité générale et connaissances transversales 346

8.2 Caractérisation hémocytaire 348

8.3 Collectes répétées d'hémolymphe 351

8.4 Variabilités naturelles des hémocytes 357

8.4.1 Variabilités inter-individuelles et intra-individuelles 357

8.4.2 Variabilités inter-populations ou inter-expériences 359

8.4.3 Propositions de valeurs de référence 372

8.5 Facteurs confondants 375

8.5.1 Dans les études de ce manuscrit 375

8.5.2 Perspectives sur la compréhension des facteurs confondants . . . 377

8.6 *Challenges*/inductions immunitaires et évaluation de l'immunocompétence des organismes 382

8.6.1 Expositions réalisées 382

8.6.2 Perspectives 383

8.7 Effets de xénobiotiques sur les marqueurs d'immunocompétence étudiés 384

8.7.1 Sensibilité (effet des concentrations) 386

8.7.2 Rapidité de réponse 389

8.7.3 Précocité physiologique 392

8.7.4 Spécificité immunotoxique trans-phylum 398

8.8 Perspectives sur d'autres immunomarqueurs et méthodes . . . 400

8.1 *Lymnaea stagnalis* comme modèle écotoxicologique

8.1.1 Approvisionnement

Des informations exhaustives sur les densités de populations de *L. stagnalis* ne sont pas disponibles à ce jour. Les répartitions qualitatives se basent sur des observations, parfois uniques, de *L. stagnalis* au cours des 50 dernières années. Afin de faciliter son utilisation en écotoxicologie, une base de données sur les distributions géographiques de cette espèce avec leurs densités annuelles serait un outil réellement utile. Par ailleurs, l'application d'une batterie de tests d'immunocompétence serait pertinente à mettre en place dans un contexte de suivi annuel de populations autochtones sur plusieurs années (voir discussion sur ce point dans la partie « Variabilités » ci-après) dans le cadre d'une gestion environnementale (surveillance ou évaluation de l'état et du risque).

Par expérience, la collecte de cette espèce en milieu naturel revêt diverses contraintes pour un nombre important d'organismes calibrés (>100), selon :

- les habitats respectifs (mares, étangs, lacs, rivières) : en eau stagnante l'eau est généralement turbide ce qui gêne la visibilité. Cette espèce n'étant pas exclusivement benthique, il n'est pas possible de pratiquer une pêche « à l'aveugle » dans les sédiments avec une épuisette.
- la végétation : *L. stagnalis* vit préférentiellement dans les milieux fortement végétalisés. Cependant, mon expérience montre que leur densité est très faible sur de nombreux lieux classés comme « présence certaine ou très probable ». Il faut secouer les végétaux et chercher minutieusement les limnées qui se cachent. Pour une collecte répétée et d'un nombre suffisant d'organismes en vue d'une expérimentation en écotoxicologie, le respect de la végétation est une condition *sine qua non*. Ainsi, un manque d'informations sur les densités de populations peut rendre les collectes particulièrement chronophages si une centaine d'organismes calibrés est souhaitée.
- La profondeur : lorsque la profondeur excède 1 m, la pêche à l'épuisette se révèle

peu pratique car il s'agit d'observer les organismes dans la colonne d'eau ou parfois entre les pierres du fond. Plus la profondeur est importante, moins la visibilité est bonne pour une pêche à l'épuisette avec la tête hors de l'eau. De plus, si le temps est venteux et/ou pluvieux, les ondulations à la surface de l'eau rendent l'observation délicate. Dans ces cas de figures, ce qui s'est révélé le plus pratique est de plonger en palmes-masque-tuba. La visibilité en est facilitée (sous réserve d'une eau peu turbide) et la collecte se fait plus aisément. Il s'agit alors de progresser le long du cours d'eau et de « cueillir » les organismes au fur et à mesure. Lorsque la profondeur est faible, la plongée ne s'avère pas nécessaire et la collecte est donc beaucoup plus facile (une simple épuisette suffit).

8.1.2 Biométrie et calibration

La revue de Vinarski [2015] discute des grandes variabilités phénotypiques chez *L. stagnalis*. La possibilité d'introduire une notion de sous-espèce est évoquée. Une des difficultés liée à la calibration des organismes chez *L. stagnalis* est la grande variabilité de la forme de leur coquille. La « grande limnée » présente en effet toutes les caractéristiques pour maximiser cette variabilité :

- hauteur ouverture/ hauteur coquille $> 50\%$
- coquille fragile, friable et avec de légères variations géométriques (fusiformes vs aplaties vs uniformes vs ondulées (observations personnelles)
- parmi les plus grands gastéropodes de milieux aquatiques continentaux (différences interindividuelles exacerbées)

Ce qui semble le plus pertinent serait de calibrer les organismes selon le poids de leurs tissus biologiques non inertes et donc la coquille serait à exclure. Évidemment, cela ne peut pas se faire en début d'expérimentation. Ainsi, seule la vérification d'homogénéité des **poids secs** (*i.e.* tissus retirés de la coquille et lyophilisés) à la fin d'une expérimentation peut se faire. Par ailleurs, la calibration des organismes par **âge** est réalisable s'ils proviennent d'élevages contrôlés.

Une étude de comparaison de croissance et prise de poids chez *L. stagnalis* selon une nourriture à la laitue *ad libitum* [groupe 1] ou une **nourriture avec des flocons** d'homogénats de poissons *ad libitum* [groupe 2] a montré des différences significatives

[Berteloot, 2015]. Il a été montré que les organismes du groupe 2 ont une croissance et prise de poids beaucoup plus importantes et accélérées par rapport à celles du groupe 1. Sur une observation de 28 jours, une largeur de coquille 60 % plus élevée a été observée pour le groupe 2 par rapport au 1. Face à une contamination métallique (Fe, Pb, Cu), les EC_{10} sur la prise de poids étaient, en moyenne, 10 fois plus basses pour le groupe 1 que pour le groupe 2. La toxicité est donc plus forte lorsque les organismes sont nourris à la laitue. La qualité de la nourriture exerce un effet important sur la vitesse de croissance et de prise de poids chez *L. stagnalis*. Par ailleurs, la variabilité inter-individuelle observée était plus importante pour le groupe 2. Il semble logique qu'une nourriture qui accélère la vitesse de croissance exacerbe les différences inter-individuelles. La laitue permettrait donc de minimiser la variabilité inter-individuelle de croissance et du poids au sein d'une même cohorte et ainsi de faciliter l'homogénéisation de la calibration des organismes selon les critères taille-masse-âge au sein d'une même cohorte.

Par contre, le temps de développement des organismes pour une taille souhaitée sera plus long. Avec l'utilisation de flocons d'homogénats de poissons comme unique source de nourriture, la calibration avec des critères stricts de taille-masse-âge est très compliquée eut égard au nombre important d'organismes potentiellement hors-critères. Il serait nécessaire d'avoir une grande capacité de production et donc une structure d'élevage relativement importante. L'utilisation de laitue comme unique source de nourriture peut être problématique pour les premiers stades juvéniles. En effet ils peuvent ne pas avoir de radula suffisamment développée pour se nourrir de laitue. Ainsi, l'utilisation de diverses sources d'alimentation, comme par exemple des flocons ou paillettes (finement broyées) d'homogénats de tissus de poissons/crustacés utilisés couramment en aquariophilie permettrait de pallier ce problème pendant les stades juvéniles d'élevage en laboratoire de *L. stagnalis*.

Par ailleurs, l'étude mentionnée ci-avant fait état d'une diminution significative de la survie pour le groupe 1 par rapport au groupe 2 dans un contexte de contamination métallique (Fe, Cu et Pb). Il semble évident que la qualité de la nourriture a un rôle dans la santé des organismes, leur robustesse et par conséquent leur sensibilité face à une contamination. Les paramètres qualitatifs de la nourriture sont donc à prendre en compte lorsqu'il s'agit de comparer différentes populations, non seulement pendant l'expérimentation mais aussi avant l'expérimentation. Les organismes collectés sur le terrain ont une nourriture variée,

et une sélection naturelle (*i.e.* prédation, acclimatation) des organismes les plus robustes est attendue. Des modèles DEB (*Dynamic Energy Budget*) ont montré que l'utilisation de laitue comme source de nourriture chez *L. stagnalis* aggrave la toxicité de trois hypothétiques [5] xénobiotiques par rapport à une alimentation à base de flocons d'homogénat de poisson [Zimmer *et al.* , 2012]. Dans une démarche de précaution et de sélection de conditions expérimentales qui maximiseraient la toxicité d'un produit chimique, il semble donc pertinent d'utiliser de la laitue comme source de nourriture pour les expérimentations. En revanche, les observations faites ci-avant suggèrent d'utiliser une source de nourriture variée et adaptée (*e.g.,* paillettes finement broyées) pour les stades juvéniles précoces, dont l'appareil buccal n'est pas encore bien développé (*e.g.,* radula).

Une comparaison de la **densité hémocytaire** selon la calibration des organismes avec des longueurs croissantes de coquille et des poids frais variables a été réalisée (figure 2.11 p. 105). Les résultats de ces mesures montrent qu'à ces poids et tailles, il n'y a pas de relation apparente entre la densité hémocytaire et la longueur de coquille ou le poids frais des organismes.

En revanche, Dikkeboom *et al.* [1984] avaient observé une augmentation significative de la densité hémocytaire avec l'âge des organismes (*i.e.*, juvéniles *vs* adultes). Il semble donc que l'âge soit le principal facteur qui influence la densité hémocytaire chez *L. stagnalis*. Dans la mesure où l'âge des organismes est inconnu lorsque les organismes sont collectés en milieu naturel, la calibration qui semble la plus adaptée dans ces cas correspond aux critères de poids frais et de longueur de coquille. Certes, ce type de calibration est susceptible de produire une grande disparité d'âge mais il est difficile de procéder différemment. Par ailleurs, il semble pertinent de s'affranchir directement de cette information afin d'acquérir d'emblée plus de connaissances en prenant en compte cette contrainte et d'utiliser/rechercher des outils adaptés (notamment statistiques) qui permettent une prise en compte de cette grande variabilité hémocytaire en vue d'une application en milieu naturel. Enfin, j'ai observé que plus les organismes avaient une longueur de coquille et un poids élevés, plus elles expulsaient un volume important d'hémolymphe. Des organismes d'une souche de laboratoire nourris à la laitue *ad libitum* sur plusieurs générations expulsaient significativement moins d'hémolymphe qu'une autre population de laboratoire (nourris avec des flocons d'homogénats de poisson ou avec de la laitue *ad libitum*) ou que

5. « hypothétiques » car ce sont des modélisations

des populations collectées en milieu naturel. Néanmoins, cela n'est qu'une observation et ce peut être le résultat d'une mauvaise acclimatation de cette population d'élevage venant d'un autre laboratoire. Cette population donnait très peu d'hémolymphe et a présenté une très mauvaise acclimatation à l'eau du laboratoire. La survie chutait anormalement vite (voir annexe G.2). Le bon fonctionnement du mécanisme de **réflexe de rétraction** dans la coquille associée à une bonne expulsion d'hémolymphe est très probablement un premier indicateur qualitatif de l'**état de santé** global des organismes.

Pour résumer les diverses remarques faites ci-dessus et dans la partie biométrie du chapitre 2 :

- L'**âge** n'est pas mesurable pour des organismes collectés en milieu naturel (pas de technique d'identification disponible à ce jour, à ma connaissance)
- L'âge peut être déterminé pour des organismes élevés en laboratoire mais la **variabilité de leur poids et taille** associés sera grandement dépendante de la qualité de la nourriture (sous réserve que la quantité soit considérée *ad libitum*)
- Les deux critères biométriques principaux pour une calibration des organismes en début d'expérimentation sont la **longueur de coquille et le poids frais** mais la variabilité qui leur est associée est importante et les causes sont multifactorielles (*i.e.*, qualité de la nourriture, facteurs génétiques des populations, sélection naturelle le cas échéant, température du milieu, etc).
- La longueur de coquille et le poids frais n'ont pas montré un effet important sur la **densité hémocytaire** des organismes. Ainsi, les variabilités de calibrations [6] entre les diverses expérimentations présentées dans ce manuscrit n'ont pas d'effet marqué sur cet *endpoint*. Cela suggère qu'une difficulté liée à une calibration stringente (*e.g.,* taille ±1 mm et poids ±100 mg) des organismes n'est pas un facteur limitant pour les études immunotoxiques de ce manuscrit dès lors que l'hétérogénéité de calibration entre les groupes comparés est similaire.
- Plus les organismes ont une masse et une longueur de coquille élevées, plus la **quantité d'hémolymphe** prélevée est grande. Ce paramètre est à prendre en compte selon (i) la méthode de mesure des immunomarqueurs envisagée (*e.g.,* au moins 200 μl sont nécessaires pour le cytomètre en flux sans dilution de l'échantillon par lecture dans les tubes pour que le capillaire puisse atteindre la surface et échantillonner) et (ii) le *design* expérimental envisagé (*i.e.*, si plusieurs marqueurs d'immunocompétence doivent être mesurés par organisme, il faut beaucoup d'hémolymphe ; une **étude individuelle** sur des juvéniles ne pourra évaluer qu'un nombre réduit de biomarqueurs immunitaires à la fois, sinon il faut **mélanger les hémolymphes** de juvéniles mais l'information individuelle est alors perdue.

6. très homogènes *vs* peu homogènes

8.1.3 Bioaccumulation, sensibilité générale et connaissances transversales

Bioaccumulation : *L. stagnalis* rend possible l'analyse d'accumulation tissulaire de nombreux polluants à l'échelle individuelle car le poids des tissus mous à l'âge adulte est suffisamment élevé. Cela (i) facilite les mesures chimiques et (ii) permet de prendre en compte les variabilités inter-individuelles. Ces aspects représentent de grands avantages pour l'utilisation de cette espèce en écotoxicologie. *L. stagnalis* pourrait être envisagée comme un échantillonneur vivant (actif) de la contamination environnementale et donc comme espèce sentinelle de certains milieux pour connaitre le niveau de contamination (*e.g.,* dans les milieux saprobes). Des similitudes peuvent être soulignées avec, par exemple, le caractère d'espèce sentinelle de gastéropodes terrestres (*e.g., Helix aspersa*) pour rendre compte de la contamination environnementale [De Vaufleury & Pihan, 2000; de Vaufleury, 2015]. *L. stagnalis* est une espèce hypobenthique et donc elle vit au niveau sédimentaire (dedans ou dessus) mais aussi dans la colonne d'eau (zone pélagique, mais rarement) et à la surface de l'eau. Par ailleurs elle est omnivore et va donc adapter son régime alimentaire en fonction de son microhabitat ce qui renforce le caractère d'espèce sentinelle de *L. stagnalis* pour une zone considérée. Le fait qu'elle puisse vivre en milieu urbain (*e.g.,* mares de jardins botaniques) en fait une espèce privilégiée. Cette facilité pour la mesure de la bioaccumulation est également très utile pour mettre en perspective de possibles liens entre le niveau de contamination chimique des tissus biologiques et des effets biologiques via l'analyse de biomarqueurs ou autres paramètres biologiques (*e.g.,* reproduction, système nerveux, système immunitaire, alimentation).

Sensibilité générale aux toxiques : *Lymnaea stagnalis* a une sensibilité aux contaminants environnementaux qui est très ciblée et encore mal comprise aujourd'hui. Il reste délicat à ce jour de catégoriser les sensibilités de *L. stagnalis* à la toxicité d'un groupe de contaminants particulier (métaux *vs* pesticides *vs* HAP, etc). *L. stagnalis* est très sensible à certains métaux comme le Pb (NOEC et LOEC plus basses que beaucoup d'autres espèces et phylums) [Grosell *et al.* , 2006; Brix *et al.* , 2012] et le cuivre [Brix *et al.* , 2011]. En revanche, d'autres métaux tels que le zinc [De Schamphelaere & Janssen, 2010] et le cadmium [Boisseaux *et al.* , 2017b; Ducrot *et al.* , 2014; Charles *et al.* , 2016; Coeurdassier *et al.* , 2003] sont relativement peu toxiques pour *L. stagnalis* comparés à plusieurs

autres espèces. De manière similaire, une faible sensibilité à de nombreux pesticides a été rapportée comme par exemple l'insecticide DTM [Boisseaux *et al.* , 2017e; Présing, 1993], le fongicide prochloraz [Charles *et al.* , 2016], les herbicides atrazine [Russo & Lagadic, 2004] et le fomesafen [Russo & Madec, 2007; Russo *et al.* , 2008]. Au contraire, *L. stagnalis* présente une forte sensibilité aux pesticides DDT (insecticide) [Woin & Brönmark, 1992] et vinclozolin (herbicide) [Ducrot *et al.* , 2010a]. Les expériences de cette thèse montrent une très faible sensibilité de réponse aiguë face à l'exposition à des produits pharmaceutiques (diclofénac, cyclophosphamide ou cyclosporine A). Pour plusieurs narcotiques polaires, *L. stagnalis* est moins sensible que *D. magna* et *P. reticulata* ; une bonne corrélation existe avec l'hydrophobicité de ces composés : plus ils sont hydrophobes, plus leur CL50 est basse.

Il a été rapporté que *L. stagnalis* possède une forte plasticité écologique [Vinarski, 2015] et physiologique [Leicht *et al.* , 2013]. La population de laboratoire Renilys s'est bien acclimatée à de nombreuses eaux de laboratoire [Charles *et al.* , 2016; Ducrot *et al.* , 2014]. En revanche, les divers essais d'acclimatation de cette population à l'eau du laboratoire d'Irstea n'ont pas été bons (voir annexe G.2) et n'ont pas permis de mener une étude écotoxicologique. En revanche, les deux populations de terrain se sont acclimatées de manière suffisante au laboratoire d'Irstea dans la mesure où leur survie était de 80% après 40 jours d'expérimentation. Au regard de ces données, il semble encore difficile de dégager une tendance générale sur le potentiel d'acclimatation de populations d'élevage ou de populations de terrain car cela semble être différent au cas par cas.

Connaissances transdisciplinaires : L'utilisation de *L. stagnalis* en écotoxicologie bénéficie des contributions scientifiques de nombreux autres domaines : neurobiologie, parasitologie, embryologie, génétique. Des bioessais sur l'inhibition de l'activité acétylcholinesterase pourraient être développés (les connaissances en neurobiologie prennent alors une place centrale pour optimiser les analyses). Des approches métabolomiques sur le système nerveux central (SNC) de *L. stagnalis* viennent récemment d'être menées pour caractériser la toxicité de pesticides extraits d'échantillons d'eau de surface [Tufi *et al.* , 2016]. Par ailleurs, *L. stagnalis* est étudiée en écotoxicologie depuis plusieurs décennies ce qui fait que plusieurs éléments de comparaisons sont disponibles et les données peuvent être compilées pour aider à la meilleure compréhension des impacts écotoxiques des polluants aquatiques, notamment pour l'étude de contaminants émergents. Enfin, l'établissement

d'une base de donnée pour mettre à disposition un génome de référence de qualité est en cours de développement (projet STAGING, voir la section 8.8).

8.2 Caractérisation hémocytaire

Chez *L. stagnalis*, il existe un type (une population) hémocytaire et trois sous-populations. Un très faible gradient de taille-structure existe. Celui-ci pourrait correspondre à un continuum de maturation cellulaire, ce qui est cohérent avec les explications de Sminia *et al.* [1983]; Van der Knaap *et al.* [1993] et d'autres explications des cycles hémocytaires chez d'autres mollusques aquatiques avec l'existence de « continuum de différentiation » [Travers *et al.* , 2008a]. Au regard des images de microscopie obtenues, il ne semble pas justifié de qualifier les hémocytes de granulocytes. Les différences structurelles entre hémocytes sont faibles et la microscopie photonique avec une double coloration May Grünwald-Giemsa ne permet pas de les différencier aisément. Des caractérisations complémentaires permettraient d'élargir les connaissances structurelles comme par exemple l'utilisation d'une coloration au Noir de Soudan afin de voir les contenus en lipides des hémocytes pour de possibles applications futures en écotoxicologie si les résultats sont encourageants. L'utilisation de fluorochromes (*e.g.,* liés à des anti-corps monoclonaux) qui marquent les différents récepteurs membranaires spécifiques des hémocytes selon leur degré de maturation serait aussi à considérer pour caractériser et quantifier correctement les sous-populations hémocytaires de *L. stagnalis* en cytométrie de flux.

L'observation des hémocytes en cytométrie de flux selon les critères taille-structure (*i.e.*, cytogrammes, FSC—SSC) permet de distinguer trois groupes ou *clusters* cellulaires. Ces groupes indiquent donc l'existence de trois sous-populations hémocytaires. En revanche, comme mentionné dans le paragraphe précédent et dans le Chapitre 3, la quantification des proportions relatives des trois sous-populations hémocytaires par cytométrie en flux avec la méthode indiquée (*i.e.*, taille—structure) ne me semble pas justifiée (faible robustesse de la discrimination des sous-populations, les morphotypes des sous-populations hémocytaires sont trop peu différents pour les quantifier correctement sans ajout de fluorochromes supplémentaires). Éventuellement, la distinction des hémocytes en deux catégories serait plus robuste : cellules immatures (= petits hémocytes ronds) et cellules matures (= hémocytes intermédiaires + hémocytes larges). En effet, les deux

gates correspondantes seraient plus éloignées l'une de l'autre et ne se chevaucheraient pas. Ces remarques concernent la *possibilité méthodologique* de quantification. Par ailleurs, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux connaitre la *nécessité biologique* (*e.g.,* fonctions immunocompétentes différentes) ou écotoxicologique de discriminer les typologies cellulaires chez *L. stagnalis*. Un approfondissement sur le tri des hémocytes et l'analyse différentielle de leur fonctions respectives serait un pan de recherche à explorer afin de mieux connaitre le rôle des types hémocytaires chez *L. stagnalis*.

Il est méthodologiquement (plus) facile de discriminer les types/sous-types hémocytaires lorsque ceux-ci sont clairement séparés sur les cytogrammes (*i.e.*, taille—structure) et l'intérêt de les discriminer existe lorsque leurs fonctions respectives sont clairement identifiées. Ces aspects sont démontrés chez plusieurs mollusques et la littérature possède de nombreux exemples sur des bivalves. Par exemple, il a clairement été identifié que les granulocytes de l'huître *Crassostrea Virginica* sont des phagocytes alors que les agranulocytes ne le sont pas [Wikfors & Alix, 2014]. De manière similaire, Evariste *et al.* [2016] ont montré la nécessité de prendre en compte les sous-populations hémocytaires — car les fonctions diffèrent et leurs quantifications respectives sont bien différenciées et donc robustes — dans l'analyse de l'immunocompétence de la moule zébrée (*Dreissena sp.*). En effet, la distinction en granulocytes, hyalinocytes et *blast-like cells* est claire chez la moule zébrée, ce qui n'est pas le cas chez *L. stagnalis*. La distinction et l'analyse des remodelages des proportions de typologie hémocytaire permet de mieux caractériser l'immunotoxicité de certains polluants, comme cela a par exemple été réalisé avec les pesticides cyperméthrine et fenvalerate chez le gastéopode *Bellamya bengalensis* et le bivalve *Lamellidens marginalis* [Ray *et al.* , 2013].

Le morphotypage des cellules immunitaires est un élément clé du diagnostic de maladies immunitaires chez de nombreuses espèces. Par exemple, chez les humains cette étape permet de poser le diagnostic de leucémies myéloïdes et lymphoïdes qui sont suspectées dans le cas d'une densité leucocytaire anormalement élevée ou faible (leucémie aiguës ou chroniques) : morphotypages multidimentionnels[7] avec l'utilisation de plusieurs fluorochromes liés à des anticorps monoclonaux qui vont se fixer aux récepteurs membranaires de différenciation (*e.g.,* CD2, CD13, CD33, CD45, etc), observation des formes cellulaires et maturations (détermination des % respectifs), observation des cellules souches hémato-

7. La taille et la structure (FSC—SSC) sont incluses mais ne sont pas suffisantes pour discriminer en détail les cellules avec différentes maturations et fonctions immunitaires associées.

poïétiques de la moelle osseuse.

Les images de microscopie électronique ont permis de mieux décrire les surfaces, formes et ultrastructures des hémocytes. Comme mentionné dans le Chapitre 3, deux structures inconnues particulièrement abondantes ont été décrites. Cela ouvre de belles perspectives de recherche afin d'explorer leur nature et leur possible fonction dans l'immunocompétence des organismes. Des essais d'électrophorèse en conditions dénaturantes pourraient être conduites afin d'isoler les deux structures abondantes si elles sont de nature protéique et suffisamment exprimées. Si tel est le cas, des séquençages ultérieurs pourraient être réalisés. La première structure, remarquablement fibrillaire, avait été observée par Sminia [1972] sans soulever de questionnement particulier et avait été nommée *lysosomial-like structure*. A notre connaissance, ces structures en « pelotes de laine » ne ressemblent à aucune structure lysosomiale d'hémocytes d'autres espèces. En revanche, la deuxième structure n'avait pas été décrite — à notre connaissance — chez *L. stagnalis*. La comparaison avec d'autres mollusques ne nous donne pas de pistes sur ce que ce pourrait être. L'aspect dense pourrait correspondre à une structure protéique. Il serait intéressant —-sinon nécessaire — de déchiffrer le rôle cellulaire et physiologique de ces deux structures chez *L. stagnalis* car leur abondance est peut-être le signe d'une fonction centrale dans l'immunocompétence des organismes. Il est envisageable que cela traduise un état ou statut immunitaire particulier. Il peut être fait l'hypothèse que les structures fibrillaires sont des phagosomes (*e.g.,* auto/hétérophagosomes). L'une ou l'autre des deux structures, ou les deux pourraient être des phagosomes secondaires ou tardifs après fusion avec des lysosomes (*i.e.*, phagolysosomes). Les structures fibrillaires seraient alors des assemblages complexes d'enzymes insolubles. Des phagolysosomes de macrophages humains peuvent présenter certaines similarités mais les structures sont plutôt cristallines et non pas fibrillaires et enchevêtrées de manière isotrope (non-unidirectionnelle) comme dans notre cas. Les structures denses et massives pourraient aussi être des phagosomes différents. Des fusions de phagosomes avec les peroxisomes (*i.e.*, pexophagie) pourraient être envisagées car ces organites sont fortement impliquées dans le métabolisme énergétique des cellules, ainsi que dans le métabolisme oxydatif (*e.g.,* production de H_2O_2) et le système anti-oxydant (*e.g.,* catalase). Ces propriétés sont particulièrement sollicitées dans le cadre de la fonction immunitaire des hémocytes. Concernant la structure non-fibrillaire inconnue,

son emplacement dans la partie périnucléaire et l'apparente communication active avec le noyau est intrigante (voir la partie *supplementary material* de l'article 2). Cela pourrait faire penser aux structures ALIS (*aggresome-like induced structures*) [Szeto *et al.* , 2006] ou DALIS (*dendritic cell aggresome-like induced structures*) qui sont des structures cytosoliques d'agglomération de protéines principalement antigéniques, permettant de prioriser la dégradation protéique des agents infectieux. Ces stuctures se forment en réponse à un stimulus de maturation cellulaire, par exemple chez les cellules dendritiques de souris [Lelouard *et al.* , 2004; Canadien *et al.* , 2005]. En revanche, beaucoup de différences existent et la structure observée chez *L. stagnalis* est une macrostructure (plus volumineuse que les DALIS) parfois cytosolique et parfois se retrouvant dans l'espace périnucléaire (*i.e.*, côté interne de la première ou double membrane nucléaire).

8.3 Collectes répétées d'hémolymphe

L'étude sur le prélèvement répété d'hémolymphe indique qu'une durée de 24h est suffisante pour permettre de renouveler le stock hémocytaire circulant des limnées. Cependant, nous ne savons pas dans quelle mesure la méthode de collecte employée aboutit ou non à la collecte de la totalité de l'hémolymphe. Si nous considérons que cette méthode de collecte par stimulus mécanique du réflexe de rétraction permet de prélever la majorité de l'hémolymphe circulante et que le volume est constant lors de collectes répétées, alors un laps de temps de 24h et plus permet aux limnées de régénérer *a minima* l'ensemble de ses hémocytes circulants comparé aux valeurs initiales (*i.e.*, densités hémocytaires lors de la première collecte, t=0). Au fur et à mesure des collectes, une légère augmentation (statistiquement significative) des densités hémocytaires a été détectée mais celle-ci est indépendante des fréquences de prélèvement allant de 1/24h jusqu'à 1/96h. En d'autres termes, une augmentation de la densité hémocytaire au cours du temps sera similaire entre la première et la cinquième collecte d'une cohorte pour laquelle l'hémolymphe est prélevée toutes les 24h et pour une autre prélevée toutes les 48h, 72h ou 96h. Cela indique l'existence d'un effet « collecte répétée d'hémolymphe » qui est indépendant des temps d'intervalles entre collectes allant de 24h à 96h. Ainsi, à ces intervalles de temps, les collectes répétées « stimulent » de manière comparable l'augmentation de la densité hémocytaire circulante. Si l'augmentation des densités hémocytaires lors des collectes répétées est attribuée à l'effet « collectes répétées » plutôt qu'à l'effet « temps » ou « augmentation de l'âge » des

individus, alors le fait de prélever l'hémolymphe stimule les mécanismes mis en jeu dans les renouvellements des stocks hémocytaires circulants (migration des hémocytes fixes + mitose des hémocytes + bourgeonnement cellulaire). Par ailleurs, il a été observé qu'une collecte répétée de l'hémolymphe à 24h d'intervalles augmente légèrement mais significativement la viabilité hémocytaire comparée à des intervalles de collectes plus espacés dans le temps de 48h, 72h et 96h. Contrairement à la densité hémocytaire, il n'y a pas d'effet « collecte répétée » sur la viabilité des hémocytes mais seulement un effet « fréquence de prélèvement » pour la fréquence 1/24h seulement. Une explication serait qu'au cours des intervalles de 24h la sénescence hémocytaire est plus faible qu'à des intervalles plus élevés. Par conséquent, la viabilité hémocytaire est plus élevée. En définitive, cette étude suggère de laisser un temps d'intervalle d'au moins 48h entre deux collectes d'hémolymphe pour une application en écotoxicologie (voir ci-dessous). L'étude démontre la non-existence d'effet statistiquement significatif « fréquence de prélèvement » sur l'immunocapacité (densité + viabilité des hémocytes circulants) entre des fréquences de collectes de 1/48h, 1/72h et 1/96h. Néanmoins, cela doit être relativisé car l'étude complémentaire sur l'effet de collectes répétées à 48h d'intervalle sur un paramètre hémocytaire fonctionnel (*i.e.*, activité oxydative) a révélé une diminution significative de cette activité lors de la troisième collecte.

Ainsi, pour une application en écotoxicologie, l'intervalle de temps entre la première collecte et la deuxième collecte doit être d'*au moins* 48h et les intervalles de temps suivants doivent être raisonnablement augmentés. Cela se base sur un compromis entre les quatre arguments suivants :

1. Des intervalles de temps entre collectes d'hémolymphe allant de 24h à 96h permettent de renouveler le stock hémocytaire circulant *a minima*.
2. En écotoxicologie, il est pertinent d'évaluer des effets (immuno)toxiques par individu à différents temps d'expositions avec notamment une évaluation à court terme et moyen terme après le début de l'exposition à un contaminant. Ainsi, il est pertinent de faire une évaluation de l'immunocompétence des individus dans une fenêtre de temps allant de 24h à 96h après le début de l'exposition (et donc de la mesure du niveau basal à t=0). Par ailleurs, il a été observé que les collectes répétées d'hémolymphe ont un effet sur la densité hémocytaire des individus mais cela est indépendant de la fréquence de prélèvement allant de 1/48h à 1/96h et donc de l'in-

tervalle de temps entre deux collectes successives correspondantes [Boisseaux *et al.* , 2016a]. Cet effet « collecte répétée » est assez faible si l'on considère seulement deux collectes. La nécessité d'évaluer des effets immunotoxiques aigus est prioritaire sur la possibilité d'espacer de plus de 96h les deux premières collectes pour possiblement limiter l'effet du prélèvement répété.

3. La viabilité hémocytaire est affectée (augmentée) lorsque l'intervalle entre collectes répétées est de 24h, mais pas de 48h, 72h ou 96h.
4. Une diminution progressive de l'activité hémocytaire oxydative a été observée lors de la deuxième puis troisième collecte de l'hémolymphe, mais la différence était statistiquement significative pour la troisième collecte seulement comparée aux valeurs de la première collecte.

Pour aller plus loin dans la compréhension des limites de renouvellement hémocytaires chez *L. stagnalis*, il serait hautement intéressant de répéter l'expérience avec des intervalles de temps plus courts ou des fréquences plus élevées : 1/10 min, 1/30 min, 1/1h, 1/2h, 1/4h, 1/8h, 1/16h et 1/24h. En déterminant un intervalle de temps critique de référence, un test pourrait être développé après exposition de limnées à des contaminants afin de déterminer (i) leur réflexe de rétraction (test de la réponse des mécanorécepteurs dermiques et motoreunones associés face à un stimulus mécanique, indépendant de considérations immunologiques) et (ii) les paramètres immunitaires des échantillons d'hémolymphes associés. Ceci pourrait être un indicateur d'immunocompétence dans la mesure où nous testerions la capacité des limnées à renouveler leur ligne de défense hémocytaire face à un scénario de menace pathogène et/ou de prédation qui nécessite une mobilisation importante et répétée de leurs ressources immunitaires et/ou l'expulsion d'hémolymphe (contexte multistress chimique, pathogénique et de prédation). En effet, le réflexe de rétraction dans la coquille est une réponse à la prédation, par exemple le bec d'un oiseau. Dans ce sens, j'avais clairement remarqué que lors de l'expérimentation avec l'Etoposide, les organismes de milieux contaminés étaient « moins réactifs » que les témoins et répondaient moins bien aux stimuli de réflexe de rétraction. C'est d'ailleurs la seule expérimentation où un fort effet immunotoxique, c'est-à-dire immunosupresseur a été observé.

Il reste à clarifier les phénomènes sous-jacents à l'hémocytopoïèse. Comme mentionné dans le chapitre 1, chez des organismes cladistiquement proches de *L. stagnalis*, par exemple *Biomphalaria glabrata* ou *Lymnaea trunculata*, des AOPs (*amibocyte-producing organ*) ont été identifiés [Sullivan *et al.* , 2014; Jeong *et al.* , 1983; Joky *et al.* , 1985; Rondelaud & Barthe, 1981, 1982]. Chez *L. stagnalis*, cela reste flou mais nous avons quand même une idée du processus hémocytopoïétique. L'explication de Sminia *et al.* [1983] est que les hémocytes ont une activité mitotique inversement proportionnelle à leur degré de maturation et des hémocytes bourgeonnent de manière diffuse dans l'organisme dans les tissus conjonctifs. Par quel phénomène une cellule prend naissance dans ce tissu et quels phénomènes régulent la stimulation/répression de l'hémocytopoïèse chez *L. stagnalis* ? Chez les mammifères, l'hématopoïèse se passe dans les moelles osseuses (à l'âge adulte) à partir de cellules souches hématopoïétiques ou hémocytoblastes et un relai avec les organes lymphoïdes peut prendre place. Le concept de « niche hématopoïétique » permet d'expliquer l'ontogénèse des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les régulations des proliférations, quiescences, sénescences et différenciations des CSH chez ces organismes sont largement mieux comprises et maitrisées que chez les invertébrés. Ces structures sont essentielles et constituent des cibles particulières dans les mécanismes physiopathologiques en réponse à des xénobiotiques (*e.g.,* médicaments) étudiés en immunotoxicologie humaine [Malfuson, 2014]. Plusieurs similitudes — avec *L. stagnalis* — sur les représentations schématiques de renouvellement des stocks d'immunocytes peuvent être observées (microenvironnement, dynamique cellulaire, migration, prolifération, différentiations, maturations, etc). Les régulations des CSH sont d'origine chimiques (cytokines, oxygène, calcium, nutriments, etc). De fait, beaucoup reste à explorer et découvrir sur les mécanismes impliqués dans l'ontogénèse des hémocytes chez *L. stagnalis*, les renouvellements et le maintien des stocks hémocytaires. *In fine*, bien que cela semble ambitieux, des marqueurs de l'état de structures tissulaires hémocytopoïétiques similaires pourraient être inclus dans l'analyse immunotoxique des xénobiotiques environnementaux chez les mollusques (histologie des tissus conjonctifs, marqueurs spécifiques à l'ontogénèse hémocytaire, cytokines de stimulation hémocytopoïétique, protéines de signalisation moléculaire, quantification de l'activité mitotique, etc).

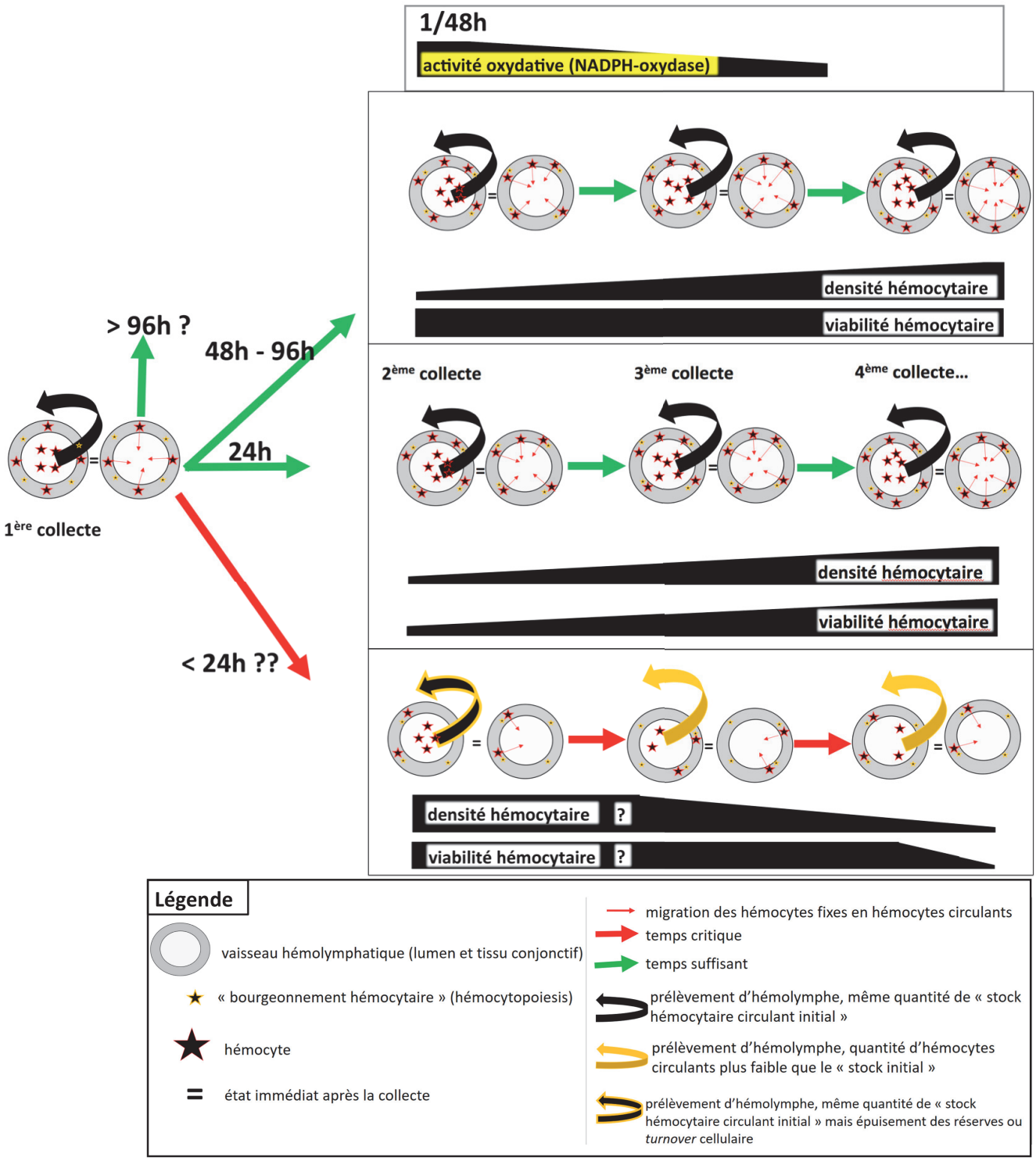


FIGURE 8.2 – Représentation schématique du renouvellement/épuisement hémocytaire chez *L. stagnalis* selon le laps de temps entre les expulsions répétées d'hémolymphe

Un schéma-bilan (figure 8.2, p. 355) résume les travaux et hypothèses concernant les prélèvements répétés d'hémolymphe sur les hémocytes. Ce schéma peut être lu comme suit. Le maintien du stock hémocytaire circulant initial est le résultat (i) de bourgeonnements hémocytaires diffus dans les tissus conjonctifs, notamment ceux entourant les vaisseaux hémolymphatiques (cellules souches[8]), (ii) et l'activité mitotique des hémocytes fixes ou circulants résiduels. Une fois les hémocytes circulants expulsés, les hémocytes nouvellement produits (bourgeonnement/mitose) ou les hémocytes fixes tissulaires vont migrer vers les lumens des vaisseaux du système vasculaire de *L. stagnalis* et ils vont « baigner dans l'hémolymphe » (*i.e.*, *free-floating cells*). Un **laps de temps suffisant entre deux expulsions hémolymphatiques** permettra à ces mécanismes de reconstituer le **stock hémocytaire circulant (*a minima*)** au fur et à mesure que les expulsions se répètent. Ceci est le cas des groupes de fréquence de collecte allant de 1/24h jusqu'à 1/96h [Boisseaux *et al.* , 2016a]. L'augmentation légère de la densité hémocytaire — indépendante de la fréquence allant de 1/24h jusqu'à 1/96h — pourrait être interprétée comme une stimulation du *turnover* hémocytaire (mitoses + bourgeonnements) à la suite des expulsions répétées et/ou d'une augmentation de l'âge des individus (les adultes ont des densités hémocytaires plus importantes que les juvéniles [Dikkeboom *et al.* , 1984]). Eut égard à la durée relativement brève de l'expérience par rapport au cycle de vie complet des organismes (environ 1 an en laboratoire et deux ans en milieu naturel), cette deuxième hypothèse a moins de crédit. Enfin, l'augmentation significative des viabilités hémocytaires du groupe de collecte à une fréquence de 1/24h comparé aux autres fréquences plus faibles peut s'expliquer par un temps de résidence/maturation hémocytaire plus faible (moins de sénescence cellulaire) qui se traduit par une augmentation des viabilités cellulaires. Il me semble raisonnable de faire l'hypothèse qu'un **laps de temps critique** existe entre expulsions répétées d'hémolymphe, ce qui conduirait à une incapacité physiologique à **reconstituer *a minima*** le stock hémocytaire de l'organisme. Les résultats suggèrent que le laps de temps critique est inférieur à 24h. Compte-tenu de ces observations, l'immunocapacité (densité hémocytaire + viabilité hémocytaire) est affectée par des collectes répétées mais cela est indépendant des fréquences de collectes allant de 1/48h à 1/96h. L'étude complémentaire sur l'activité oxydative des hémocytes (basale et immunocompétente ou NADPH stimulée avec des particules de zymosane) a révélé une baisse des activités oxydatives lors de collectes répétées à 48h d'intervalle. Cela suggère d'espacer de plus de 48h l'intervalle de temps entre la deuxième et la troisième collecte. Une deuxième collecte 72h après la première serait plus raisonnable pour s'affranchir d'un effet « collecte de l'hémolymphe » sur l'activité oxydative des hémocytes.

8. Leurs capacités de différentiations (multipotentes *vs* oligopotentes *vs* unipotentes) ne sont pas connues.

8.4 Variabilités naturelles des hémocytes

8.4.1 Variabilités inter-individuelles et intra-individuelles

Une question lors d'une présentation m'avait été posée pour me demander quelle explication l'on pouvait donner à l'observation des ***variabilités intra-individuelles de la densité et de la viabilité hémocytaire*** **(INTRA)**. En effet, à première vue il est plus aisément compréhensible qu'il existe une variabilité entre les individus, c'est-à-dire une variabilité ***inter-individuelle de la densité et de la viabilité hémocytaire*** **(INTER)**, plutôt qu'INTRA. Les individus ont des génotypes[9]-phénotypes-âge différents. Il existe nécessairement une variabilité INTER suffisamment élevée pour qu'elle soit considérée et prise en compte dans l'analyse de données. En revanche, la variabilité par individu dans le temps de ces paramètres (INTRA) est également élevée.

Dans l'expérience de l'*article 2* (prélèvements répétés) et celle de l'*article 7* (cadmium), INTRA et INTER étaient de même ordre de grandeur. Par contre, dans les expériences de l'*article 6* (deltaméthrine) et *8* (effluents de STEP), INTER était plus faible qu'INTRA. Notez que les expérimentations de courte durée ne permettent pas d'estimer correctement la variabilité INTRA (1 jour de mesure ou seulement deux jours de mesure). Ashton-Alcox & Ford [1998] avaient suggéré que la variabilité hémocytaire chez l'huître *Crassostrea virginica* s'explique plus par les fluctuations physiologiques (*e.g.,* reproduction, réserves énergétiques, santé globale) que par des fluctuations environnementales (*e.g.,* température, alimentation). La variabilité hémocytaire est donc plus directement liée à des facteurs individuels qu'à des facteurs environnementaux de type nourriture ou température. Cela doit néanmoins être interprété avec précaution puisque Seppälä & Jokela [2010, 2011] avaient observé un effet significatif de la température et de la nourriture sur les traits immunitaires de *L. stagnalis*. Un autre exemple concerne la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) chez qui il a été observé qu'une privation alimentatire modifie plusieurs paramètres hémocytaires, en particulier leur viabilité [Guernic *et al.* , 2015]. Dans l'expérience des prélèvements répétés d'hémolymphe, les organismes étaient nourris *ad libitum* avec des paillettes d'homogénat de poisson et des lentilles d'eau douce *lemna minor*. Dans les autres expériences de longue durée, les organismes étaient nourris *ad libitum* avec de la laitue. Mis à part l'effet quantitatif de la nourriture (*i.e.*, *ad libitum*, privation, ration intermédiaire), il se peut que la qualité de la nourriture influence l'état physiologique des

9. Génotype : ensemble ou partie de l'information génétique d'un individu

organismes et ait notamment un effet sur la fluctuation des paramètres immunitaires. Contrairement aux observations faites chez *L. stagnalis*, Ford & Paillard [2007] avaient observé chez la palourde Manila (*Ruditapes philippinarum*) qu'INTRA était relativement faible comparé à INTER. Les raisons qui pourraient expliquer la forte variabilité INTRA (dans le temps) sont multiples :

1. de possibles petites blessures (coquille, tissus) qui réquisitionnent une part importante des hémocytes circulants au niveau des réparations
2. la suppression des cellules mortes (nécrotiques, apoptotiques), suppression de déchets métaboliques, etc.
3. des facteurs comportementaux et/ou (éco)physiologiques : locomotion, respiration (pulmonée vs cutanée, l'oxygénation de l'hémolymphe), l'alimentation, la reproduction, la digestion, l'excrétion de feces, le transport des nutriments dans la journée, etc.
4. l'augmentation de l'âge et donc de la taille et du volume des organismes. Cela implique une plus grande superficie de bourgeonnement hémocytaire, un plus grand volume de circulation hémolymphatique et donc une genèse de nouveaux hémocytes par mitose plus importante. Les phénomènes de fluctuations journalières (qui pourraient expliquer la variabilité INTRA) des migrations hémocytaires entre les lumens et tissus conjonctifs sont mal connus.

Bien qu'il soit reconnu que les variabilités hémocytaires INTRA sont d'origine multifactorielles, la part de chacune est mal maitrisée. Il serait peut-être pertinent d'évaluer les densités hémocytaires non pas circulantes mais infiltrées dans les tissus. Par exemple, Cochennec-Laureau *et al.* [2003] ont observé chez *Ostrea edulis* que la densité des hémocytes circulants n'était pas différente selon le statut infesté (cas du parasite *Bonamia ostreae*) ou pas. En revanche, le nombre d'hémocytes infiltrés dans les tissus était progressivement plus élevé avec le taux d'infestation des organismes, ce qui suggère un recrutement des hémocytes aux lieux d'infestation tissulaire. De manière similaire, Ford *et al.* [1993] avaient observé une augmentation des hémocytes infiltrés dans les tissus en relation avec le taux d'infestation parasitaire (*Haplosporidium nelsoni*) chez l'huître *Crassostrea virginica*, alors qu'aucune corrélation significative entre infestation et densité hémocytaire circulante n'avait été mise en exergue.

Dans ce sens, la récente revue de Allam & Espinosa [2016] intitulée « *Bivalve immunity and response to infections : Are we looking at the right place ?* » suggère qu'il serait pertinent chez les mollusques bivalves (par extension les mollusques gastéropodes), de faire des analyses au niveau des muqueuses, sous-entendu plus pertinent que l'analyse directe des hémocytes circulants trop soumise à des variations multifactorielles difficiles à interpréter.

8.4.2 Variabilités inter-populations ou inter-expériences

8.4.2.1 Marqueurs d'immunocompétence entre les différentes expériences et sans prendre en compte l'« effet temps »

La gestion des communautés aquatiques s'inscrit dans un contexte complexe avec de multiples stress comme cela a été souligné dans l'article de De Montaudouin *et al.* [2010]. Un des buts de leur étude était de déterminer des niveaux de référence d'immunomarqueurs et de cibler les populations les plus à risque chez la palourde Manila. De manière générale, les variabilités des marqueurs hémocytaires (comme tout biomarqueur) peuvent être attribuées en partie à des « **effets populations** »[10]. À statut écophysiologique comparable (*e.g.,* âge et période de reproduction), différentes populations vont avoir différentes valeurs hémocytaires absolues (moyennes des densités, viabilités, activités de phagocytose, etc.) et des variabilités associées différentes car les organismes évoluent dans des milieux différents. Le milieu façonne les organismes et en retour ils s'acclimatent ou bien s'adaptent sur plusieurs générations. Des dérives génétiques se produisent nécessairement et la sélection naturelle sont autant de facteurs qui génèrent une pression de type spéciation, sans nécessairement aboutir à de nouvelles espèces, mais qui vont tout de même engendrer des différences génotypiques, phénotypiques[11] et physiologiques entre les populations.

Parmi l'ensemble des facteurs qui vont mener à des phénotypes immunitaires différents entre les populations, il semble pertinent de considérer les antigènes d'origine microbiotique comme un groupe de facteurs à part entière qui vont eux aussi co-évoluer avec l'environnement et les hôtes (voir figure 8.3, p. 360). Ainsi, les valeurs de référence pour un biomarqueur immunitaire seront différentes d'une population à une autre. La valeur

10. **Population** : organismes interféconds, et dont la descendance est fertile, qui vivent sur un territoire délimité. **Spéciation** : résultat de la création de nouvelles espèces entre des populations issues d'une même espèce d'origine et qui ne sont plus inter-fécondes. Les moteurs majeurs des phénomènes de spéciation sont la dérive génétique (mutations aléatoires chez les individus) et la sélection naturelle.

11. **Phénotype** : ensemble des caractères observables d'un individu.

d'un marqueur d'immunocompétence pourrait être considérée comme une alerte de mauvais état de santé pour une population donnée alors que cette même valeur sur une autre population correspondrait à un cas de bonne santé (ou bonne immunocompétence). Cet « effet population » pourrait aussi être appelé « variabilité intra-espèce » ou « inter-population » du biomarqueur.

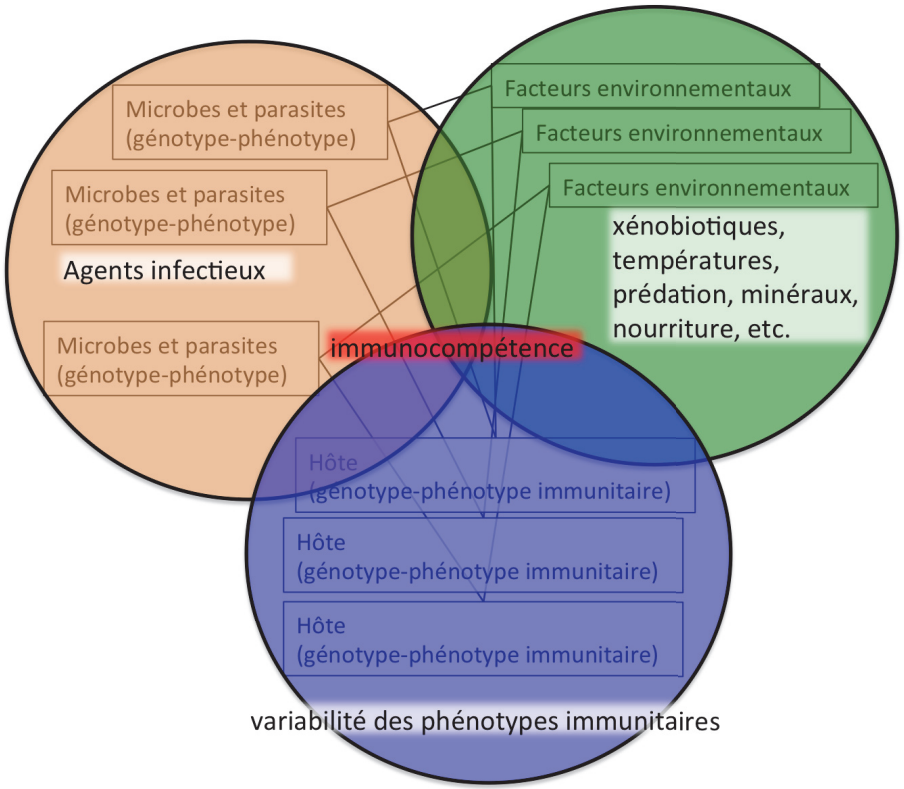


FIGURE 8.3 – Pressions de type « spéciation » et variabilité des phénotypes immunitaires

La compréhension d'un effet spécifique lié à l'origine des populations étudiées sur les paramètres hémocytaires n'était pas un objectif à part entière de la thèse. Néanmoins, puisque j'ai eu la possibilité d'étudier plusieurs populations, une discussion peut être amenée à ce sujet. Cette discussion rentre dans l'objectif n°4 de fournir des éléments de connaissance/compréhension à la variabilité hémocytaire (INTRA, INTER et inter-population ou inter-expérience).

Au regard des données, et puisqu'un *design* expérimental n'a pas été conçu pour répondre à la question, il semble difficile de mettre en avant l'existence ou l'inexistence significative d'un « effet population » sur les paramètres immunitaires mesurés. En particulier, il y a trop de facteurs confondants (taille, poids, nourriture) lorsque les populations/expériences sont comparées. En dépit de cela, de manière purement descriptive,

nous constatons que les différences de quantification des marqueurs d'immunocompétence sont assez faibles entre les diverses populations, mais elles existent (voir le tableau 8.1, p. 364). Les IC (intervalles de confiance) à 95% des moyennes des divers marqueurs d'immunocompétence [12] sont très cohérentes entre populations et expériences. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure un effet population sur les marqueurs mesurés.

Nous pouvons remarquer que la moyenne des densités hémocytaires de la cohorte de l'étang de Broye (Renens, Suisse) était plus élevée que celles des autres populations et cohortes étudiées. Pour essayer d'interpréter cela, il semble délicat d'attribuer la différence observée à un effet « population » plutôt qu'à un effet « biométrie ». Les valeurs biométriques de calibration étaient supérieures (poids et tailles) aux autres cohortes étudiées.

Nous pouvons aussi remarquer que les organismes des expériences « Deltaméthrine » (*i.e.*, population de Briord) et « Pharmaceutiques » (*i.e.*, population d'élevage d'Irstea) avaient une viabilité hémocytaire plus faible que dans l'ensemble des autres expériences.

Pour l'expérience avec la deltaméthrine (DTM), des nématodes avaient été observés dans les feces pendant l'expérimentation et une incertitude subsiste pour savoir s'ils étaient ou non parasites internes de *L. stagnalis*. En premier lieu j'ai clairement considéré que les organismes étaient parasités. Après renseignements, il s'avère plutôt que ce sont des parasites saprophytes et donc leur incidence sur les paramètres immunitaires de *L. stagnalis* sont probablement inexistants.

Comme discuté dans le chapitre 1, le parasitisme peut moduler la réponse immunitaire et donc cela pourrait constituer un facteur confondant dans le cas d'une étude visant à déterminer la part significative ou non des « effets populations » sur les valeurs des biomarqueurs. Van der Knaap *et al.* [1987] ont observé que des limnées infestées avec *T. ocellata* avaient des densités hémocytaires plus élevées mais je ne connais pas d'études similaires chez *L. stagnalis* concernant la viabilité hémocytaire. En revanche, des études à ce sujet existent sur des bivalves. Par exemple, Ford & Haskin [1988] ont observé une réduction significative de la viabilité hémocytaire chez *Crassostrea Virginica* en présence de parasites *Haplosporidium Nelsoni* par rapport aux témoins sans parasites pour des salinités inférieures à 6 ppt (selon salinités de Knudsen) [13]. Hughes *et al.* [2010] ont mis en évidence une augmentation significative de l'apoptose hémocytaire (*i.e.*, entrainant une réduction de la viabilité) lorsqu'une population de *Crassostrea Virginica* était infestée par

12. en excluant les éventuels effets de temps ou de contamination
13. ppt (*parts per thousand*)

une souche virulente de *Perkinsus marinus*, par rapport au groupe témoins non parasité. Nous avons vu dans le chapitre 3 que la méthode employée pour mesurer la viabilité hémocytaire est sensible au temps d'attente des échantillons et a tendance à surestimer la mortalité hémocytaire eut égard —- probablement — à l'adhésion des hémocytes viables sur les parois des plaques et donc à la surestimation des cellules mortes qui restent en suspension. Cela ne me semble pas un problème dès lors que la procédure est rigoureusement la même à chaque expérience. Dans le cas des expérimentations de ce projet, de faibles variations de temps d'attente des échantillons avant quantification peuvent avoir eu lieu. En effet, selon le nombre d'échantillons à mesurer pour la densité hémocytaire d'abord puis pour la viabilité hémocytaire ensuite, le temps d'attente changera nécessairement d'une expérimentation à une autre (variation de $\pm$ 15 min entre expériences). En réduisant au maximum ce temps d'attente et en randomisant les échantillons, les biais pour l'analyse d'effets d'expositions au sein d'une expérience sont largement estompés. En revanche, pour une comparaison directe entre différentes expériences, un effet « expérience » doit être pris en compte dans l'analyse. En dépit de cela, les valeurs entre « expériences » sont cohérentes entre elles.

À partir des tests de phagocytose réalisés, plusieurs calculs peuvent être faits afin d'en tirer différentes indications : capacité *vs* efficacité *vs* activité de phagocytose. Dans un souci de simplification, et aussi pour une meilleure comparaison avec ce qui est le plus courant dans la littérature scientifique, j'ai le plus souvent calculé la « capacité de phagocytose », c'est-à-dire la proportion d'hémocytes étant des phagocytes. En d'autres termes, cela correspond à la proportion d'hémocytes actifs ou encore la proportion d'hémocytes ayant phagocyté au moins une bille en latex. Les valeurs obtenues concernant ce marqueur sont relativement proches entre les expérimentations ce qui pointe une bonne stabilité de ce marqueur d'immunocompétence. Comme précédemment, la phagocytose est plus faible dans l'expérience de la DTM et la part de l'effet « population » et de l'effet « calibration » reste indéterminée.

Pour l'activité de phénol oxydase, les valeurs relatives obtenues en spectrofluorimétrie peuvent être plus raisonnablement comparées entre expérimentations car le *endpoint* mesuré est une absorbance. Au contraire, dans le cas des activités oxydatives, le endpoint mesuré est la fluorescence de la sonde utilisée et les valeurs seront dépendantes du réglage de la sensibilité de fluorescence des photodétecteurs, appelée « gain » en anglais. Ceci

n'est donc pas le cas pour le protocole utilisé pour mesurer l'activité non spécifique PO de l'hémolymphe et donc la conversion en quantité de matière ne semblait pas justifiée. Nous pouvons remarquer également que les valeurs d'activité oxydative et de phénol-oxydase sont cohérentes entre expériences et populations.

Tableau 8.1 – Récapitulatif des valeurs de marqueurs d'immunocompétence

expérience	population	calibration	densité	viabilité
article 2 « Analysis »	laboratoire	32 ± 2 mm	516 [482-550]	86 [83-88]
article 3 « Recomendations »	laboratoire	32 ± 2 mm	—	—
article 4 « Etoposide »	laboratoire	32 ± 2 mm	815 [521-1109]	89 [80-97]
article 5 « Pharmaceuticals »	laboratoire	32 ± 2 mm	DC 500 [417-584] CP 445 [363-526] CSA 500 [408-593]	49 [35-63] 77 [71-82] 63 [57-69]
article 6 « Deltamethrin »	Rhône (Briord)	32.5 ± 2.5 mm	556 [526-586]	66 [61-72]
article 7 « Cadmium »	étang de Renens	39 ± 3 mm	655 [632-677]	76 [74-79]
article 8 « Feyssine »	laboratoire	37 ± 2 mm	536 [500-571]	74 [71-77]

expérience	phagocytose	PO	AO	
			basal	zymosan
article 2 « Analysis »	—	—	—	—
article 3 « Recomendations »	—	—	2.39 [2.26-2.51]	+0.82 [0.74-0.90]
article 4 « Etoposide »	25 [18-32] (billes en excès)	—	—	—
article 5 « Pharmaceuticals »	DC 48 [41-55] CP 38[35-41] CSA 37 [34-39] (ratio 1 : 7)	—	2.82 [2.72-2.92] 2.29 [2.16-2.42] 1.37 [1.24-1.49]	+0.62 [0.53-0.71] +0.78 [0.70-0.85] +0.52 [0.42-0.63]
article 6 « Deltamethrin »	22 [15 – 28] (ratio 1 :7)	7.6 [6.1-9.2]	J2 : 2.58 [2.36-2.80] J21 : 2.74 [2.52-2.96]	+0.55 [0.33-0.78] +0.57 [0.32-0.81]
article 7 « Cadmium »	44 [38-50] (ratio 1 :7)	J10 : 8.2 [7.4-8.9] J29 : 9.0 [7.2-10.9]	J3 : 2.60 [2.42 -2.78] J20 : 2.38 [2.24-2.51]	+0.21 [0.01-0.41] +0.57 [0.50 -0.64]
article 8 « Feyssine »	37 [32-43] (ratio 1 :7)	12.0 [10.9-13.2]	J3 : 2.70 [2.60-2.80] J29 : 2.65 [2.54-2.77]	+0.28 [0.17 -0.38] +0.48 [0.38-0.58]

Ce tableau synthétise les valeurs des marqueurs d'immunocompétence étudiés lors des diverses expérimentations. Les valeurs correspondent à la moyenne [intervalle de confiance à 95%] de la cohorte calculées à partir de l'ensemble des valeurs des témoins ou des valeurs pour lesquelles l'effet d'un contaminant n'est pas significatif, c'est-à-dire les variabilités naturelles des marqueurs d'immunocompétence. Les unités sont les suivantes : densité hémocytaire (cellules/μl), viabilité (% d'hémocytes viables), phagocytose (% d'hémocytes ayant phagocyté au moins une bille), PO (phénol-oxydase, unités relatives ($.10^{-3}$)), AO (activité oxydative, $\log_{10}$[fmol de $DCF.min.\mu l^{-1}$]).

8.4.2.2 Acclimatations et densité hémocytaire entre les différentes expériences et populations (prise en compte de l'« effet temps »)

Il a été rapporté que *L. stagnalis* possède une forte plasticité adaptative[14] [Leicht *et al.* , 2013]. Au cours des expériences de ce manuscrit, les mortalités des organismes des différentes populations étaient variables. Par exemple, une population d'élevage ramenée au laboratoire n'a pas réussi à s'acclimater correctement, et cela lors de plusieurs essais. Au contraire, les populations de terrain se sont bien acclimatées au laboratoire. Il semble donc qu'il existe un effet population sur la capacité d'acclimatation — en terme de survie — des populations à un nouvel environnement. Par ailleurs, la population qui ne s'est pas acclimatée correctement au laboratoire expulsait considérablement moins d'hémolymphe que les populations correctement acclimatées (*i.e.*, qui ont une bonne survie) et les valeurs de densité et de viabilité hémocytaires étaient plus faibles. Cela rappelle le fait que les marqueurs d'immunocompétence sont des marqueurs de santé. Concernant les populations bien acclimatées à l'eau du laboratoire, les différences des divers marqueurs d'immunocompétence sont faibles. Néanmoins, les mesures immunitaires ont été réalisées après acclimatation en ce qui concerne les populations de terrain et donc cette faible variabilité inter-population est peut être le résultat de cette acclimatation. Pour réellement tester l'hypothèse d'un effet d'acclimatation des paramètres immunitaires[15], il faudrait faire des mesures directement sur le terrain au préalable de mesures au laboratoire. Dans ce cadre, une plateforme mobile *MobiCyte* (Dr. Rioult) existe depuis peu en France et cela pourrait être un outil réellement pratique pour mener à bien ce type d'étude.

Les observations en relation avec le tableau 8.1 (p. 364) se basent sur les comparaisons de valeurs de marqueurs d'immunocompétence issues des analyses des LMME (*linear mixed-effect models*) où l'effet du temps au cours des expériences n'est pas inclus. Ce sont des moyennes globales qui n'intègrent pas l'effet du temps. À présent, l'effet du temps

14. Le terme d'*adaptation* employé dans l'article fait plutôt référence, en français, à une *acclimatation*, c'est-à-dire à des changements physiologiques et comportementaux en réponse à une condition environnementale. La notion d'adaptation, au sens évolutif du terme, fait plutôt appel à des changements dont les caractères sont transmissibles de générations en générations par voie génétique. Ainsi, les adaptations peuvent être issues d'acclimatations mais toutes les acclimatations ne se traduisent pas nécessairement en adaptation. Enfin, des caractères qui augmentent la fitness des organismes ne sont pas nécessairement génétiques, ils peuvent êtres épigénétiques et transmis de générations en générations par le déclenchement d'un facteur environnemental approprié qui est présent à chaque génération (*e.g.,* apprentissage).

15. Nous pouvons imaginer une bonne acclimatation en terme de survie des organismes mais pas de plasticité immunologique, c'est-à-dire l'inexistence d'acclimatation des paramètres immunitaires, ou au contraire une acclimatation en terme de survie qui se traduit également par une acclimatation en terme de paramètres immunitaires.

peut être analysé avec une discussion sur l'évolution des densités hémocytaires. En effet, les viabilités hémocytaires étaient à peu près constantes au cours du temps, à l'exception de l'expérience sur le cadmium et des effluents de STEP où les viabilités hémocytaires baissaient au cours du temps.

Contrairement à l'expérience sur les fréquences de prélèvement (population de laboratoire) et celle sur les effluents de STEP (population de laboratoire), les expériences avec la Deltaméthrine (population de terrain) et le Cadmium (population de terrain) ont montré une baisse des densités hémocytaires au cours du temps (voir fig. 8.4, p. 367). Cela est en contradiction directe avec l'affirmation selon laquelle les densités hémocytaires augmentent avec l'âge des individus. Il se peut qu'il y ait un « effet population ».

Cet effet est peut être directement lié à l'acclimatation des organismes mais un tel « effet acclimatation » est nécessairement lié à une population considérée. De même, une baisse des hémocytes au cours du temps avait été observée pour l'essai d'acclimatation des organismes élevés dans un autre laboratoire (voir annexe G.2) et ramenées au laboratoire d'Irstea. Ce dernier exemple était concomitant à une baisse de la survie des organismes. En revanche, la baisse des densités hémocytaires pour les expériences avec le Cd n'était pas concomitante à une baisse fortement marquée de la survie des organismes (en effet, le taux de survie restait >80 % en fin d'expérience). La même remarque peut être faite avec une baisse de la survie encore plus faible pour l'expérience avec la DTM. Notons que les organismes d'Irstea exposés aux effluents de STEP 100% n'ont pas présenté de tendance à la diminution de leurs densités hémocytaires au cours du temps.

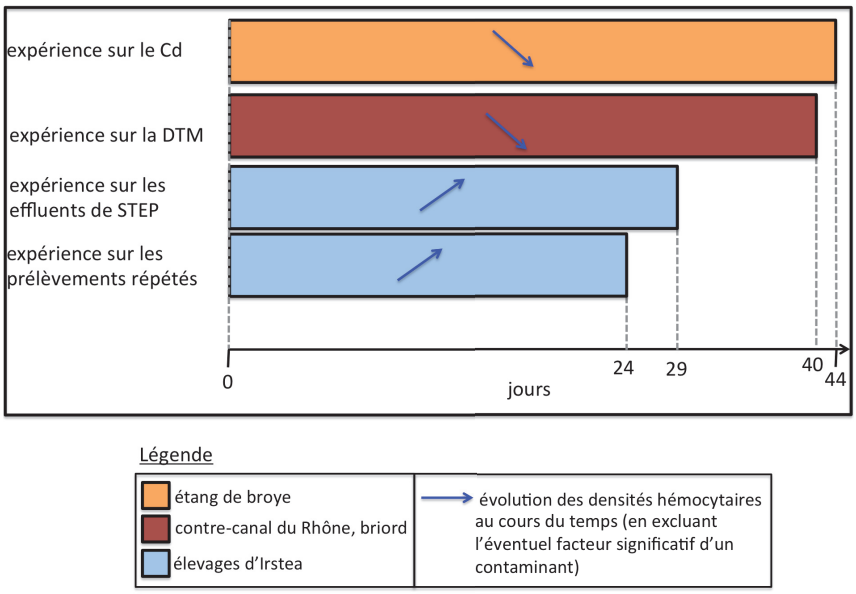


FIGURE 8.4 – tendances d'évolution des densités hémocytaires au cours des expériences

8.4.2.3 Les « effets populations » en immunotoxicologie environnementale et réflexion sur *L. stagnalis* selon plusieurs contextes d'étude

Pour des évaluations d'immunotoxicité au laboratoire sur des populations collectées en milieu naturel, les résultats peuvent dépendre de la résistance/tolérance de la population (comme tout test écotoxicologique). À titre d'exemple, une exposition au Cd à 80 $\mu g.L^{-1}$ pendant 40 jours pourra être très toxique pour une population, et très peu pour une autre. C'est exactement l'incertitude qui demeure concernant la qualification du degré immunotoxique du Cd par rapport à d'autres polluants lorsqu'une comparaison croisée des expérimentations de ce manuscrit est faite. Concrètement, cela vient du fait que nous n'avions pas la possibilité de mener l'ensemble des expérimentations sur une même population de laboratoire. En revanche, cela ouvre d'autres perspectives et réflexions. L'utilisation d'une population de laboratoire standardisée me semble nécessaire.

Une telle populaton d'élevage — bénéficiant d'un contrôle qualité — pourrait être utile non seulement pour des études au laboratoire mais aussi sur le terrain. La liste suivante et la figure 8.5 (p. 370) tentent de situer la pertinence d'utilisation de marqueurs d'immunocompétence chez *L. stagnalis* dans un contexte écotoxicologique selon la population utilisée, le type de contamination et le milieu d'exposition. En effet, l'évaluation de marqueurs d'immunocompétence sera plus ou moins pertinente selon le *design* expérimental de l'étude car cela va conditionner la qualité de l'interprétation des résultats.

Deux grandes catégories de questions écotoxicologiques vont guider le choix du *design* expérimental :

- Quelle immunotoxicité présente une substance ou un échantillon sur *L. stagnalis* ? [population(s) de référence requise(s)]
- Quelle susceptibilité immunitaire vis-à-vis d'un toxique présente une population ? [xénobiotique(s) immunotoxique(s) de référence(s) requis]

Plus en détails, on peut analyser les *design* expérimentaux possibles pour voir à quel type de question éco-immunotoxicologique ils peuvent répondre et avec quelles incertitudes et degré de pertinence :

1. Population de laboratoire, étudiée au laboratoire, avec une contamination artificielle : Cette situation est pertinente pour répondre à la questions suivante : Quelle est l'immunotoxicité d'un xénobiotique ? C'est-à-dire, quel danger immunotoxique présente un contaminant (*e.g.,* émergent) ? Dans ce cas, l'utilisation d'une population de laboratoire serait justifiée. Des contaminations artificielles avec le contaminant à étudier permettraient de juger de son caractère immunotoxique chez *L. stagnalis* et des comparaisons pourraient être faites au fur et à mesure de la compilation des expériences.
2. Population de terrain, étudiée au laboratoire, avec une contamination artificielle : Cette situation est pertinente pour répondre à la question suivante : Quelle est l'immunocompétence et la susceptibilité immunotoxique de la population étudiée ? Dans ce cas, l'utilisation d'une population de terrain ramenée au laboratoire et soumise à une contamination artificielle de — par exemple — trois polluants de référence pourrait être faite. Les trois polluants immunotoxiques de référence devraient être sélectionnés en amont sur une population de laboratoire de référence et pourraient inclure 1 métal, 1 pesticide et 1 autre xénobiotique (*e.g.,* médicament ou PAH). L'acquisition de données sur des populations de terrain pourrait servir à des fins de *biomonitoring*, et puisque cette démarche implique la collecte et le déplacement des populations elle pourrait être qualifiée de *biomonitoring* actif.
3. Population de laboratoire, étudiée au laboratoire, avec une contamination par des échantillons de l'environnement (*e.g.,* sédiments, eau contaminée, etc) : Cette situation est pertinente pour répondre à la question suivante : Quelle est le danger immunotoxique de l'échantillon environnemental ? Dans ce cas, il semble pertinent

d'utiliser une population de laboratoire de référence et de comparer avec des valeurs de références et éventuellement les polluants immunotoxiques de référence.

4. Population de terrain, au laboratoire, avec une contamination par des échantillons de l'environnement (*e.g.*, sédiments, eau contaminée, etc) : Cette situation aurait pour but de répondre à des questions concernant des effets combinés de potentiel immunotoxique des échantillons utilisés d'une part et de la susceptibilité immunotoxique de la population étudiée d'autre part. Ainsi, les doubles incertitudes (*e.g.*, incertitude du danger immunotoxique de l'échantillon et incertitude de la susceptibilité de la population évaluée) rendent cette situation, à mon sens, moins pertinente à envisager sur la base de ces arguments.

5. Population de laboratoire, sur le terrain (encagés) : Cette situation serait pertinente pour répondre à la question suivante : Quelle est le potentiel immunotoxique de tel milieu ? Ainsi, l'utilisation d'une population de laboratoire de référence serait à envisager car plusieurs éléments de comparaisons seraient disponibles, avec des encagements à divers endroits supposés contaminés ou non et des comparaisons avec les polluants immunotoxiques de référence. Par exemple, des encagements en amont et en aval d'une station d'épuration ou d'un rejet industriel seraient un moyen efficace de juger de la qualité de ces effluents via leur potentiel immunotoxique ou plus largement leurs effets immunomodulateurs chez *L. stagnalis*. Des mesures d'accumulation de certaines substances dans les chairs permettraient de mettre en perspective les effets biologiques avec la contamination des tissus par le milieu.

6. Population de terrain, sur le terrain (encagés) : Cette situation permettrait d'évaluer des effets croisés entre susceptibilité immunotoxique de la population et potentiel immunotoxique du milieu d'exposition. Ainsi, les conclusions sur les effets respectifs peuvent être difficiles a l'instar du *design* expérimental numéro 4. Cependant, cette situation d'étude serait à considérer dans un second temps si des problèmes d'acclimatation d'une population d'élevage survenaient. Puisque cette situation fait intervenir des populations de terrain qui seraient déplacées et encagées, la qualification de *biomonitoring* actif est appropriée.

7. Population de terrain, sur le terrain dans leur habitat sans encagements (autochtones) : Cette situation correspondrait alors à du biomonitoring passif. Cela permettrait d'évaluer l'immunocompétence des organismes dans leur propre milieu. De

par les facteurs confondants et les variabilités et « effets populations » mis en jeu, cette démarche me semble pertinente si un suivi sur plusieurs années est réalisé. Par ailleurs, cette démarche pourrait être couplée aux situations 2, 3 et/ou 5 afin de mieux distinguer la susceptibilité immunotoxique de la population étudiée et le potentiel immunotoxique de leur milieu, respectivement.

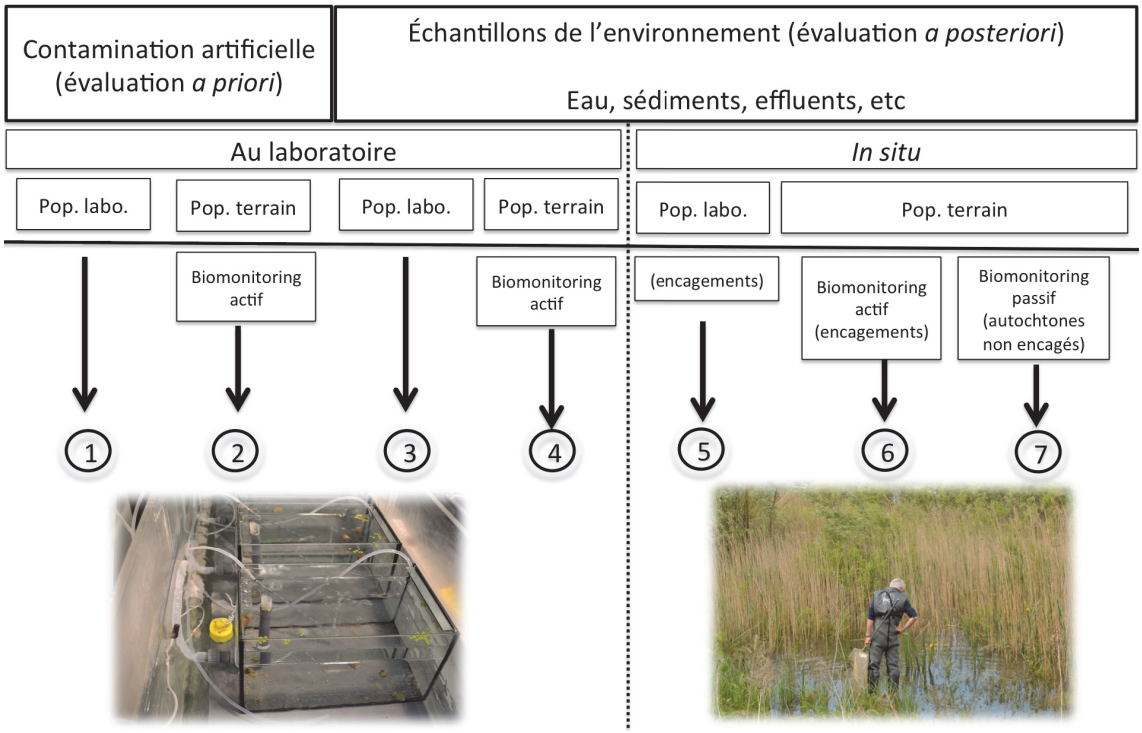


FIGURE 8.5 – Vue d'ensemble des modalités d'utilisation de *L. stagnalis* dans les *designs* expérimentaux

Les numéros font référence au type d'étude correspondant ou *design* expérimental possible qui sont discutés ci-avant. Ces numérotations facilitent la mention dans le texte où une réflexion est amenée autour de la pertinence d'utilisation de marqueurs d'immunocompétence sublétaux selon les *designs* expérimentaux (*e.g.*, laboratoire vs terrain, encagés vs non encagés), populations (population d'élevage standardisée vs population de terrain) et objectifs ou questions des études (caractérisation de l'immunotoxicité d'un polluant ou échantillon de l'environnement vs caractérisation de la susceptibilité immunotoxique d'une population dans le cadre d'un *biomonitoring*, etc).

L'intérêt d'évaluer plusieurs *endpoints*, à plusieurs niveaux biologiques et sur plusieurs fonctions physiologiques est de pouvoir détecter une toxicité qui sera différente selon la spécificité d'action du xénobiotique ou de l'échantillon environnemental. Un contaminant spécifiquement immunotoxique, par définition, ciblera le système immunitaire avant d'autres fonctions physiologiques. De la même manière, un perturbateur endocrinien altérera le système hormonal avant que d'autres effets à d'autres niveaux physiologiques n'apparaissent.

Avec ce constat, c'est bien dans (i) le caractère précoce d'indication d'une toxicité globale (*i.e.*, peu spécifique) [16] et (ii) l'information sur le mode d'action du contaminant (cible=système immunitaire, protecteur contre les maladies infectieuses) que l'étude des marqueurs d'immunocompétence prend son intérêt.

L'utilisation d'outils de diagnostic de l'immunocompétence serait particulièrement pertinente dans la phase de transition entre une bonne santé et un début d'affection, mais avant qu'il n'y ait de déclin. Le déclin serait le résultat possible d'une mauvaise immunocompétence qui aurait pour conséquence d'augmenter l'incidence [17] ou la prévalence [18] d'une maladie infectieuse, suite à une fragilisation immunitaire par la pression chimique. L'utilisation de ces outils dans un contexte de surveillance des milieux permettrait de mettre en oeuvre des moyens gestion environnementale avant que n'apparaissent des endémies voire épidémies sur les populations.

Pour cela, il faudrait être capable de détecter les signaux précoces d'un début de perturbation et, eut égard à l'ensemble des facteurs qui influent sur la variabilité des immunomarqueurs, se situer dans cette zone d'effets très subtils serait facilité si un suivi sur plusieurs années est réalisé avec une meilleure connaissance des divers lieux d'abondance de l'espèce.

Le développement d'une base de données avec un **traitement statistique à large échelle** (*e.g.,* type épidémiologie) serait nécessaire si un suivi des marqueurs d'immunocompétence de populations de terrain est envisagée (*biomonitoring passif*). En effet, les différents facteurs biotiques/abiotiques, les possibles effets de populations ou spéciations et aussi le caractère subtil de modulation des marqueurs en cas d'immunotoxicité imposent de suivre les populations au cours du temps (mois, années). Cela impliquerait

16. par exemple un échantillon environnemental complexe avec plusieurs xénobiotiques aux spécificités différentes qui interagissent et forment un tout pour possiblement cibler/perturber plus spécifiquement (sensibilité + précocité + rapidité) le système immunitaire ou alors, par exemple, un toxique peu spécifique comme le cadmium qui est connu pour induire des néphrotoxicités, hépatotoxicités, immunotoxicités, etc.

17. En épidémiologie, ce terme correspond au nombre de nouveaux cas d'une maladie sur une période donnée.

18. En épidémiologie, ce terme correspond au nombre d'individus malades à un instant donné.

également de disposer d'une grande base de données pour une bonne fiabilité statistique dans la détermination de signaux précoces d'altération immunitaire. Cette base de donnée devrait inclure de nombreuses informations environnementales, telles que le biotope, les populations, la biométrie des organismes, la saison, etc.

8.4.3 Propositions de valeurs de référence

But de la définition de valeurs de référence : Il s'agit de dégager des fourchettes de valeurs afin d'avoir une référence pour situer les valeurs mesurées lors de futures études (avec les mêmes méthodes de mesure). Ces valeurs pourraient évidemment être affinées et recalculées lors de futures acquisitions qui complèteraient ces données. Ainsi, les cohortes qui auraient une moyenne — pour un marqueur d'immunocompétence considéré — inférieure à la fourchette de la valeur de référence pourraient être classifiées comme « en alerte » (mauvaise santé, et/ou mauvaise immunocompétence). *A contrario*, des cohortes dont la moyenne du marqueur d'immunocompétence serait supérieure à sa valeur de référence pourraient être classifiées comme « très immunocompétentes ou en bonne santé » dans un premier temps. Évidemment les phénomènes d'hormèse peuvent survenir et alors une augmentation du marqueur ou une valeur élevée pourrait traduire la présence d'un stress chimique, par exemple. Dans tous les cas, des valeurs en dehors des fourchettes de référence qui sont proposées devraient attirer l'attention de l'investigateur. Le tableau 8.2 (p. 374) présente les valeurs de références calculées à partir des trois populations qui ont été étudiées.

Calculs des valeurs de référence : En comparant les valeurs des marqueurs entre les diverses expériences menées au cours de ce projet (voir le tableau 8.2, p. 364), nous observons une faible variation des moyennes de densités hémocytaires. Comme discuté précédemment, (i) il y a une importante variabilité INTRA et INTER, (ii) mais les moyennes des biomarqueurs d'immunocompétence de chaque cohorte (expérience) sont proches les unes des autres et (iii) cette variation, bien que faible, existe et elle doit être prise en compte. L'existence d'un « effet population » sur les valeurs de biomarqueurs ne peut pas être assurée (voir discussion ci-avant) mais l'inexistence de cet effet ne peut pas non plus être exclue.

Les valeurs présentées pour chaque population et chaque biomarqueur d'immunocompétence (tableau 8.2, p. 374) correspondent à la moyenne (intervalle de confiance à 95%,

i.e., quantiles 2.5%—97.5%) des valeurs obtenues des diverses mesures pour une même population (voir valeurs du tableau 8.1, p. 364). Les propositions de fourchettes de référence se veulent larges et l'effet possible des populations a été pris en compte. Ces deux raisons justifient le calcul présenté ci-dessous :

$$\text{Valeur de référence} = \left(\frac{quantile\ 2.5\%minimum + quantile\ 97.5\%maximum}{2}\right) \pm \left(\frac{quantile\ 97.5\%maximum - quantile\ 2.5\%minimum}{2}\right)$$

Ainsi, pour chaque marqueur d'immunocompétence, la fourchette de référence a été calculée à partir de la valeur la plus basse des quantiles 2.5% parmi les trois populations et la valeur la plus haute des quantiles 97.5% parmi les trois populations.

Tableau 8.2 – Proposition de valeurs de référence pour les marqueurs d'immunocompétence étudiés

population	**Densité hémocytaire**
irstea	499 (IC 95% 434 — 565)
briord	556 (IC 95% 526 — 586)
renens	655 (IC 95% 632 — 677)
valeur de référence	**moyenne d'une cohorte : 555±121** *cellules.μl^{-1} d'hémolymphe*
population	**Viabilité hémocytaire**
irstea	68.7 (IC 95% 61.5 — 75.5)
briord	66 (IC 95% 61 — 72)
renens	76 (IC 95% 74 — 79)
valeur de référence	**moyenne d'une cohorte : 70±9** *%d'hémocytes viables*
population	**Activité non-spécifique phénol-oxydase**
irstea	7.9 (IC 95% 6.75 — 9)
briord	9 (IC 95% 7.2 — 10.9)
renens	12 (IC 95% 10.9 — 13.2)
valeur de référence	**moyenne d'une cohorte : 9.6±3.5** *unités relatives* ($.10^{-3}$)
	[*absorbance à 480 nm de L – DOPA à 2.5 mg.ml^{-1}*]
population	**Capacité de phagocytose**
irstea	40 (IC 95% 35 — 44)
briord	22 (IC 95% 15 — 28)
renens	44 (IC 95% 38 — 50)
valeur de référence	**moyenne d'une cohorte : 32±17** *%d'hémocytes ayant phagocyté au moins une microbille*
population	**Activité oxydative des hémocytes : activité basale**
irstea	2.37 (IC 95% 2.25 — 2.48)
briord	2.66 (IC 95% 2.44 — 2.88)
renens	2.49 (IC 95% 2.33 — 2.64)
valeur de référence	**moyenne d'une cohorte : 2.6±0.3** *log_{10}[$fmol\ de\ DCF.min^{-1}.\mu l^{-1}$ d'hémolymphe]*
population	**Activité oxydative des hémocytes : activité immunostimulée au zymosane**
irstea	+0.58 (IC 95% 0.49 — 0.67)
briord	+0.49 (IC 95% 0.35 — 0.64)
renens	+0.49 (IC 95% 0.33 — 0.65)
valeur de référence	**moyenne d'une cohorte : +0.5±0.17** *+log_{10}[$fmol\ de\ DCF.min^{-1}.\mu l^{-1}$ d'hémolymphe]*
	(*à ajouter à l'activité basale*)

8.5 Facteurs confondants

Il existe plusieurs facteurs potentiels ou avérés (autres que la pollution chimique) qui peuvent moduler la réponse immunitaire des organismes. Une meilleure compréhension de l'influence de ces divers facteurs biotiques ou abiotiques permettrait une meilleure interprétation des valeurs de marqueur d'immunocompétence dans un contexte écotoxicologique. Ces facteurs sont discutés dans cette section. Pour la plupart, nous pouvons considérer qu'ils n'ont pas ou peu d'incidence sur les résultats présentés dans ce manuscrit car ils sont contrôlés au laboratoire. En revanche, de nombreux facteurs confondants seraient à évaluer si une application *in situ* avec *L. stagnalis* est envisagée en immunotoxicologie environnementale.

8.5.1 Dans les études de ce manuscrit

Certains effets biotiques potentiels ont été discutés précédemment tels que les « effets populations » en termes de spéciation immunitaire, de capacité d'acclimatation le cas échéant et de calibration des individus (âge, poids et taille). Au laboratoire, les facteurs abiotiques tels que la lumière, la température et la conductivité sont contrôlés et donc leur influence ne doit pas s'exprimer. En revanche, il est légitime de les considérer lorsqu'une étude sur le terrain est menée ou lorsque différentes conditions de laboratoire sont comparées. Dans la comparaison des études de ce manuscrit, les facteurs confondants abiotiques potentiels concernent la nourriture (laitue *vs* flocons d'homogénats de protéines animales) et les anions nitrites. Un éventuel effet biotique ou écophysiologique serait l'effet « Coolidge » (*i.e.*, surpopulation par bécher ou aquarium).

Alimentation : L' étude de l'effet de l'alimentation d'un point de vu **quantitatif** (*i.e.*, la quantité de nourriture : *ad libitum* vs aucune nourriture) a montré l'existence d'une influence significative sur les traits immunitaires, en particulier l'activité phénol-oxydase non spécifique. Pour les études de ce manuscrit, l'aspect quantitatif de la nourriture n'est pas à considérer car l'alimentation a toujours été *ad libitum*, à l'exception des expositions aux produits pharmaceutiques de l'*article 5*. Néanmoins, dans ce dernier aucune différence significative sur les divers marqueurs d'immunocompétence étudiés n'a été observée concernant le groupe témoins « salade *ad libitum* » et le groupe témoins « sans nouriture » de la série d'exposition au Diclofénac. Nous ne connaissons pas l'effet potentiel de

la **qualité** de la nourriture sur les valeurs des marqueurs immunitaires chez *L. stagnalis*.

Les organismes étudiés dans les expériences des *articles 2, 3, 4 et 5* étaient nourris avec des flocons d'homogénats d'animaux aquatiques (poissons, crustacés, etc), alors que les organismes des *articles 6, 7 et 8* étaient nourris avec de la laitue. À mon arrivée au laboratoire, les flocons d'homogénats de protéines étaient utilisés (pratique courante en aquaculture). Comme discuté dans les sections précédentes, ce type de nourriture accélère la croissance des organismes et augmente leur résistance aux produits toxiques. De plus, des concentrations non négligeables de polluants ont déjà été retrouvés dans ce type de nourriture (*e.g.,* PFOS) et de nombreux laboratoires utilisent la laitue comme unique source de nourriture pour l'élevage de *L. stagnalis*. Nous avons pris la décision de changer l'alimentation des organismes pour de la laitue *ad libitum*. Nous n'avons pas constaté de changement remarquable des paramètres immunitaires entre les expériences correspondantes. En revanche, la couleur de l'hémolymphe était plutôt verdâtre que bleuâtre lorsque les organismes étaient nourris à la laitue (observation personnelle).

Nitrites : Concernant les anions nitrites, ceux-ci ne rentrent pas dans les critères de validation de la qualité de l'eau du protocole OCDE de reprotoxicité avec *L. stagnalis*, mais je ne connais pas d'étude qui prouve la non-existence d'effet de ces anions sur la reproduction ou l'immunocompétence chez *L. stagnalis*. Lors de renouvellements continus du milieu d'exposition, les anions nitrites sont souvent à de très faibles concentrations (<0.1 ppm). En revanche, en condition de renouvellement semi-statique, ces anions sont souvent à des concentrations non négligeables (1 - 2 ppm). C'est le cas de l'expérience avec le cadmium où les anions nitrites, après 4 jours en conditions statiques, étaient presque systématiquement de 1-2 ppm dans l'eau des béchers. Comme mentionné dans une section précédente de la *Discussion générale*, une baisse des densités hémocytaires au cours de cette expérience (cadmium) avait été observée. Cela pourrait être le résultat de l'acclimatation progressive et/ou de l'effet d'un stress chimique par les nitrites. En revanche, les organismes de l'expérience sur la DTM qui portait sur une autre population de terrain ramenée au laboratoire, avait aussi une densité hémocytaire qui baissait au cours du temps alors que le milieu de renouvellement de l'eau était continu et les concentrations en nitrites étaient inférieures à 0.1 ppm. L'effet de la concentration en nitrites sur les marqueurs d'immunocompétence mérite d'être étudié dans le futur. De plus, dans les milieux stagnants saprobes (milieux

riches en matières organiques), il est fort probable que l'eau soit hypoxique et fortement chargée en nitrites. Enfin, notons que dans toutes les expériences de ce manuscrit, les concentrations en cations ammonium étaient inférieures à 0.1 ppm, ce qui est très faible, et donc il est très peu probable que cela constitue un facteur confondant dans les études présentées. En revanche, il serait également important d'évaluer l'effet des concentrations en cation ammonium sur les marqueurs d'immunocompétence chez *L. stagnalis* car des pics d'ammonium pourraient survenir dans les mares où vivent les limnées, et ils seraient à prendre en compte dans l'interprétation des résultats le cas échéant.

Effet Coolidge : L'effet subtil d'un autre facteur, en lien avec le *design* expérimental, peut éventuellement être considéré. Il s'agit de l'*effet Coolidge* (voir explications dans le chapitre 1). Les comparaisons entre des organismes mis en bécher (*e.g.,* 2 à 4 pour 500 à 800 mL) et d'autres organismes mis en aquarium (*e.g.,* 10 L pour 8 organismes) pourrait être biaisées par un tel phénomène lors d'expériences prolongées. Si la reproduction est anormalement stimulée, des répercussions immunitaires pourraient apparaitre (*trade-offs*). Cet effet potentiel pourrait simplement être étendu à un effet de « surpopulation ». La probabilité de rencontre entre organismes est inversement proportionnelle au volume d'eau par organisme au sein d'un même contenant (*e.g.,* aquarium, bécher). Il se peut qu'un léger effet de ce type ait eut lieu mais il est difficile d'être affirmatif.

8.5.2 Perspectives sur la compréhension des facteurs confondants

En plus des trois facteurs confondants potentiels discutés ci-avants (*i.e.*, alimentation, nitrites et *effet Coolidge*) et des facteurs biométriques ou écophysiologiques discutés dans les sections précédentes (âge, poids, taille, populations), de nombreux autres facteurs confondants seraient à évaluer pour une application *in situ* et une meilleure interprétation des immunomarqueurs dans ce contexte.

Les facteurs confondants potentiels, biotiques et abiotiques dont l'étude semble à privilégier concernent les effets liés aux changements de saison et les paramètres abiotiques associés (de manière combinée ou non : lumière, température, oxygénation) qui vont influer sur les paramètres écophysiologiques des organismes, en particulier leur cycle de reproduction.

Un autre facteur à mieux caractériser serait le parasitisme (dans le cadre d'une étude

éco-immunotoxicologique).

Mis à part les études de Seppälä & Jokela [2011, 2010]; Leicht *et al.* [2013] sur l'effet de la nourriture et de la température, les études de facteurs abiotiques sur les traits immunitaires de *L. stagnalis* manquent dans la littérature. Les facteurs confondants biotiques ou abiotiques qui devraient être évalués dans le futur pour des applications *in situ* sont listés ci-dessous et certains sont discutés dans les sous-sections qui suivent.

1. l'effet du facteur « reproduction » en termes de *période ou cycle de reproduction*
2. l'effet du facteur « lumière » : (i) l'intensité lumineuse et (ii) le cycle de la photopériode (*e.g.,* lumière/obscurité selon des cycles journaliers de 0h/24h vs 1h/23h vs 12h/12h vs 16h/8h vs 23h/1h vs 0h/24h).
3. l'effet du facteur « oxygène dissous » (anoxie *vs* hypoxie *vs* milieu oxique)
4. l'effet du facteur « dureté de l'eau », avec par exemple une « eau très douce », une « eau douce », une « eau saumâtre » ou fortement minéralisée de certains milieux saprobes
5. l'effet du facteur « stress expérimental » lors d'encagement *in situ*
6. l'effet du facteur « stress de prédation »
7. l'effet du facteur « parasitisme » ou la présence d'autres « microorganismes » ou matériel issus de microbes (*e.g.,* PAMPs)

8.5.2.1 Facteurs abiotiques et biotiques/écophysiologiques

Saison, lumière, température et cycle de reproduction : Il est bien connu que les paramètres immunitaires des organismes changent en fonction des saisons [Kortet & Vainikka, 2008; Cooper & Parrinello, 1996], notamment chez les mollusques [Duchemin *et al.* , 2007; De Montaudouin *et al.* , 2010]. Ceci est d'autant plus remarquable pour le système immunitaire que les saisons influencent beaucoup les dynamiques hôtes–parasites [Barber *et al.* , 2016]. Ce type d'étude n'a pas été mené chez *L. stagnalis*. L'effet de la saison est lui-même assez global pour discriminer les facteurs sous-jacents qui sont majoritairement mis en jeu. Les saisons vont engendrer des modifications multiparamétriques des écosystèmes : conditions trophiques, températures, luminosité, reproduction, etc. Ainsi, il semble nécessaire d'évaluer les divers facteurs de manière séparée au laboratoire avant d'envisager une étude plus globale de l'effet de la saison en milieu naturel.

Il faudrait étudier l'effet du cycle reproducteur sur les paramètres immunitaires chez *L. stagnalis*. Par exemple, l'influence sur le système immunitaire de cet aspect (éco)physiologique a été démontré chez l'huître *Crassotrea gigas* [Duchemin, 2007] et chez la moule d'eau douce *Dresseina sp* [Evariste *et al.* , 2016]. Il serait possible de recréer des conditions de luminosité/photopériode/température de printemps — été et d'automne — hiver en comparant les valeurs des marqueurs d'immunocompétence des deux groupes. Par ailleurs, rappelons-nous que le facteur « sexe » des individus dans la reproduction n'est pas à considérer car *L. stagnalis* est une espèce hermaphrodite.

La reproduction est régulée principalement par la lumière (photopériode et intensité) et la température. Leicht *et al.* [2013] ont observé qu'une **température** élevée (25 ° C *vs* 15 ° C) pendant plus d'une semaine a engendré une diminution de la densité hémocytaire des organismes. Cette étude montre que les paramètres de reproduction étaient dans un premier temps stimulés (avant une semaine de stress thermique). Puisque les variations de température des bain-maries étaient très faibles entre toutes les expériences de ce manuscrit [19], l'effet modulateur de la température sur les paramètres immunitaires n'est pas à considérer directement. En revanche, l'étude de Leicht *et al.* [2013] montre qu'un facteur qui module la reproduction pourra également avoir un retentissement, soit direct soit par réaction en chaine, sur les traits immunitaires.

Des études complémentaires seraient nécessaires pour évaluer, par exemple, l'effet de faibles température hivernales (*e.g.*, 2-10 ° C) sur les marqueurs d'imunocompétence si des études sur le terrain en hiver sont envisagées.

Oxygénation : Une étude a été menée concernant la résistance de *L. stagnalis* aux conditions anoxiques [Wijsman *et al.* , 1985]. Les auteurs ont observé une résistance des limnées pendant 40h en conditions anoxiques à 20 ° C. Une diminution en carbohydrates des tissus et augmentation de D-lactate et succinate dans l'hémolymphe avec une augmentation linéaire du contenu calcique a été mesurée. Les auteurs suggèrent que l'analyse de l'hémolymphe peut servir d'indicateur du métabolisme anaérobie de l'organisme. Puisque les hémocytes circulants « baignent » dans l'hémolymphe, il est fortement possible que les paramètres hémocytaires soient affectés par des conditions anoxiques/hypoxiques en dépit du fait que les organismes peuvent respirer de manière aérienne. L'oxygénation des

19. Dans le cadre d'une utilisation en laboratoire, la température et la photopériode étaient déterminées de manière à donner les conditions pour une reproduction continue tout au long de l'année (conditions température/photopériode de la saison « printemps-été » en permanence).

milieux, en particulier stagnants, est amenée à fortement changer selon les saisons et les biotopes (*e.g.,* mares, lacs, rivières). Ainsi, l'effet de l'oxygénation de l'eau sur les paramètres immunitaires de *L. stagnalis* serait à évaluer afin d'améliorer l'interprétation des résultats pour une étude immunotoxicologique menée sur le terrain.

Stress lié à un encagement : Concernant l'utilisation d'encagements *in situ* avec *L. stagnalis*, les systèmes mis en place doivent (i) pouvoir laisser les organismes remonter à la surface pour respirer (la contrainte à la respiration cutanée sur de longues périodes peut être génératrice de stress) et (ii) permettre un abris sédimentaire/vaseux des organismes (surtout si l'étude se fait en automne—hiver). Ainsi, un développement technique et l'étude de l'effet « cage » sur le stress et traits immunitaires de *L. stagnalis* serait à mener.

Stress lié à la prédation : Le stress de prédation peut avoir une influence sur les paramètres hémocytaires des organismes comme cela a été observé chez *Physa girina* [Sandland & Carmosini, 2006]. Les effets d'un stress de prédation répété et combiné à un stress chimique sur les traits immunitaires de *L. stagnalis* pourraient être évalués. Il en résulterait une meilleure comparaison de paramètres immunitaires entre populations aux conditions trophiques très différentes (proies potentielles — prédations).

8.5.2.2 Facteurs confondants microbiotiques

L'effet croisé du parasitisme et des xénobiotiques est un élément important dans l'analyse des marqueurs d'immunocompétence. Comme mentionné dans le chapitre 1, *L. stagnalis* est connue pour héberger de nombreux parasites en milieu naturel. Les parasites interagissent de manière particulière avec le système immunitaire de leurs hôtes. Ils adoptent différentes stratégies de camouflage pour éviter leur reconnaissance immunitaire (*i.e.*, non-soi) par l'hôte et/ou modulent certains paramètres immunitaires de leurs hôtes. Ces réponses seront variables selon le parasite, le taux et le temps d'infestation. D'une part, les xénobiotiques peuvent interagir avec le système immunitaire, d'autre part ils peuvent interagir avec les parasites. De plus, les parasites peuvent induire une réponse immunitaire chez leur hôte.

A titre d'exemple, il a été observé que le trématode *Plagiorchis mutationis* affectait

les traits immunitaires chez *L. stagnalis* : changement de la proportion de « *spreading cells* », diminution de l'activité de phagocytose [Kryukova *et al.* , 2014]. Dans ce sens, le parasitisme peut être envisagé comme un facteur confondant potentiel. Le fait que les xénobiotiques intéragissent non seulement avec les hôtes mais aussi avec les parasites, va générer des réponses croisées complexes selon les sensibilités respectives des deux protagonistes vis-à-vis du produit toxique. La recherche d'effets croisés d'une pression chimique et d'une pression microbiotique peut être similairement envisagée avec des parasites et d'autres microbes non parasites, pathogènes ou pas. Ce pan de recherche reste à explorer chez *L. stagnalis*. En outre, dans le cadre d'une exposition *ex vivo* des bactéries dans le milieu (*e.g., challenge* bactérien), il serait utile de comparer les viabilités de ces bactéries au cours du temps entre les témoins et groupes contaminés avec des xénobiotiques afin de connaitre l'effet toxique du contaminant sur ces bactéries.

Dans ce cas, la notion de *précocité d'action du xénobiotique*, non pas envers un processus physiologique de l'hôte comme discuté dans ce manuscrit, mais envers l'hôte ou le pathogène, serait à considérer.

Il faut garder à l'esprit que différentes populations auront différentes susceptibilités face au toxique et face aux microbes. Ainsi, entre deux populations, des expositions en laboratoire à un même parasite et un même polluant pourront mener à des résultats contradictoires selon les sensibilités respectives face à ces deux agents stresseurs. Nous parlons donc bien d'effets croisés entre d'une part un « effet population » ou susceptibilité/résistance d'une population, et d'autre part un effet « virulence du microbe ». Il pourrait être envisagé qu'une faible exposition à un toxique soit globalement bénéfique à l'organisme si ce toxique impacte plus précocement le pathogène/parasite que l'organisme du gastéropode.

Un *design* expérimental intéressant pour fournir des éléments de compréhension au parasitisme comme potentiel facteur confondant dans un contexte écotoxicologique multistress, serait d'utiliser l'approche multibiomarqueurs développée dans ce manuscrit avec des groupes exposés à des polluants (concentrations environnementales), des groupes avec un parasitisme induit contrôlé mais non exposé aux polluants, un groupe avec un para-

sitisme induit et une exposition au polluant (contexte multistress) et un dernier groupe témoins sans parasites ni polluants. Pour rappel du chapitre 1, des méthodes ont été décrites pour injecter des parasites (*miraciadia* du trématode *T. ocellata*) chez *L. stagnalis* [Meuleman *et al.* , 1984a].

8.6 *Challenges*/inductions immunitaires et évaluation de l'immunocompétence des organismes

8.6.1 Expositions réalisées

L'utilisation de PAMPs semble pratique pour déclencher une réponse immunitaire. Dans le cadre de la thèse, les hémocytes de limnées ont été exposés à des particules de zymosane de manière *ex vivo* afin de stimuler l'activité oxydative immunocompétente des hémocytes. Des essais de stimulation de l'activité oxydative des hémocytes avaient été tentés par exposition de LPS (*Escherichia Coli*) et de LTA (*Bacillus subtilis*) mais les résultats n'ont pas été concluants. Seules les particules de zymosane ont induit fortement cette activité oxydative des hémocytes. La technique employée correspond à la mesure *in vitro* (*i.e.*, plaque 96-puits) d'une exposition *ex vivo*. Cela permet de mieux se rapprocher de l'immunocompétence des hémocytes — par extension des organismes — à internaliser les particules et mettre en place le système de défense oxydatif immunocompétent.

Un essai *in vivo* (sur organisme entier) d'exposition *ex vivo* à des bactéries lyophylisées *E-Coli* a été fait dans le cadre de l'expérimentation avec le cadmium. L'exposition a été faite *ex vivo* mais une fraction des bactéries est supposée intéragir avec le milieu interne des organismes pour générer une réponse immunitaire *in vivo*. L'exposition a été faite de cette manière pour deux raisons principales : (i) cela mime de manière plus réaliste les voies d'expositions des limnées aux bactéries dans leur milieu aquatique naturel et (ii) de nombreux articles reportent le déclenchement d'une immunoréponse par exposition *ex vivo* aux bactéries lyophylisées *E-Coli* chez des gastéropodes [Seppälä & Leicht, 2013; Russo & Madec, 2013; Février *et al.* , 2009]. Ces bactéries lyophilisées contiennent, entre autres PAMPs, des LPSs. Une tendance à la réduction de l'activité PO a été observée, bien que statistiquement non significative (t-value = |1.6 - 1.99|). Ainsi, un effet est fortement suspecté. Les lyophilisats ont été introduits directement dans les béchers à des concentrations relativement élevées afin de générer une immunoréponse forte. En revanche nous

connaissons mal la part de ces bactéries qui vont dans le système interne des limnées.

Dans l'expérience d'exposition de *L. stagnalis* aux effluents de STEP, nous pouvons considérer que les organismes ont été exposés à de multiples polluants mais aussi à de multiples microorganismes car il est bien connu — et irréfutable — que les effluents municipaux contiennent de nombreux xénobiotiques et microbes. Comme discuté dans l'article correspondant, des immunoréponses ont été observées avec des niveaux de significativités statistiques de t entre |1.6—1.99|. Ces expositions ont maximisé les scénarios d'exposition de populations de terrain qui vivraient directement en aval de la STEP (effluent non dilué). En revanche, le taux et la diversité des charges microbiennes étaient inconnues. Les effluents de STEP ont induit de subtils effets immunostimulants sur plusieurs paramètres hémocytaires : densité, activité phénol-oxydase non spécifique et activité immunocompétente. Pour améliorer l'interprétation des résultats, il serait nécessaire pour de futures expériences de quantifier la charge microbienne et si possible la contamination chimique via des *screening* de quantification de micropolluants (*e.g.,* voir [Granger *et al.* , 2016]).

8.6.2 Perspectives

La réponse immunitaire des organismes va dépendre de la relation pathogénique ou non du microbe avec l'espèce mais aussi du mode d'exposition (*e.g.,* injection intramusculaire, intrapalléale, extrapalléale) comme cela a été observé avec *Vibrio tapetis* (bactérie à gram négatif) chez quatre espèces marines de bivalves [Allam *et al.* , 2006]. Il serait pertinent pour de futures expériences de faire des injections directement dans le système circulatoire de *L. stagnalis*. L'utilisation de bactéries vivantes serait aussi pertinente à envisager. Dans le calendrier de la thèse cet aspect n'a pu être abordé. Il serait toutefois assez simple de faire des cultures bactériennes et des *challenges* via des injections *in vivo* de bactéries sur organismes entiers après des développements méthodologiques pour minimiser le caractère invasif de la technique.

Dans ce contexte, l'utilisation d'une population de référence de laboratoire et d'un « *challenge* bactérien de référence » semble particulièrement pertinente car la sensibilité de cette population à ce *challenge* serait connue et alors nous nous affranchirions de l'incertitude sur une possible résistance hôte-pathogène afin de mieux caractériser l'immunotoxicité d'une substance ou d'un échantillon environnemental.

D'autres facteurs microbiotiques — qui n'ont pas encore été discutés – auxquels *L. stagnalis* est souvent exposée en milieu naturel sont les toxines de certaines cyanobactéries (*e.g.,* mycrocystines produites de *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaenopsis*) [Chorus, 2001]. *L. stagnalis* est particulièrement exposée à ces toxines lors de phénomènes d'eutrophisations de milieux stagnants où les organismes ingèrent ces toxines via l'alimentation [Lance *et al.* , 2006]. Des études ont été menées à ce propos chez *L. stagnalis* et les conclusions concernant le succès de dépuration se portent sur la capacité à métaboliser et éliminer ces toxines via le tractus digestif [Zurawell *et al.* , 2006]. Il serait intéressant de mener une étude multistress avec ce type de cyanobactérie produisant des toxines dites hépatotoxiques avec en parallèle une contamination chimique pour évaluer *in fine* l'immunocompétence des limnées. Il a déjà été observé qu'il existe une intéraction entre cyanobactéries et pesticides vis-à-vis d'effets subséquents sur *L. stagnalis* [Lance *et al.* , 2016]. L'étude révèle des intéractions croisées complexes concernant les activités GST-transférase et l'accumulation de mycrocystines avec ou sans présence du pesticide Roundup (glyphosate).

8.7 Effets de xénobiotiques sur les marqueurs d'immunocompétence étudiés

Dans l'ensemble du projet, j'ai cherché à induire une modulation des marqueurs d'immunocompétence avec divers xénobiotiques pour (i) valider la méthodologie, (ii) établir des relations doses-réponses, (iii) étudier la capacité d'acclimatation, de résilience ou de compensation dans le temps selon les concentrations d'exposition. Les diverses études avaient un degré variable de réalité environnementale en termes de concentrations et de durée d'exposition aux contaminants. La comparaison des traits immunitaires et d'autres traits de vie avait pour but de déterminer s'il est possible de détecter une altération de l'état de santé des organismes de manière précoce, et donc s'il existe une rapidité de réponse des immunomarqueurs et une précocité en terme de fonction physiologique altérée.

Les marqueurs n'ont pas été beaucoup modulés car (i) les molécules testées sont finalement peu immunotoxiques sur ce gastéropode pour diverses raisons (toxicologiques ou pharmacologiques) et (ii) les populations évaluées pouvaient être plus ou moins résistantes. Je reste un peu frustré car les faibles effets toxiques (survie, reproduction) ou immunotoxiques induits laissent plusieurs questionnements ouverts. En revanche, l'ensemble de ces

expériences permet de fournir de solides éléments de connaissance et de réflexions pour poursuivre les investigations et les questionnements relatifs à la pertinence d'utilisation de marqueurs d'immunocompétence chez *L. stagnalis* dans un contexte écotoxicologique.

Un diagramme récapitulatif des différents scénarios de résultats d'expérience avec les possibles conclusions sur les marqueurs d'immunocompétence est présenté en annexe H. Ce diagramme permet d'orienter le raisonnement sur les questions amenées. Le tableau 8.3 (p. 388) récapitule les tendances observées sur la mesure des marqueurs d'immunocompétence après avoir exposé les organismes aux divers contaminants utilisés dans les expériences réalisées.

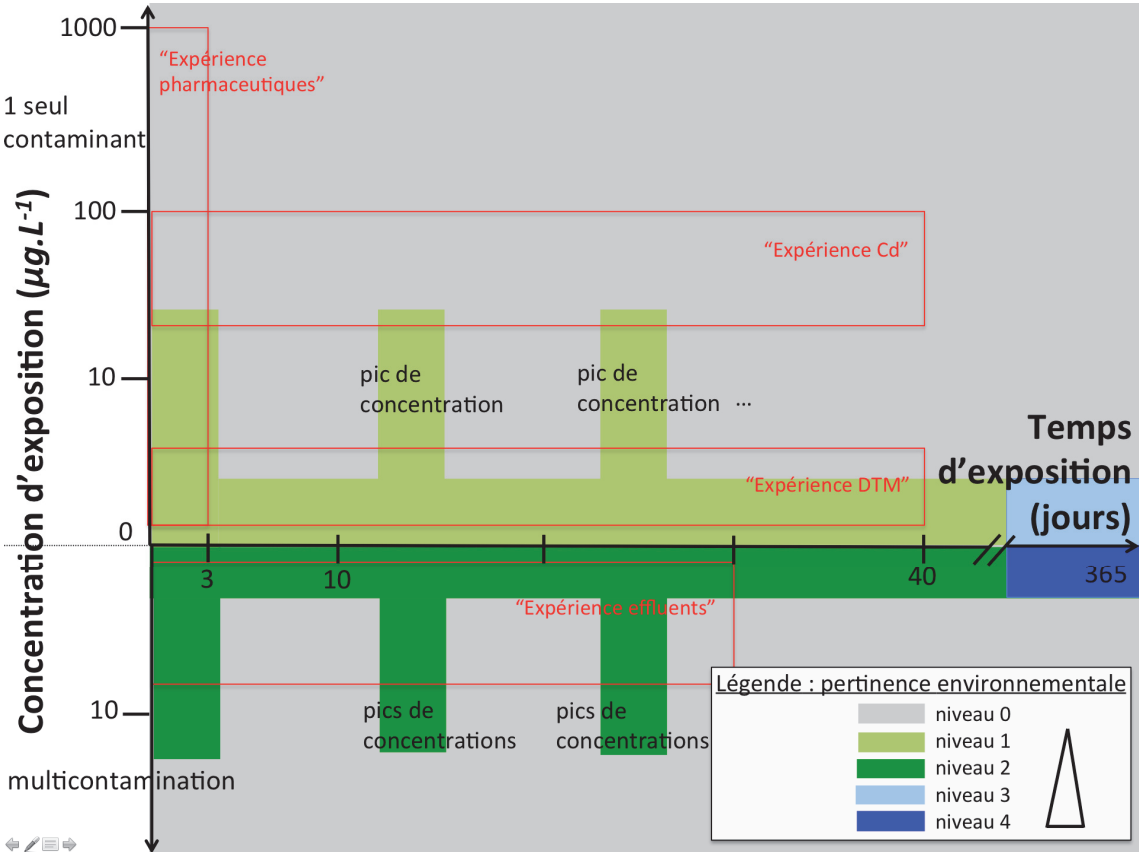


FIGURE 8.6 – Vue d'ensemble des expériences de ce manuscrit selon une représentation schématique des degrés de pertinence environnementales

8.7.1 Sensibilité (effet des concentrations)

Avec l'ensemble des marqueurs d'immunocompétence de l'approche multibiomarqueurs évaluée dans ce manuscrit, une faible **sensibilité** de réponse vis-à-vis des **concentrations** de contaminants testées a été observée. Les marqueurs sublétaux à des concentrations plus élevées que la réalité environnementale peuvent ne pas être modulés car le contaminant est de toute manière très peu toxique pour *L. stagnalis*. C'est le cas de l'expérience avec le Cadmium où il semble que ce contaminant ne soit pas un bon cas d'étude avec *L. stagnalis*, bien que les protocoles OCDE aient été validés avec celui-ci. Nous avions hésité à augmenter les concentrations pour le Cd et pour la DTM mais nous ne jugions pas environnementalement pertinent d'augmenter les concentrations d'exposition en Cd, déjà très élevées et beaucoup plus que la réalité environnementale (voir figure 8.6, p. 385). Rétrospectivement, je pense qu'il eut été pertinent d'augmenter les concentrations afin de mieux répondre aux questions sur la précocité physiologique discutée ci-après. Par ailleurs, le zinc, le cuivre ou le pesticide vinclozoline seraient à considérer pour de futures utilisations d'un contaminant de référence pour lequel *L. stagnalis* est particulièrement sensible. J'avais également pré-sélectionné un molluscicide. Après concertation, le fait d'étudier la toxicité d'un molluscicide envers un mollusque nous semblait être d'une valeur-ajoutée réduite dans l'amélioration de la compréhension des toxicités de produits chimiques.

En dépit de ces remarques, plusieurs concentrations testées étaient très élevées, et démesurémment plus élevées que leur réelle occurrence dans les milieux aquatiques : Etoposide (100-1000 $\mu g.L^{-1}$), Cyclophosphamide (100-1000 $\mu g.L^{-1}$), Cyclosporine A (100-1000 $\mu g.L^{-1}$), Diclofenac (100-1000 $\mu g.L^{-1}$), Cadmium (15-80 $\mu g.L^{-1}$) et les effluents de STEP 100% (facteur de dilution$>$ 1 : 500 en aval de la STEP). Seul l'Etoposide a induit une immunosuppression à des concentrations élevées et un phénomène d'hormèse est apparu puisqu'à des concentrations plus faibles (1-10 $\mu g.L^{-1}$), les densités hémocytaires étaient plus élevées que les témoins. Une réponse inflammatoire (immunostimulation) est survenue lors de l'exposition au diclofenac (densité et viabilité hémocytaire, phagocytose et activité oxydative) mais les concentrations étaient élevées.

À des concentrations environnementales (0.1 — 10 $\mu g.L^{-1}$), seule l'activité non-spécifique phénol-oxydase a été augmentée avec une tendance dose-réponse lors de l'exposition au pesticide DTM. Les autres contaminants ont faiblement modulé les immunomarqueurs, y compris à de fortes concentrations comme en témoigne l'expérience avec le cadmium. La cyclosporine A a induit une cytotoxicité hémocytaire à des concentrations nominales de 1000 $\mu g.L^{-1}$. L'anti-cancéreux cyclosphophamide n'a pas induit d'effet significatif sur les marqueurs d'immunocompétence. Il semble donc que ces marqueurs sublétaux soient globalement faiblement sensibles à l'exposition aux contaminants (voir les récapitulatifs avec le tableau 8.3, p. 388). Ce ne sont donc pas des biomarqueurs d'exposition pertinents. Cette remarque est en cohérence avec les études de Russo & Madec [2007] où l'immunotoxicité de l'herbicide fomesafen était indépendante de la concentration entre 10 et 270 $\mu g.L^{-1}$, au même titre que l'atrazine qui a induit une immunotoxicité indépendante de la concentration allant de 10 à 100 $\mu g.L^{-1}$ [Russo & Lagadic, 2004].

Tableau 8.3 – Récapitulatif des tendances de marqueurs d'immunocompétence lors d'expositions à des contaminants environnementaux

expérience	polluant	concentrations ($\mu g.L^{-1}$)	densité hémocytaire	viabilité hémocytaire	Temps (jours)
article 4 « Etoposide »	Etoposide	1 — 10	↑↑	=	j3
		100 — 1000	↓↓↓		
article 5 « Pharmaceuticals »	DC	1	=	=	j3
	CSA	1 — 100	=	=	j3
	CP	1—1000	=	=	j3
article 6 « Deltaméthrine »	DTM	0.1 — 10	=	=*	j0 — j44
article 7 « Cadmium »	Cd	30 — 60	=	=	j0 — j40
		120	=	↓	
article 8 « Feyssine »	effluents de STEP	12.5%	↑ (↑)	=	j0 — j29
		100%	↑ (↑)	=	

expérience	polluant	concentrations ($\mu g.L^{-1}$)	AO basal	AO zymosan	Temps (jours)
article 4 « Etoposide »	Etoposide	—	—	—	—
		—	—	—	—
article 5 « Pharmaceuticals »	DC	1000	=	↑	j3
	CSA	10	=	↓	j3
		1000	=	↓	j3
	CP	1000	=	↓	j3
article 6 « Deltaméthrine »	DTM	0.1	= et =	↑ et =	j2 et j21
		1	= et =	↓ et =	
		10	= et =	↓ et ↓↓	
article 7 « Cadmium »	Cd	30	= et =	= et =	j3 et j20
		61—122	= et =	↓ et =	
article 8 « Feyssine »	effluents de STEP	12.5%	= et =	= et ↑	j3 et j29
		100%	= et =	= et ↑	

expérience	polluant	concentrations ($\mu g.L^{-1}$)	phagocytose	PO	Temps (jours)
article 4 « Etoposide »	Etoposide	1 — 1000	=	—	j3
article 5 « Pharmaceuticals »	DC	10	↑	—	j3
		100	↑↑	—	j3
	CSA	1—1000	=	—	j3
	CP	1—1000	↓	—	
article 6 « Deltaméthrine »	DTM	0.1	= (j44)	↑ (j9)	
		1	↑ (j44)	= (j9)	
		10	= (j44)	↑↑ (j9)	
article 7 « Cadmium »	Cd	15	↓ (j30)	(j10 et j40) = et ↑	
		30	↓ (j30)	= et =	
		61	↓↓ (j30)	↑ et =	
		122	↓ (j30)	↓ et ↓	
article 8 « Feyssine »	effluents de STEP	12.5%	= (j29)	↑ (j10)	
		100%	↓ (j29)	↑ (j10)	

Unités : densité hémocytaire (cellules/μl), viabilité (% d'hémocytes viables), phagocytose (% d'hémocytes ayant phagocyté au moins une bille), PO (phénol-oxydase, unités relatives ($.10^{-3}$)), AO (activité oxydative, $\log_{10}$[fmol de $DCF.min.\mu l^{-1}$]). **Légende** : = : absence d'effet ; ↑ et ↓ : effet suspecté (t-value = |1.6-1.99|) ; ↑↑ et ↓↓ : effet avéré (t-value >|2|) ; ↑↑↑ et ↓ . ↓↓ : effet très marqué.

8.7.2 Rapidité de réponse

Encore une fois, la sémantique doit être justifiée. Les notions d'expositions de courtes et longues durées sont relatives à chaque organisme testé en fonction de son cycle et de son temps de vie. En toxicologie, l'OCDE mentionne :

« *The division between* ***subchronic*** *and* ***chronic*** *dosing regimes is sometimes taken as 10 per cent of the test animal' lifespan. Dosing period lying between the single dose and 10 per cent of lifespan are often called* ***subacute****. It was considered that this term was semantically incorrect and, therefore, to distinguish such dosing periods from the classical subchronic they may be described as "****short-term repeated dose studies****"* » *[for the Testing of Chemicals, 2006].*

Le tableau 8.4 donne quelques exemples des temps de tests recommandés, leur appellation et le ratio de temps par rapport à la durée de vie des organismes. Pour les expériences de la DTM (44 jours) et du Cadmium (40 jours), il me semble approprié de parler d'expositions de moyennes durées ou subchroniques plutôt que d'expositions de longues durées ou chroniques. En effet, le temps de vie de *L. stagnalis* en laboratoire (selon les conditions détaillées dans le chapitre 2) est d'environ 1 an et donc la durée des expositions réalisées représentait environ 11% de leur cycle de vie complet.

Tableau 8.4 – Quelques exemples de tests OCDE

organisme	**appellation**	**durée**	**référence du test OCDE**	**ratio sur le temps de vie complet**
poisson facile d'utilisation ("ready availability throughout the year", e.g. *Brachydanio rerio*, *Pimephelas promelas*, *Cyprinus carpio*, *Poecilia reticulata*, *Oncorhynchus mykiss*)	"Fish, Acute Toxicity Test"	96h	Test No. 203	<<0.1
Pimephelas promelas, Japanese medaka, zabrafish	"Fish Short-term Reproduction Assay"	21 jours	Test No. 229	<0.1
Lymnaea stagnalis	"Reproduction test"	28 jours	Test No. 243	<0.1
Potamopyrgus antipodarum	"Reproduction test"	28 jours	Test No. 242	<0.1

Des expositions de courtes (3 jours) et moyennes durées (29 — 44 jours) ont été réalisées avec un suivi individuel et répété dans le temps, excepté pour les expositions de 3 jours. Au regard des résultats de ce manuscrit, il ne peut pas être affirmé que les modulations des biomarqueurs immunitaires observés à court terme sont exacerbées lorsqu'une plus longue

durée d'exposition était appliquée. Ceci est étonnant car plusieurs études reportent des effets immunotoxiques assez marqués avec des effets exacerbés par le temps d'exposition [Russo & Lagadic, 2004; Russo *et al.* , 2007; Russo & Madec, 2007; Russo *et al.* , 2008, 2009; Gust *et al.* , 2013b]. Par exemple, Russo *et al.* [2007] ont observé que des temps d'expositions plus élevés (24h, 96h et 504h c'est-à-dire 21 jours) à l'herbicide fomesafen ont induit des immunotoxicités considérablement plus marquées. La même année Russo & Madec [2007] ont montré que le fomasafen stimule la densité hémocytaire de *L. stagnalis* en phase aiguë (24h-96h) puis cela est moins marqué après 21 jours d'exposition, ce qui suggère un phénomène de régulation physiologique. De même, Russo & Lagadic [2004] avaient observé une forte augmentation des densités hémocytaires après 96h d'exposition au pesticide fomesafen, alors que des expositions plus longues menaient à un retour des valeurs vers le niveau basal.

Dans les expériences de cette thèse, il existe un effet temporel mais souvent assez subtil. L'effet temporel de variation des marqueurs d'immunocompétence est parfois indépendant de la contamination et parfois attribuable à la contamination. Par exemple, dans l'expérience d'exposition à la DTM, la réduction de l'activité oxydative immunocompétente pour le groupe DTM 10 $\mu g.L^{-1}$ est significative pour le jour 21 seulement, bien que des débuts de modulations soient suspectées au jour 2. Concernant l'activité oxydative immunocompétente de l'expérience sur les effluents de STEP, celle-ci est plus élevée (t-value |1.6-1.99|) pour les groupes exposés aux effluents au jour 29, alors qu'au jour 3 aucune tendance n'est suspectée. Dans l'expérience avec le Cadmium, une augmentation significative de la viabilité hémocytaire est observée aux jours 10 et 20 puis une diminution significative aux jours suivants, bien que ces variations soient statistiquement indépendantes de la contamination au cadmium. Pour l'expérience d'exposition aux effluents de STEP, une augmentation significative de la densité hémocytaire apparait pour le groupe « effluents 100% » au jour 29, alors qu'aux jours 3 et 10 les différences ne sont pas significatives. Ces deux dernières remarques viennent de l'analyse statistique qui consiste à coder la variable « jour » comme qualitative. Lorsque la variable « jour » est codée comme quantitative, alors les résultats des effets statistiques correspondent à des effets globaux sur l'ensemble de la période considérée. Par ailleurs, comme mentionné dans le chapitre 1, une difficulté en immunotoxicologie environnementale concerne les possibles phénomènes

d'*hemocytopenia* (*i.e.*, chute brutale mais transitoire des ressources hémocytaires), dont les probabilités d'occurrence me semblent plus élevées lors des premières phases d'exposition avec une régulation (*e.g.,* compensation physiologique) ultérieure lors d'expositions plus prolongées (voir figure 8.7, p. 392).

L'exposition aux effluents de stations d'épuration n'a pas induit d'effets immunotoxiques. Ces effluents n'étaient pourtant pas dilués (100%) alors qu'en milieu naturel ils le sont. Les multistress, en termes de micropolluants et microbes, étaient donc augmentés par rapport à un scénario réaliste. La pollution des milieux aquatiques par les effluents de STEP en zone urbaine représente une part importante de la micropollution chimique à laquelle la biocénose doit faire face, et l'étude réalisée montre que des effets sous-jacents sont fortement suspectés mais pas démontrés. De nombreux marqueurs d'immunocompétence sont modulés et l'analyse statistique montre que les tendances sont à la limite des seuils de significativité. Cela laisse penser que les modulations des marqueurs d'immunocompétence sont souvent très subtiles. Pour aller plus loin il faudrait faire des expositions de plus longue durée.

En définitive, il a été observé qu'il existe un effet du temps d'exposition aux xénobiotiques car des expositions de courte durée peuvent moduler les immunomarqueurs, alors que des expositions de plus longue durée ne se traduisent pas nécessairement en des effets plus marqués. Il peut être suggéré qu'il existe une rapidité de réponse des immunomarqueurs (effets aigus des xénobiotiques) qui sont compensés sur un plus long terme lorsque les effets ne sont pas extrêmes ou ne franchissent pas de « point de non-retour » (*e.g.,* immunosuppression). Ces phénomènes de compensations peuvent représenter un coût énergétique important pour les organismes avec des effets sur d'autres traits d'histoire de vie sur le très long terme. Il serait nécessaire de réaliser des expositions de plus longue durée, par exemple de 6 mois (approximativement 50% du cycle de vie complet de *L. stagnalis* en laboratoire) afin de mieux comprendre la pertinence d'évaluation de marqueurs d'immunocompétence en écotoxicologie.

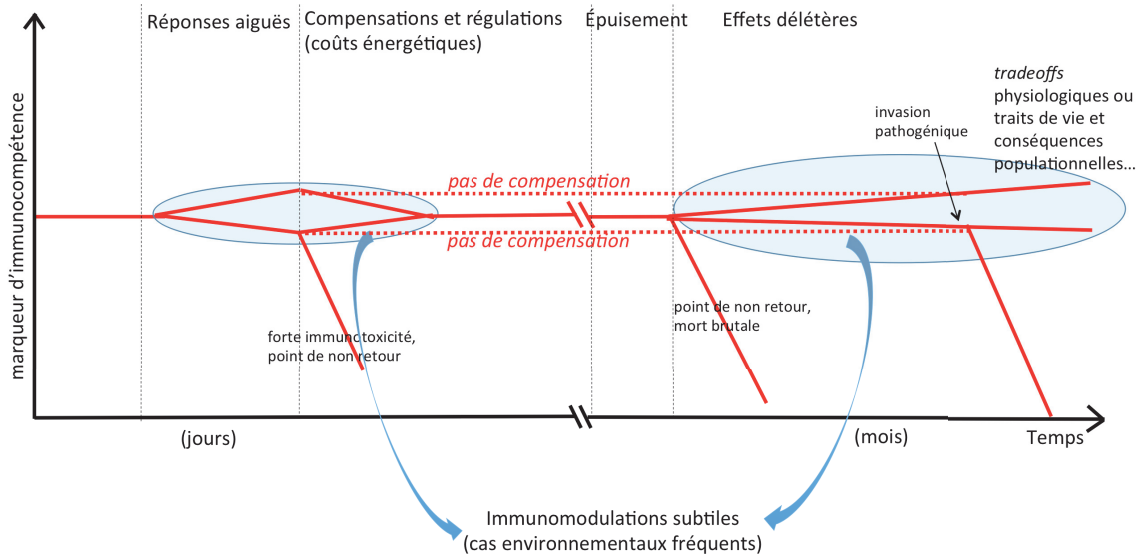


FIGURE 8.7 – Représentation schématique des modulations de marqueurs d'immunocompétence dans un contexte de contamination environnementale réaliste : subtilités, compensations et *trade-offs*

8.7.3 Précocité physiologique

La caractérisation de la spécificité immunotoxique d'un xénobiotique (voir fig. 4.1, p. 195) va dépendre en grande partie de la concentration efficace, de la rapidité d'induction de l'effet et de la précocité de l'effet sur le système immunitaire par rapport à d'autres fonctions physiologiques. Ainsi, les phénomènes de narcose s'opposent à la survenue d'effets spécifiquement immunotoxiques.

Il existe de toute évidence un gradient de spécificité entre, par exemple :

- Une substance qui va altérer le système immunitaire de manière rapide, à faible concentration et avant toute perturbation sur d'autres fonctions physiologiques
- Une substance qui va induire des perturbations multiples (*e.g.,* néphrotoxicité, hépatotoxicité, neurotoxicité, immunotoxicité), après plusieurs jours et à des doses plus élevées que la réalité environnementale. Par exemple, le cadmium est reprotoxique pour *L. stagnalis* mais cela intervient aux concentrations toxiques en terme de survie des organismes, donc le cadmium présente une faible spécificité reprotoxique chez *L. stagnalis* tout comme il semble présenter une faible immunotoxicité spécifique car son spectre toxique est large.
- Une substance qui va induire une toxicité à très forte concentration mais dont la toxicité dépendra en majorité des propriétés physico-chimiques de la molécule testée (*e.g.,* phénomène de narcose et polarité ou lipophilie)

Comme discuté à la page 371, l'intérêt d'évaluer s'il existe une précocité d'altération du système immunitaire induite par un xénobiotique réside dans (i) la caractérisation du mécanisme d'action du xénobiotique (*e.g.,* spécifiquement immunotoxique) et (ii) la possibilité de détecter une altération précoce de l'état de santé général de l'organisme lorsque les effets sont peu spécifiques (*e.g.,* concentration élevées requises pour observer des effets). Dans l'environnement, l'exposition à de multiples contaminants et échantillons complexes rend les effets toxiques assez globaux (multiples), et c'est dans ce contexte qu'il est pertinent de déterminer si l'évaluation des marqueurs d'immunocompétence pourrait servir de signaux précoces « d'alerte » avant que n'apparaissent des effets plus marqués sur le système immunitaire, sur d'autres fonctions physiologiques ou sur d'autres traits de vie (voir fig. 8.8, p. 393).

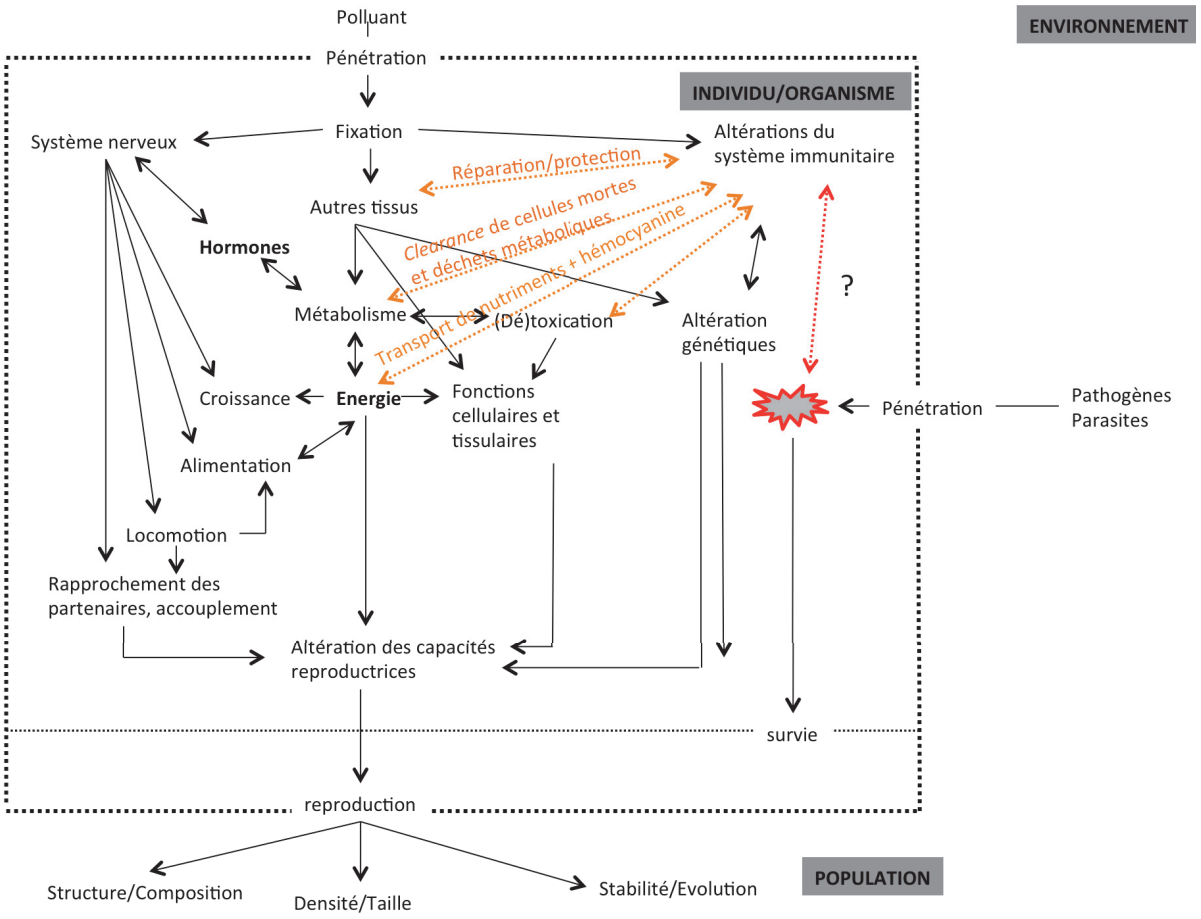


FIGURE 8.8 – Polluants, système immunitaire, traits de vie et spéciations (schéma modifié de Caquet et Lagadic, 1998)

Les expériences de ce manuscrit ne permettent pas de conclure de manière définitive sur la précocité d'altération des marqueurs d'immunocompétence évalués par rapport à d'autres fonctions physiologiques telles que la reproduction ou d'autres traits de vie (taux

d'alimentation, survie ou prise de masse). Je tiens à souligner que l'absence de conclusion concernant la précocité physiologique d'une altération immunitaire induite par des contaminants n'est évidemment pas la preuve d'une absence de précocité. L'annexe H permet d'étayer le raisonnement et au regard des expériences, la conclusion est une « non-conclusion ». Aucune exposition n'a induit d'effets importants sur les traits de vie évalués et aucun marqueur d'immunocompétence évalué en parallèle n'a été très fortement impacté. Cependant, quelques modulations ont été détectées et elles vont tout de même dans le sens d'une précocité physiologique de réponse.

L'expérience avec la DTM avait été conçue pour acquérir des éléments de connaissance sur la précocité de modulation des marqueurs d'immunocompétence par rapport à d'autres traits de vie faiblement impactés par la DTM car celle-ci est décrite comme induisant de nombreux effets immunotoxiques chez les vertébrés. La modulation des traits de vie (reproduction, alimentation, survie) ne peut pas être attribuée à la DTM mais certains traits immunitaires fonctionnels ont été modulés par le contaminant, bien que faiblement. Ainsi, cette étude suggère une certaine précocité de réponse des immunomarqueurs mais elle n'est pas suffisante pour conclure sur la précocité globale car (i) la DTM a été choisie pour sa spécificité immunotoxique connue chez les vertébrés, (ii) les effets immunitaires induits sont faibles, (iii) les différences avec les autres traits de vie ne peuvent pas être attribuées à la présence de DTM et donc la précocité d'altération physiologique par les contaminants ne peut être clairemment établie.

Par la suite, l'expérience avec le Cd a été menée car (i) le Cd est un contaminant avec un spectre toxique très large et n'est donc pas spécifiquement immunotoxique et (ii) un protocole de reprotoxicité OCDE a été validé avec du Cd et une comparaison de précocité de réponse entre des traits immunitaires et des traits de reproduction était visée. A la différence de l'expérience avec la DTM, le Cd a été utilisé à des concentrations beaucoup plus élevées que la réalité d'occurrence environnementale. En revanche, l'issue de l'expérience avec le Cd est similaire à celle de la DTM dans la mesure où (i) aucune différence entre les traits de vie non immunitaires ne peut être imputée à la présence de Cd, (ii) les traits immunitaires n'ont pas été fortement affectés mais des effets subtils ont été détectés. Pour rappel, les différences avec l'expérience de la DTM concernent la population utilisée, les conditions d'exposition (semi-statiques), le spectre toxique du contaminant (large spectre toxique ou toxicité peu spécifique pour le Cd) et les mesures d'accumulation du contami-

nant dans les viscères qui ont été réalisées pour le Cd. Cette étude montre qu'une forte accumulation du Cd dans les tissus biologiques de *L. stagnalis* ne se traduit pas nécessairement par des effets immunotoxiques très marqués. Une recherche approfondie dans la littérature confirme, de manière générale, le faible caractère immunotoxique du Cd sur les mollusques aquatiques car plusieurs articles reportent une immunotoxicité à des concentrations très élevées (voir chapitre 7). Néanmoins, il semble important de garder à l'esprit que des effets immunitaires subtils peuvent mener à des situations désastreuses à l'échelle des populations dès lors que l'on se place dans un contexte d'exposition de très longue durée (prédisposition aux agents infectieux).

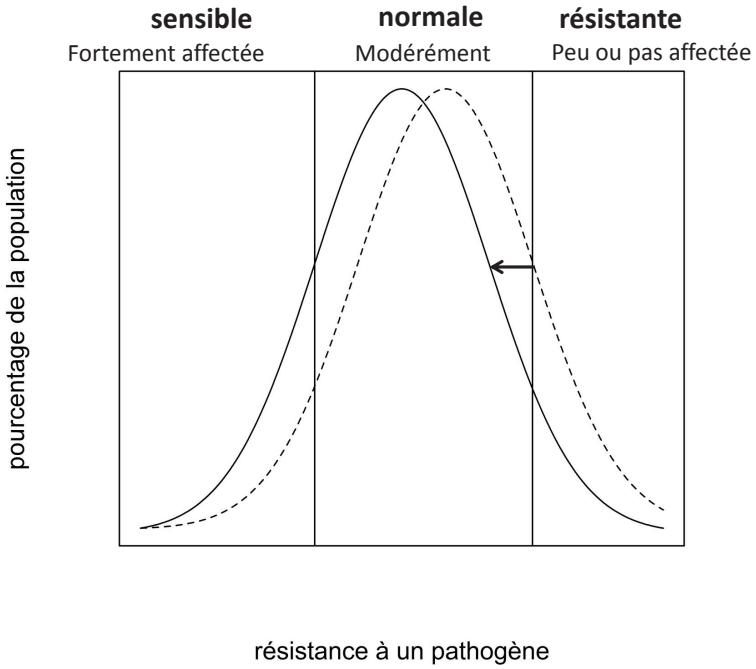


FIGURE 8.9 – Résistance à un pathogène selon Brousseau *et al.* [2012]
Déplacement d'une résistance normale (avec une distribution normale) à un pathogène dans une population après exposition à un stress immunotoxique. La population exposée (ligne continue) présentera un risque plus important de développer des signes cliniques et maladies par comparaison à la population non-exposée (ligne en pointillés).

Leicht *et al.* [2013] ont observé que lorsque *L. stagnalis* était soumis à une courte vague de chaleur (< 7 jours), les traits de vie (croissance, reproduction) étaient accélérés alors que les traits immunitaires n'étaient pas modulés significativement. En revanche, lors d'une vague de chaleur plus prolongée (> 7 jours), l'accélération de la croissance et de la reproduction n'était plus significative, mais les traits immunitaires étaient considérablement réduits. Ceci suggère que seules des expositions de moyenne-longue durée à des hausses

de température peuvent causer une prédisposition à l'infection parasitaire/bactérienne des organismes. Les hausses de températures induisent des changements de reproduction dans un premier temps, puis ces changements s'estompent et des changements sur les traits immunitaires apparaissent dans un second temps. Cela indique que face à une contrainte environnementale, la croissance et la reproduction sont modifiées d'abord et les traits immunitaires ensuite, ce qui infirme — dans cette étude — la précocité de réponse d'altération des paramètres immunitaires dans ce cas précis de stress thermique. En revanche, puisqu'il y a une plasticité adaptative et que l'accélération de croissance n'est plus significative dans un second temps, seule l'analyse des traits immunitaires rend tangible l'information d'une altération physiologique en réponse à un stress environnemental. Ainsi, cette étude montre que les traits immunitaires ne sont pas des indicateurs précoces d'altération physiologique par rapport à des paramètres de reproduction ou de croissance dans une première phase de stress, mais ce sont des indicateurs d'altération physiologique (sublétaux) lors de stress thermiques plus prolongés, contrairement à la reproduction et la croissance. **Des valeurs faibles de traits immunitaires indiquent que les organismes sont en mauvaise santé et prédisposés à une maladie infectieuse**.

La plasticité phénotypique adaptative de *L. stagnalis* se traduit par un remodelage de ses traits de vie afin de maximiser sa *fitness*. La réalité environnementale étant telle que les organismes sont soumis à de multiples stress, il serait intéressant de faire une expérience de mesure des traits immunitaires et autres traits de vie en soumettant les organismes à (i) un stress chimique (xénobiotique), (ii) un stress de température, (iii) un stress microbiotique (*e.g., challenge* bactérien) et (iv) un stress de prédation. Cela permettrait d'acquérir des éléments de compréhension supplémentaires sur l'effet potentiellement additif de plusieurs facteurs sur le système immunitaire ou l'effet immunotoxique de certains facteurs qui se manifestent uniquement dans un contexte multistress (plus de 2 stress de nature différentes). Avec les groupes témoins appropriés, la part du facteur « stress du xénobiotique » pourrait être mieux comprise dans un tel contexte multistress.

Sandland & Carmosini [2006] ont observé que des gastéropodes d'eau douce (*Physa girina*) soumis à un stress chimique de type pesticide (atrazine, 100 $\mu g.L^{-1}$, 4 jours) avaient des densités hémocytaires considérablement plus élevées que les témoins. Les organismes

soumis à un stress de prédation avaient une densité hémocytaire plus élevée que les témoins mais moins élevée que les organismes soumis uniquement à l'atrazine. Enfin, les organismes soumis au double stress chimique et de prédation avaient des densités hémocytaires similaires à ceux ayant subi un stress unique de prédation. La suite de l'expérience (8 semaines) s'est focalisée sur d'autres traits de vie (reproduction et survie) et a révélé des altérations subtiles de ceux-ci pour les groupes soumis aux divers stress. Cela suggère que l'observation de réponse immunitaire aiguë peut être annonciatrice précoce d'altérations subtiles d'autres fonctions physiologiques ou traits de vie lors d'expositions de longue durée et donc ces évaluations sont complémentaires afin de mieux comprendre l'impact des différents stress, notamment xénobiotiques, sur les organismes.

Hermann *et al.* [2013] ont fourni des preuves de l'implication du système immunitaire dans la détérioration des performances d'apprentissage et de mémorisation chez *L. stagnalis*. Ils soulignent le fait que *L. stagnalis* est un modèle très intéressant pour étudier les effets du système immunitaire inné sur le système nerveux. Les paramètres comportementaux liés au système nerveux peuvent souvent être considérés comme des traits d'histoire de vie essentiels car ils vont déterminer la *fitness* des organismes en milieu naturel : apprentissage, mémorisation, recherche de nourriture, accouplement, prédation. Cette étude de Hermann *et al.* [2013] tend donc à suggérer qu'une induction artificielle pro-inflammatoire peut avoir des conséquences sur le comportement des organismes. Ce pourrait être le cas avec certains xénobiotiques comme par exemple avec le diclofenac ou d'autres produits pharmaceutiques retrouvés dans les cours d'eau. De fortes interactions (*feedback* négatifs) entre les deux systèmes physiologiques pourraient survenir (système immunitaire $\leftrightarrow$ système nerveux). Des essais d'indicateurs de toxicité sur le SNC comme par exemple l'inhibition de l'acetyl cholisnesterase ont été développés et utilisés pour étudier la toxicité de pesticides chez *L. stagnalis* [Tufi *et al.* , 2016]. Ainsi, il serait intéressant de coupler de telles approches avec l'étude de traits immunitaires dans un contexte de multicontamination environnementale réaliste en termes de concentrations et de durées d'expositions.

Enfin, comme discuté par Brousseau *et al.* [2012], l'étude d'immunomarqueurs est particulièrement pertinente dans un contexte d'intégration d'effets toxiques à plusieurs niveaux biologiques (molécule–cellule–individu–population). Des épidémies importantes

peuvent survenir si une diminution de la résistance à une invasion de pathogènes survient au sein d'une population à la suite d'une diminution (subtile ou plus marquée) de leur immunocompétence en lien avec une pression chimique immunotoxique (voir figure 8.9, p. 395).

8.7.4 Spécificité immunotoxique trans-phylum

Un des objectifs de ce travail était de déterminer s'il est possible de transposer des effets immunotoxiques de certains xénobiotiques (produits pharmaceutiques et deltaméthrine) entre les espèces, notamment apparteneant au phylum des *chordata* et *L. stagnalis* en tant que *mollusca*. Il peut exister un effet toxique d'un xénobiotique qui s'exprimera spécifiquement sur une espèce mais pas sur une autre (voir, par exemple, la notion de *species-specific effect* au sens de Brodin *et al.* [2014]). La caractérisation de l'immunotoxicité d'une substance peut être envisagée selon sa spécificité immunotoxique (sensibilité, rapidité et précocité physiologique) sur plusieurs phylum ou embranchements (voir la fig. 4.1, 195.

Les produits pharmaceutiques connus pour intéragir spécifiquemement avec le système immunitaire de vertébrés, en particulier les humains, ont très souvent eu une interaction avec le système immunitaire de *L. stagnalis*, mais les effets ne sont pas systématiquement très forts. Pour la plupart, il semble délicat de parler de réelle spécificité immunotoxique. L'exposition à de très fortes concentrations, dites thérapeutiques (vraisemblablement une surdose pour un gastéropode) n'induit pas systématiquement d'immunotoxicité chez *L. stagnalis* sur de courtes durées. Nous pouvons néanmoins nous questionner sur la biodisponibilité des molécules, les voies d'entrées dans les gastéropodes (*e.g.,* cutanée, orale via la nourriture) et les concentrations dans l'hémolymphe circulante. Seul l'Etoposide — connu comme puissant immunosuppresseur chez les humains — a induit une immunosuppression chez *L. stagnalis*. En revanche, le cyclophosphamide qui est un promédicament n'a pas induit d'effets très marqués, y compris à des concentrations dites thérapeutiques (100-1000 $\mu g.L^{-1}$). Cela rappelle la nécessité d'étudier les métabolites pertinents pour évaluer le potentiel toxique (immunotoxique notamment) des médicaments chez les invertébrés car leurs voies métaboliques de biotransformation sont largement différentes de celles des vertébrés. Une immunotoxicité a été détectée pour la cyclosporine A mais cela unique-

ment concernant la viabilité hémocytaire à des concentrations nominales d'exposition de 1000 $\mu g.L^{-1}$. La réalité environnementale de ce genre d'exposition est faible. De surcroît, les informations sur les concentrations d'exposition manquent pour justifier du caractère préoccupant de ce médicament dans l'environnement. Par contre, le diclofénac (DC) est largement retrouvé dans l'environnement. Il a été observé que le DC induit une modulation des marqueurs d'immunocompétence après une courte exposition à des concentrations de 10—1000 $\mu g.L^{-1}$. Cette immunomodulation correspond à une augmentation des valeurs des marqueurs d'immunocompétence (densité hémocytaire et capacité de phagocytose). Comme cela a déjà été mentionné, une immunomodulation de type immunostimulation peut induire des effets néfastes graves pour l'intégrité des organismes et populations sur le très long terme (*trade-offs*).

Des essais d'exposition au DC sur une plus longue période (environ deux mois) ont été tentés. Malheureusement, la mauvaise acclimatation des organismes à l'eau du laboratoire a rendu l'analyse impossible en raison d'une trop forte mortalité (voir annexe G.2 pour les deux essais). Deux remarques peuvent néanmoins être faites sur ces expériences. (i) Une forte diminution des valeurs des marqueurs d'immunocompétence a été mesurée et cela est concomitant à la diminution de la survie des organismes. Cela rappelle le fait que les marqueurs d'immunocompétence sont des biomarqueurs d'état de santé et qu'une forte baisse (*i.e.*, immunosuppression) témoige de la morbidité d'un organisme ou de sa mortalité imminente. (ii) Cette mortalité excessive était similaire dans toutes les conditions, y compris les témoins, et il ne semble donc pas que le DC ait affecté la survie des organismes.

L'expérience sur la deltaméthrine a montré que ce pesticide est faiblement immunotoxique pour *L. stagnalis* et que la transposition d'effets de xénobiotiques immunotoxiques avérés pour les vertébrés (*e.g.,* humains, rongeurs) ne peut donc pas être faite directement sur les gastéropodes. Encore une fois, les effets immunotoxiques sont très souvent subtils lorsqu'on se place dans un contexte environnemental réaliste [Brousseau *et al.* , 1998a]. C'est ce qui est survenu car des immunomodulations et immunotoxicités subtiles ont été observées. Bien que l'immunocapacité n'ait pas été fortement affectée, des effets sous-jacents sont suspectés. Plusieurs analyses statistiques avec les LMEMs correspondants aux divers marqueurs d'immunocompétences et imputables aux contaminations ont révélé des coefficients de régression dont les valeurs de t étaient de |1.6—1.99|), ce qui est très proche du seuil de significativité statistique [20]. Par ailleurs, l'immunoefficacité a été

20. Il serait peut-être pertinent d'augmenter le nombre d'individus pour pouvoir plus facilement détecter

affectée de manière statistiquement significative concernant l'activité phénol-oxydase non spécifique (augmentation) et l'activité oxydative immunocompétente (diminution).

8.8 Perspectives sur d'autres immunomarqueurs et méthodes

Une approche multibiomarqueurs est souvent préconisée en immunotoxicologie environnementale [Renault, 2011; Brousseau *et al.* , 2012; Auffret *et al.* , 2006]. Comme réalisé par Auffret *et al.* [2004, 2006] avec *Crassostrea gigas* et *Mytillus galloprovincialis*, un traitement des résultats de manière à obtenir un « indice immunotoxique de site » pourrait être appliqué à *L. stagnalis* si son utilisation est incluse dans un projet de gestion environnementale ou d'évaluation de l'état de santé de populations de terrain. Cet indice permet de (i) mettre à profit le caractère multiparamétrique de l'approche dans une démarche intégrative et (ii) de corréler les immunotoxicités éventuelles mises en exergue avec les catégories de niveau de pollution des sites (forte, moyenne, faibles). Comme souvent en écotoxicologie, l'harmonisation des méthodes employées est requise pour améliorer les comparaisons entre études, et l'immunotoxicologie ne déroge pas à la règle. Des efforts et améliorations ont été menés sur ce front [Brousseau *et al.* , 2012]. Cela reste essentiel pour une application à large échelle et les efforts doivent se poursuivre, comme c'est le cas par exemple, avec l'organisation des colloques annuels francophones ***ECOBIM***.

Comme discuté précédemment, pour réellement caractériser le danger immunotoxique des substances il serait nécessaire de se placer dans un contexte d'exposition de longue durée par rapport au temps de vie des organismes (comme pour tout test écotoxicologique). Ceci permettrait par exemple d'améliorer le *scoring* de fiabilité des conclusions d'une étude écotoxicologique (*e.g.,* système de *scoring* de Klimisch *et al.* [1997]). C'est dans ce contexte d'exposition de longue durée que la réalité environnementale prend forme (voir figure 8.6, p. 385). Un système de *scoring* en immunotoxicologie environnementale pourrait être établi selon plusieurs critères comme par exemple (i) la durée d'exposition du contaminant, (ii) la réalité environnementale de la concentration d'exposition, (iii) la mesure chimique des expositions (plutôt que des concentrations nominales) et le *design* (contamination unique vs multicontamination), (iv) l'utilisation de méthodes harmonisées à l'échelle nationale/internationale ou la qualité reconnue des méthodes employées (mesure des immunomarqueurs, analyses statistiques, etc).

des effets immunotoxiques faibles mais significatifs, avec l'emploi des LMEMs.

L'approche multibiomarqueurs utilisée dans ce manuscrit intègre des marqueurs d'immunocompétence assez fréquemment évalués dans le domaine de l'immunotoxicologie environnementale. Les raisons qui ont guidé ce choix ont été expliquées précédemment et portent principalement sur la pertinence des informations obtenues (santé des organismes, immunocompétence), la combinaison de marqueurs fonctionnels et non-fonctionnels, les techniques de mesures, les facilités d'utilisation (application à large échelle, mesures de routine) et la fréquence d'utilisation dans la littérature scientifique afin de pouvoir comparer les résultats. Des essais de développement d'un test NK-cytotoxique ont été réalisés avec les hémocytes de *L. stagnalis*[21] mais ce test n'était pas pratique à réaliser dans l'approche multibiomarqueur mise en place car cela impliquait de cultiver les cellules K562 dans un autre laboratoire et de les rapporter les jours de mesures avec les contraintes de temps intrinsèques aux journées de mesures des marqueurs d'immunocompétence lors des expériences. Ce test reste toutefois pertinent à considérer pour de futures évaluations d'immunocompétence. D'autres essais similaires, sur la capacité des hémocytes à détruire des bactéries, pourraient être développés en cytométrie de flux.

Cette thèse visait à défricher plusieurs aspects autour de l'utilisation de marqueurs d'immunocompétence avec *L. stagnalis* au laboratoire d'écotoxicologie. De toute évidence, un grand nombre d'autres immunomarqueurs seraient pertinents à développer/évaluer dans un contexte écotoxicologique avec *L. stagnalis*. De manière non exhaustive, une liste de paramètres à évaluer dans un contexte éco-immunotoxicologique avec *L. stagnalis* est proposée dans la figure 8.10 (p. 402).

21. Test qui consiste à marquer des cellules K562 (lignée cellulaire humaine issue de cellules myélogènes leucémiques, facilement détruites par les cellules *natural-killer*) avec du DiO (colorant cellulaire, fluorescent et lipophile, souvent utilisé pour marquer les cellules en cytométre de flux) et de les mélanger avec les hémocytes. Les hémocytes vont détruire ces cellules étrangères et donc après un certain temps d'incubation il est possible de suivre la mortalité cellulaire des cellules cibles K562, ce qui reflète la compétence immunitaire des hémocytes à les détruire.

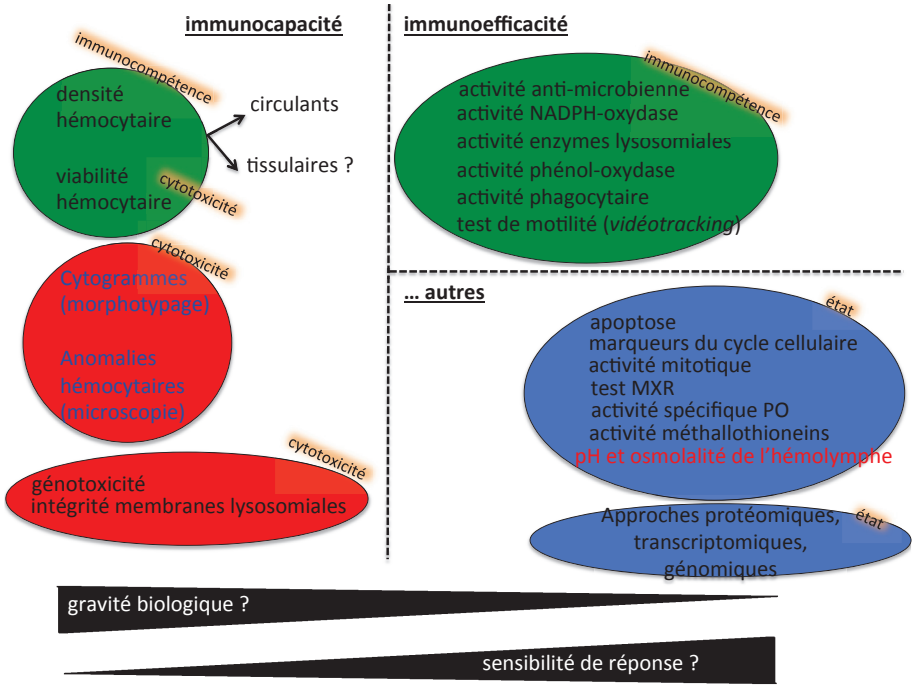


FIGURE 8.10 – Vue d'ensemble des paramètres immunitaires à évaluer/développer chez *L. stagnalis*

Un consortium international de scientifiques s'est formé dans le cadre du projet STAGING [22] dont l'objectif est de fournir un génome de référence de *L. stagnalis*. Ce projet rassemble des scientifiques de domaines variés (*e.g.,* neurophysiologie, écologie, biologie évolutive, écotoxicologie) qui ont le besoin commun de disposer d'une connaissance de grande qualité sur le génome de *L. stagnalis* (assemblage, annotation). Cela est prometteur et offre de belles perspectives de poursuite de travail en immunotoxicologie environnementale avec *L. stagnalis*. Des outils génomiques et éventuellement protéomiques pourraient être développés afin de mieux caractériser l'immunotoxicité des polluants à partir de l'analyse des hémocytes. Des études comparatives entre ces approches et l'utilisation de marqueurs d'immunocompétence pourraient être menées afin de mieux délimiter le domaine et la pertinence d'utilisation de chaque outil selon les objectifs des investigations.

22. **www.france-genomique.org/spip/spip.php?article144**

CONCLUSION

***L. stagnalis* comme modèle en écotoxicologie :**

Les connaissances en zootechnie autour de cette espèce, la réalisation d'élevages avec une démarche qualité et une connaissance des lieux d'abondance en milieu naturel sont des **conditions préalables** nécessaires pour une bonne et facile utilisation de *Lymnaea stagnalis* au sein d'un laboratoire d'écotoxicologie. *L. stagnalis* est une espèce écologiquement pertinente pour les milieux lentiques sur une vaste zone de la planète. C'est une espèce sentinelle de la contamination urbaine (milieux lentiques, mares, hypobenthique, cycle de vie sur plusieurs années). Elle est pratique pour l'évaluation de l'accumulation de xénobiotiques dans les tissus biologiques à une échelle individuelle. Elle bénéficie déjà de plusieurs études et ce modèle est de mieux en mieux compris. Enfin, des tests de reprotoxicité OCDE sont standardisés avec *L. stagnalis*.

***L. stagnalis* comme modèle en immunotoxicologie environnementale :**

La **collecte de l'hémolymphe** peut se faire à l'échelle individuelle par stimulus mécanique du réflexe de rétraction qui engendre l'expulsion de l'hémolymphe de l'animal. Cela permet de réaliser un suivi individuel dans le temps de paramètres immunitaires, ce qui est un avantage considérable pour comprendre l'évolution temporelle de phénomènes d'immunotoxicité en écotoxicologie. Par ailleurs, certaines connaissances immunitaires ont déjà été acquises sur cette espèce dans le cadre d'études menées en parasitologie.

Apports de la thèse sur les connaissances immunologiques chez *L. stagnalis* :

Structure des hémocytes :

L'analyse des hémocytes de *L. stagnalis* en cytométrie de flux selon les paramètres *taille* et *structure* (*i.e.*, FSC, SSC) permet de visualiser des cytogrammes faisant apparaitre trois groupes de points distincts mais néanmoins proches les uns des autres, et les régions correspondantes se chevauchent d'une observation à l'autre. Ceci (i) étaie l'idée de l'existence de **trois sous-populations hémocytaires**, (ii) justifie l'existence d'un **« continuum de différentiation »** ou de maturation et (iii) ne permet pas de quantifier de manière robuste les sous-populations hémocytaires eut égard à ce continuum trop serré entre les groupes de points. L'observation des hémocytes en microscopie photonique a permis de confirmer la faible distinction taille-structure des hémocytes et la présence d'un subtil continuum de différenciation. Par ailleurs, ces observations sont typiques de cellules **agranulocytes neutrophiles**. Les hémocytes sont mono ou **polynucléaires** et cela peut jouer sur le signal SSC acquis en cytométrie de flux (*i.e.*, complexité intracellulaire). Les observations en microscopie électronique à balayage réalisées ont permis de mieux connaitre la microtopographie des hémocytes circulants. Ils sont **ovoïdes ou romboïdes** et peuvent former des **filipodes ou des « structures en forme de voile »**. Les imageries en microscopie électronique à transmission ont permis de mieux décrire l'ultrastucture des hémocytes chez *L. stagnalis*. Ces cellules présentent de nombreux signes d'**activité cellulaire intense** (appareils de Golgi, nombreuses mitochondries, nombreuses vésicules de transport). Des **granules** sont présents mais trop petits pour qualifier les hémocytes de granulocytes. Deux structures particulièrement abondantes ont été décrites : (i) une première structure vésiculaire avec des assemblages de **fibres enchevêtrées** de manière non-organisées par blocs de centaines et (ii) une deuxième **structure massive** et dense, cytosolique ou périnucléaire. La nature et la fonction de ces deux structures nous sont inconnues et cela ouvre des perspectives de recherches car elles pourraient avoir un rôle dans l'immunocompétence des organismes ou être le signe d'un état immunitaire particulier.

Prélèvements répétés :

Les résultats de ce manuscrit confirment le caractère **peu invasif** de la méthode d'échantillonnage de l'hémolymphe, y compris lorsque des **collectes répétées** sont effectuées. Le premier intervalle de temps entre deux collectes doit être d'au moins 48h. L'intervalle doit néanmoins être raisonnablement augmenté au fur et à mesure des collectes afin de s'affranchir de tout effet de prélèvement sur les paramètres fonctionnels et non fonctionnels des hémocytes circulants. Ainsi, un **suivi individuel de paramètres sublétaux** peut être réalisé au cours du temps via l'analyse de ses hémocytes circulants qui informent sur l'immunocompétence des individus.

Approche multibiomarqueurs :

Une batterie de marqueurs d'immunocompétence a été développée avec une analyse exclusive des **hémocytes circulants** de *L. stagnalis*. La combinaison de paramètres **fonctionnels** (activités de phagocytose, phénol-oxydase et oxydative immunocompétente des hémocytes) et **non fonctionnels** (densité et viabilité hémocytaire) permet de construire une approche multimarqueurs nécessaire pour obtenir une vision d'ensemble des immunomodulations induites par les xénobiotiques.

Variabilités hémocytaires :

L'utilisation de **modélisations statistiques avec des effets mixtes** est particulièrement pertinente dans le cadre de collectes répétées dans le temps à l'échelle individuelle. Cela permet de prendre en compte les effets inter-individuels et intra-individuels aléatoires ainsi que de prendre en compte des facteurs fixes, tels que la fréquence de collecte ou un facteur environnemental fixe (*e.g.*, exposition d'un xénobiotique). Il a été observé que les **variabilités intra-individuelles** et **inter-individuelles** de la densité hémocytaire sont de même ordre de grandeur et sur certaines expériences la variabilité intra-individuelle (dans le temps) est plus élevée que la variabilité inter-individuelle. Des différences ont été observées entre les **populations étudiées** sur les valeurs des marqueurs d'immunocompétence. En revanche, les valeurs restent dans un même ordre de grandeur et elles sont cohérentes d'une étude à l'autre, ce qui montre une certaine **stabilité des paramètres immunitaires évalués**. Un effet « population » ne peut être affirmé, ni exclu, car les études n'ont pas été conçues pour répondre à la question. Des **valeurs de référence** peu restrictives ont été proposées pour les marqueurs d'immunocompétence étudiés.

Apports de la thèse sur la connaissance d'effets de xénobiotiques sur les marqueurs d'immunocompétence étudiés chez *L. stagnalis* :

Des expositions de xénobiotiques pharmaceutiques de **courtes durées** ont été réalisées. Ces xénobiotiques ont été choisis selon leur pertinence en terme d'effet thérapeutiques (spécificité d'action) car ce sont des molécules qui interagissent avec le système immunitaire de plusieurs vertébrés (*e.g.*, humains et rongeurs). Les évaluations des marqueurs d'immunocompétence après trois jour d'exposition ont toutes révélé des **immunomodulations**, à l'exception de l'anti-cancéreux Cyclophosphamide. Ainsi, il existe une certaine rapidité de réponse des marqueurs d'immunocompétence face aux contaminants. En revanche, seul l'Etoposide a induit une **immunosuppression** à des concentrations dites thérapeutiques (100-1000 $\mu g.L^{-1}$). Ces études suggèrent (i) que les effets immunomodulateurs/immunotoxiques (sur mammifères) ne sont **pas directement transposables** à des animaux d'autres phylum tels que *L. stagnalis* (les effets sont beaucoup moins marqués) et par extension des mollusques, (ii) l'étude de **métabolites** doit être incluse dans les tests eco-immunotoxicologiques pour mieux comprendre l'impact des xénobiotiques pharmaceutiques sur les espèces invertébrées non-cibles car leurs voies métaboliques (et donc de biotransformation/(dé)toxification) sont largement différentes de celles des vertébrés, (iii) la manifestation d'immunotoxicité induite par les xénobiotiques est **souvent modérée plutôt que fortement marquée**.

Des expositions de **moyenne durée** ont été réalisées avec l'insecticide deltaméthrine, l'*élément-trace métallique* cadmium et des effluents de station d'épuration. Dans l'ensemble, les immunomodulations mesurées sont faibles. L'expérience sur la deltaméthrine suggère une modulation fonctionnelle des hémocytes. L'expérience sur le cadmium suggère une immunotoxicité faible à des concentrations relativement élevées alors que la forte accumulation du Cd dans les viscères a été confirmée. L'exposition d'effluents de stations d'épurations (multicontamination en micropolluants et microbes) a induit globalement une immunostimulation des traits immunitaires. Ces expériences montrent que l'approche évaluée, basée sur des plusieurs marqueurs, est capable de détecter de **faibles modulations physiologiques sublétales** alors que les autres traits de vie tels que les productions d'œufs et la survie ne sont pas suffisamment sensibles. En revanche, les modulations observées restent faibles et souvent à la limite de la significativité statistique.

En définitive :

- La spécificité immunotoxique envers *L. stagnalis* de la plupart des xénobiotiques étudiés est faible et leur toxicité globale est également faible.
- La sensibilité de l'approche multibiomarqueurs d'immunocompétence est faible dans les études de ce manuscrit.
- De courtes expositions peuvent induire des immunomodulations ce qui montre que la réponse des marqueurs d'immunocompétence face à un stress xénobiotique est rapide. En revanche des expositions de plus longues durées n'induisent pas d'immunomodulation ou d'immunotoxicité plus importantes.
- La précocité d'altération des marqueurs d'immunocompétence par des xénobiotiques par rapport à d'autres fonctions physiologiques ou traits de vie n'a pas été clairement démontrée avec l'étude de la deltaméthrine et du cadmium lors d'expositions de 40—44 jours. Dans ces deux études, les marqueurs d'immunocompétence ont tout de même été légèrement impactés sans qu'aucun effet n'ait été mis en évidence sur les autres traits de vie. Ces résultats vont dans le sens de l'idée du caractère d'**alerte précoce** d'une altération des marqueurs d'immunocompétence mais plus d'études sont nécessaires pour clairement le démontrer, avec l'observation d'effets immunotoxiques et reprotoxiques ou de mortalités importantes au cours d'une même expérience (et leur mise en perspective temporelle).

Perspectives principales en termes d'apport sur :

Les connaissances fondamentales :

- Élucider la nature et le rôle des deux ultrastructures inconnues qui ont été observées et décrites.
- Mettre au point une technique de quantification fiable des sous-populations hémocytaires avec l'utilisation de marqueurs membranaires.
- Élucider les processus de renouvellement hémocytaire (hémocytopoïèse et limites).
- Évaluer l'effet des cycles de reproduction, des nitrites et de la qualité de la nourriture comme potentiels **facteurs confondants** pour l'évaluation de marqueurs d'immunocompétence chez *L. stagnalis*.

L'utilisation de *L. stagnalis* en immunotoxicologie environnementale :

Un schéma—bilan est présenté p.410 (fig. 8.11).

1. *Pour caractériser l'immunotoxicité d'un contaminant ou d'un échantillon environnemental* : Il faudrait tout d'abord déterminer des **xénobiotiques immunotoxiques de référence** et les gammes de concentrations pertinentes (*e.g.*, EC50 sur les marqueurs d'immunocompétence), et cela sur une **population d'élevage de référence**. Ensuite, la caractérisation immunotoxique d'une nouvelle substance ou d'un échantillon environnemental pourrait se faire en comparant son effet immunotoxique, sur cette population d'élevage, aux substances immunotoxiques de référence. Pour caractériser l'immunotoxicité d'un échantillon environnemental *in situ*, des **encagements** de la population de référence en amont/aval de sites fortement pollués et le suivi des marqueurs d'immunocompétence pourrait être un *design* expérimental intéressant.
2. *Pour faire du biomonitoring* : Faire un **suivi annuel et pluriannuel de populations autochtones** afin de connaitre l'évolution des valeurs des marqueurs d'immunocompétence selon les saisons et possiblement mettre en exergue des effets de populations et/ou de pollution des milieux sur les marqueurs évalués. Pour évaluer la **susceptibilité immunotoxique de populations de terrain**, il faudrait ramener les organismes au laboratoire et les exposer aux xénobiotiques immunotoxiques de référence mentionnés ci-avant. La comparaison des résultats obtenus avec ceux de la population d'élevage de référence permettrait ainsi de caractériser la susceptibi-

lité immunotoxique de la population. La réalisation d'un ***challenge* bactérien de référence** serait aussi à considérer.

3. *Pour mieux comprendre le caractère d'alerte précoce des marqueurs d'immunocompétence* : Il serait important de continuer la réflexion et les expériences avec (i) une population d'élevage de référence, (ii) des contaminants particulièrement toxiques pour *L. stagnalis*, c'est-à-dire qui présentent une forte spécificité toxique pour *L. stagnalis* (spécificité d'espèce, CL50 basse), comme par exemple le cuivre, mais une faible spécificité immunotoxique ou reprotoxique (*i.e.*, large spectre d'action) et (iii) faire les expositions pendant au moins 6 mois (beaucoup d'organismes seraient nécessaires).

   Il faudrait idéalement (i) induire des CL50 à différents temps (*e.g.*, $CL50_{4jours}$, $CL50_{30jours}$, et $CL50_{6mois}$), (ii) induire des CE50 sur d'autres traits de vie que le temps de survie comme par exemple la reprotoxicité (fécondité ou oviposition ; $CE50_{96h}$, $CE50_{30jours}$,$CE50_{6mois}$), (iii) induire des CE50 sur les marqueurs d'immunocompétence à différents temps ($CE50_{96h}$, $CE50_{30jours}$,$CE50_{6mois}$) et (iv) réaliser des injections bactériennes pathogènes pour *L. stagnalis* ou induire un parasitisme contrôlé (*e.g.*, *Trichobilharzia ocellata*).

4. *Pour disposer de nouveaux immunomarqueurs* : De nombreux marqueurs semblent pertinents à développer sur les hémocytes et ils devraient être évalués dans des contextes écotoxicologiques pour valider leur pertinence : cycles cellulaires, approches génomiques/transcriptomiques, récepteurs MXR, activité phénol-oxydase spécifique et génotoxicités.

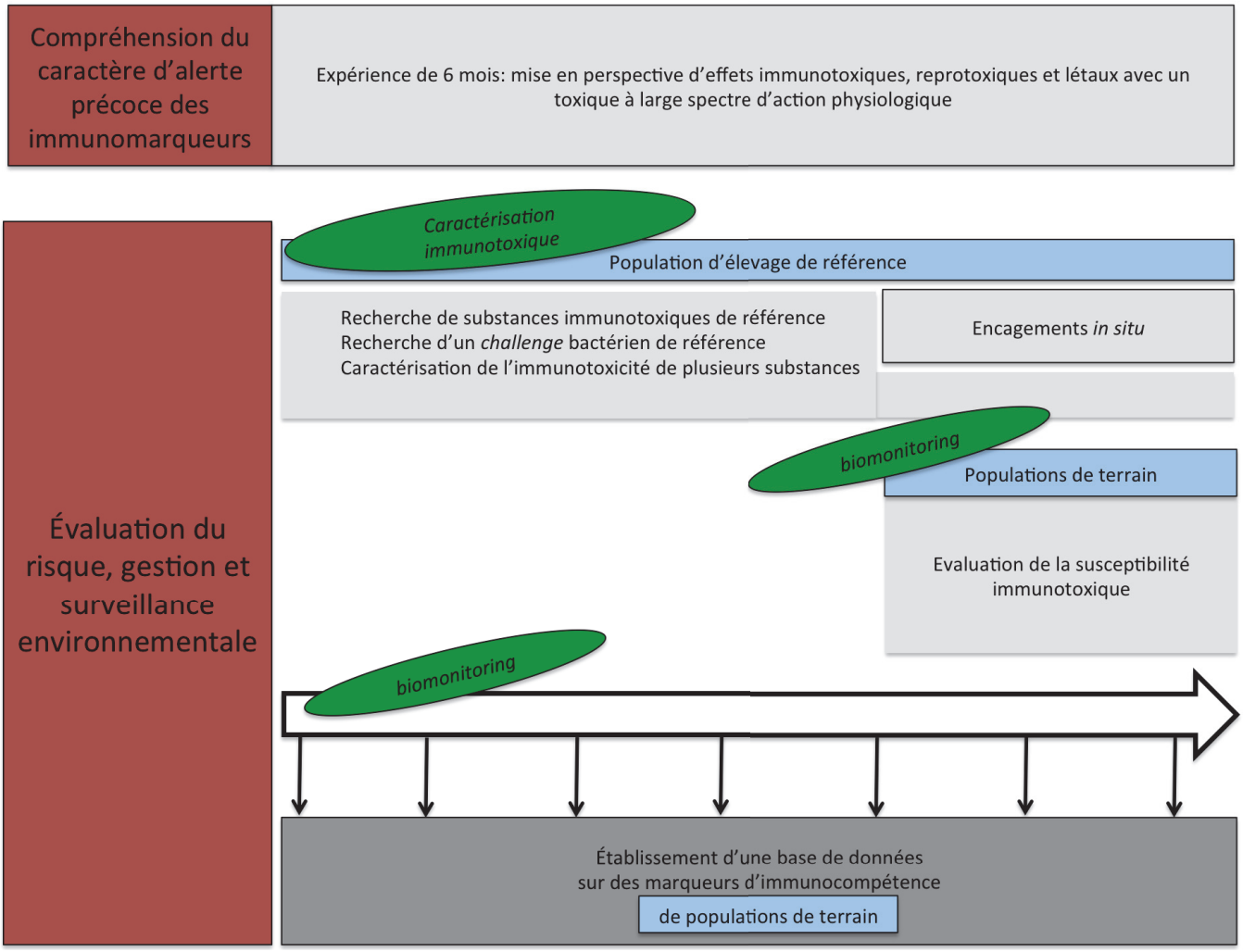


FIGURE 8.11 – Vue d'ensemble des perspectives directes d'utilisation de *L. stagnalis* en immunotoxicologie environnementale selon les objectifs des études

ANNEXES

Annexe A

Catastrophes toxicologiques, écologiques, écotoxicologiques d'origine accidentelle (ou conflictuelle)

Tableau A.1 – Quelques catastrophes toxicologiques, écologiques, écotoxicologiques d'origine accidentelle (source wikipedia)

1954	zone d'archipels Rongelap		Bombe H, "Castle Bravo"	
1956	Minamata (Japon)	Mercure	Déversements dans la mer	Maladies neurologiques très graves
1961–1971	Viêt Nam	Agent orange (herbicide), environ 54000 m^3 déversé dans le sud, concentrations 50 fois supérieures aux recommendations pour désherber	Guerre du Viet-Nam	cancers, malformations, déforestation, pollution majeure des eaux et sols
1967	îles Sorlingues	Marée noire	Nauffrage du pétrolier *Torrey Canyon*	
1969	Rhin, pollution sur 600 km	Pesticide endosulfan	Accident, déversement d'environ 500 L très concentrés	plusieurs millions d'animaux aquatiques morts
1969	Lac Érié (Canada et États-unis)	Pesticides et autres pressions anthropiques chimiques		Écologiquement mort
1976	Seveso (Italie)	Dioxines	Explosion industrielle	conséquences sanitaires graves et diverses, cancers, dispersion atmosphérique puis contamination des sols et eaux
1978	Côtes de la Bretagne (France)	Marées noires du pétrolier *Amoco Cadiz*	223 000 T	catastrophe écologique : faune aquatique sur la côte et dans les fonds marins + forte mortalité d'oiseaux côtiers
1979	Three Miles Island (États-unis)	370 PBq de gaz rares (e.g., Xe133), 550 GBq iode 133	accident nucléaire	cancers
1982	Cascade des 7 chutes (anciennement les plus grandes du monde) (Brésil-Paraguay)		construction d'un barrage	disparition totale
1984	Bhopal (Inde)	40 tonnes d'isocyanate de méthyle	explosion d'une réserve	plus de 100000 blessures, 20 000—25000 morts et problèmes sanitaires diffus + catastrophe écologique majeure
1986	Tchernobyle (Ukraine)	Iode, xénon, uranium, césium 137	accident nucléaire	au moins 20000–35000 cancers ; durée de vie des conifères impactée

Tableau A.2 – (suite) Quelques catastrophes toxicologiques, écologiques, écotoxicologiques d'origine accidentelle

2000	îles de Casquets (Royaume-Unis)	4000 tonnes de styrène, 1000 T d'alcool isopropylique	nauffrage du chimiquier *Levoli Sun*	
2001	Toulouse (France)	stock de nitrate d'ammonium	explosion de l'usine AZF	31 morts, 2500 blessés, 14000 malades
2002	large du cap Finistère (France) et près des côtes de la Galice (Espagne)	Marée noire, environ 10 000T de fioul lourd déversé	nauffrage du pétrolier *Prestige*	dizaines de km de littoral souillés
2005	rivière Songhua (affluent du fleuve Amour) à Jilin (Chine)	benzène et nitrobenzène, 100T	explosion d'une usine pétrochimique	catastrophe écologique majeure, contamunation des eaux de boisson, pollution envisagée à long terme
2006	port d'Abidjan (côte d'ivoire)	581 T de déchets toxiques déchargés	acheminement des déhets du pétrolier *Probo Koala*	17 morts, intoxication de 43500 personnes, 25000 autres probables et catastrophe écologique
2010	Louisiane (États-Unis)	grande marée noire ; environ 780 millions de L déversés	accident de station pétrolière offshore (puit le plus profond creusé)	catastrophe écologique majeure, 400 espèces menacées d'extinction
2010	Ajka (Hongrie) et atteintes du Danube	plus de 700 000 m3 de boues rouges très liquides, alcalines, toxiques et corrosives	effondrement de bassins de stockage de déchets industriels (usine d'aluminium)	10 morts, 150 blessés, hécatombe écologique
2011	Fukushima (Japon)	12.2 — 18.3 EBq de xénon 133	accident nucléaire	accident niveau 7 (INES)
2013	Lac Mégandic (Québec)	100 000— 120 000 L de pétrole brut	accident ferroviaire	47 morts, contamination du lac Mégandic et de la rivière Chaudière
2015	Rio Doce (Mariana, Brésil)	dizaine de millions de m3 de boues polluées sont déversés dans le Rio Doce	rupture de barrage de Bento Rodrigues	plus de 20 morts et 50 blessés, mort écologique du fleuve, contamination des eaux de boisson, augmentation de la mortalité des animaux dans la région, déversement de métaux lourds dans l'océan

Annexe B

Relation entre la taille des masses et le nombre d'oeufs

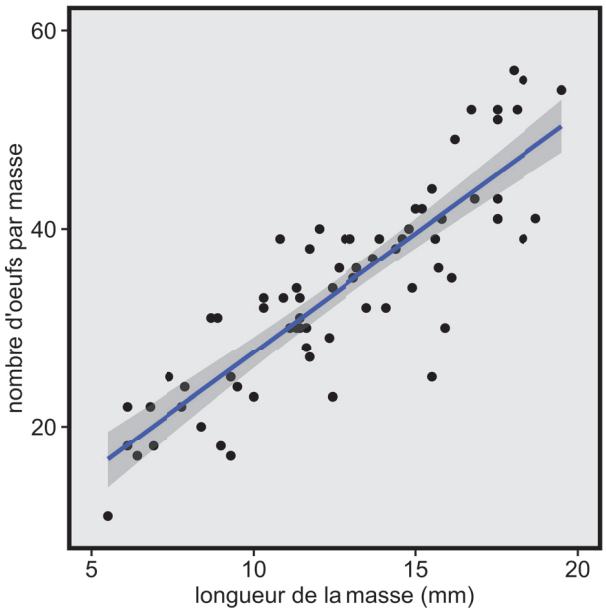


FIGURE B.1 – Relation entre la taille des masses et le nombre d'oeufs

Ces données ont été collectées à partir d'un suivi de trois semaines de 28 individus d'élevage de *L. stagnalis* (taille 28 ±1 mm, poids frais 1609±225 mg)

Annexe C

Extras



FIGURE C.1 – *Lymnaea stagnalis*



FIGURE C.2 – *Lymnaea stagnalis* (32 ±2 mm, élevages, Irstea)



FIGURE C.3 – *Lymnaea stagnalis* (39±3 mm, étang de Broye, Renens, Suisse)



FIGURE C.4 – *Lymnaea stagnalis* adulte avec une hypertorsion de la coquille (anomalie)

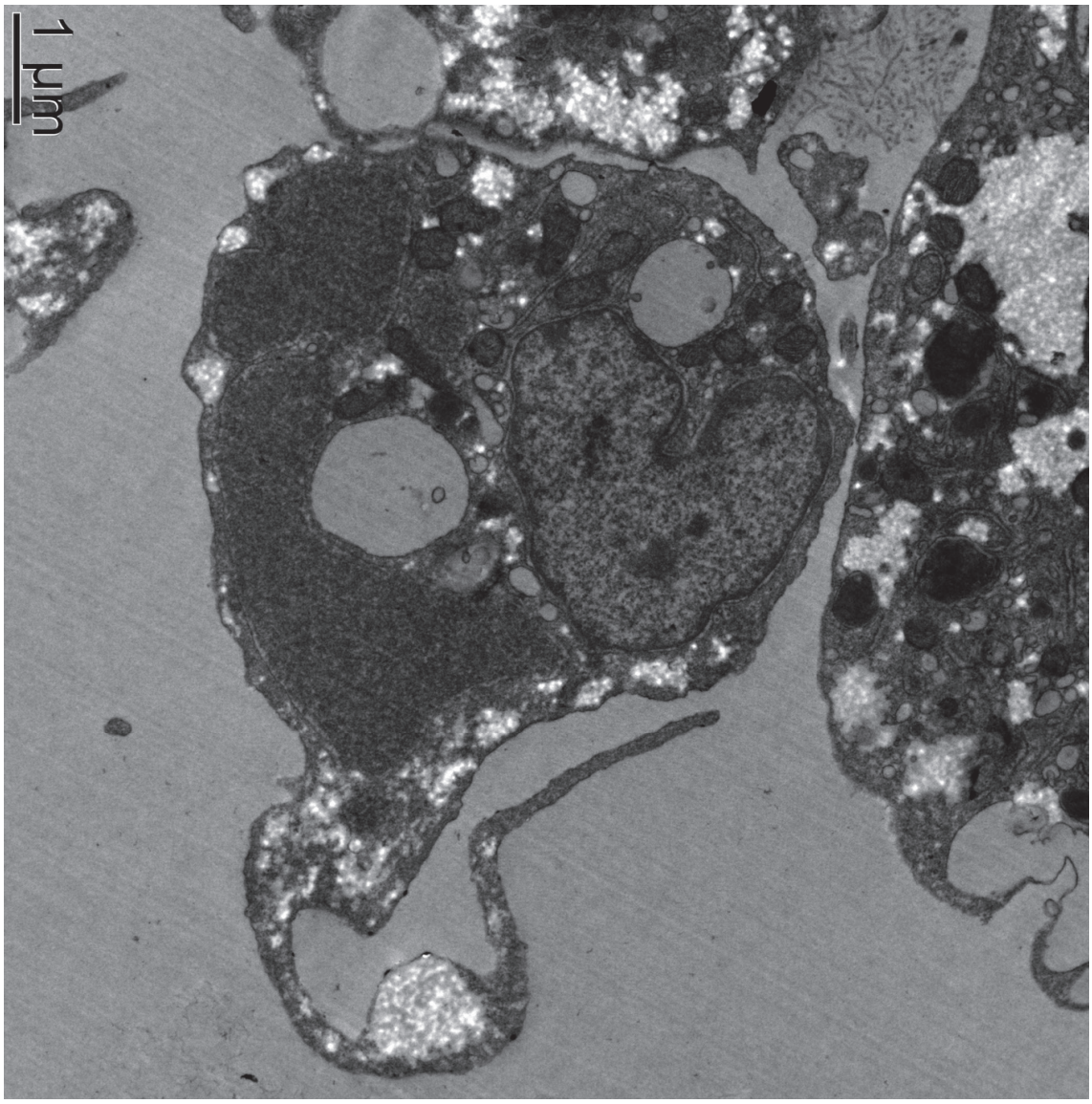


FIGURE C.5 – Au coeur des hémocytes...

Annexe D

Courbes d'étalonnage (dichlorofluorescein)

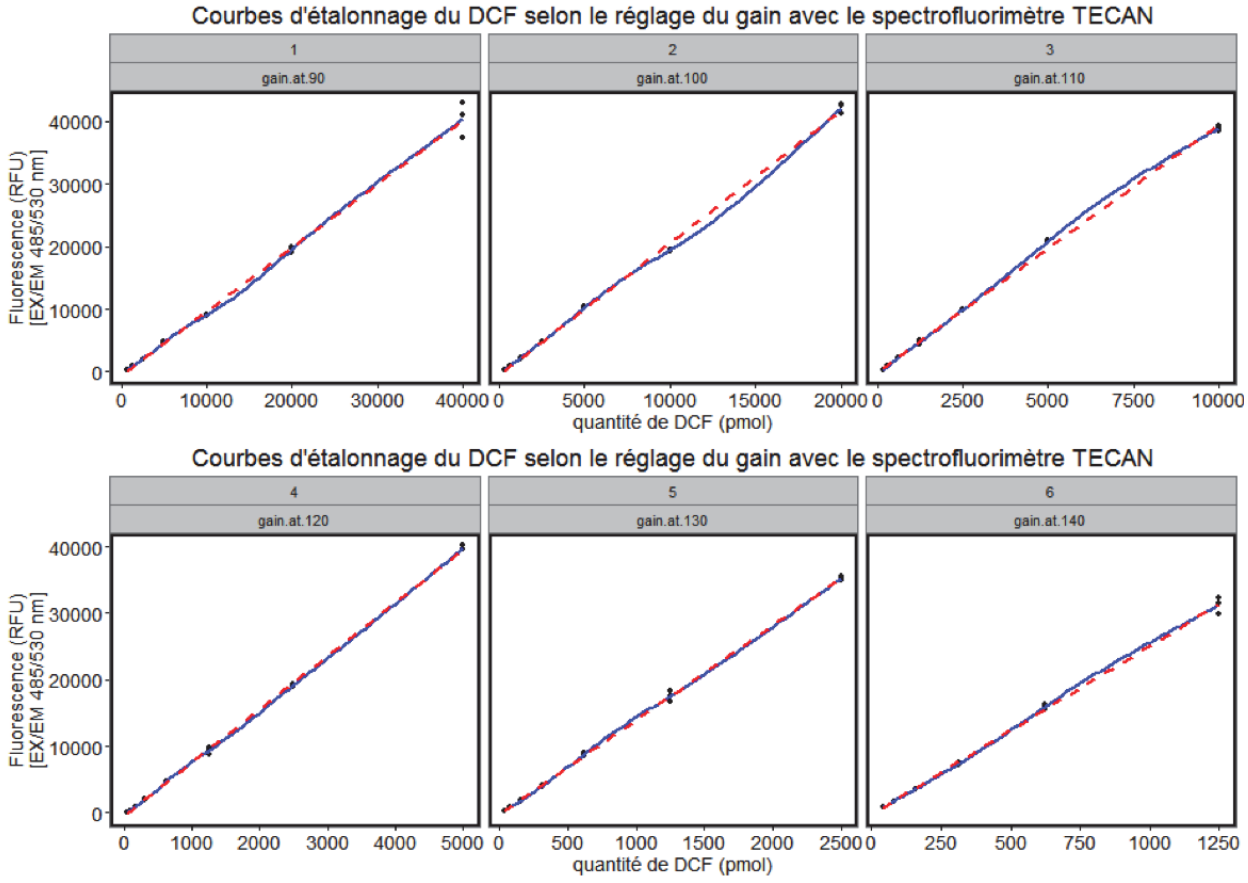


FIGURE D.1 – Etalonnage du DCF selon la fluorescence et le gain (spectrofluorimétrie)

Courbe	équation	r^2
gain à 90	1.0196Xi-551.783	0.9952
gain à 100	2.109Xi-497.888	0.9985
gain à 110	3.962Xi-93.633	0.9982
gain à 120	7.9988Xi-443.530	0.9996
gain à 130	14.199Xi -277.6086	0.9992
gain à 140	25.285Xi-264.274	0.9978

Tableau D.1 – équation des courbes d'étalonnage

Annexe E

Tri cellulaire

Contexte et méthodologie : Des échantillons d'hémocytes non-triés de *L. stagnalis* ont été colorés au May Grünwald-Giemsa et observés en microscopie photonique comme expliqué dans l'article 2 (figure E.1, p. 424). Cependant, au regard de ces images il est difficile de distinguer plusieurs types ou sous-types cellulaires. Il semble qu'un faible gradient taille-structure — à peine perceptible — explique les différences qui justifient la possible existence de sous-populations. Pour affiner la pertinence de quantifier les sous-populations hémocytaires depuis les cytogrammes selon l'affirmation qu'ils diffèrent en terme de taille et structure, un approfondissement des observations en microscopie des hémocytes a été réalisé après un tri cellulaire. Ce tri a été réalisé en cytométrie de flux (FACSDiva, version 6.2) selon les régions de la figure E.2. Les échantillons d'hémolymphe de dix limnées ont été mélangés puis passés à travers un filtre de 85 μm. Contrairement aux cytomètres en flux de la technologie Guava, ce cytomètre utilise un liquide de gaine (PBS) pour aligner les cellules dans le capillaire. Les cellules étaient triées selon les trois régions (P2, P3 et P4 de la figure E.2) dans des eppendorfs stériles de récupération. Ensuite, une cytocentrifugation (600 RPM, Cytospin, Thermo Fisher) et une double coloration May Grünwald-Giemsa ont été appliquées.

Résultats et discussion : Les images sont présentées dans la figure E.3, p. 425. Ces résultats confirment les faibles différences structurelles entre les régions. Une tendance à un gradient de taille et de rapport *noyau* : *cytoplasme* semble exister mais cela reste subtile. Dans la mesure où (i) les images montrent des différences structurelles entre hémocytes très faibles, (ii) les différences fonctionnelles entre ces sous-populations sont mal connues voire inconnues et (iii) les régions faites sur le cytomètre ne sont pas fiables car les groupes sont proches et se chevauchent ce qui fait que l'analyse est très dépendante de l'ajustement des régions faites par l'opérateur, il ne me semble pas pertinent — aujourd'hui — de quantifier les proportions relatives des sous-populations hémocytaires selon leurs cytogrammes dans un contexte d'immunotoxicologie environnementale.

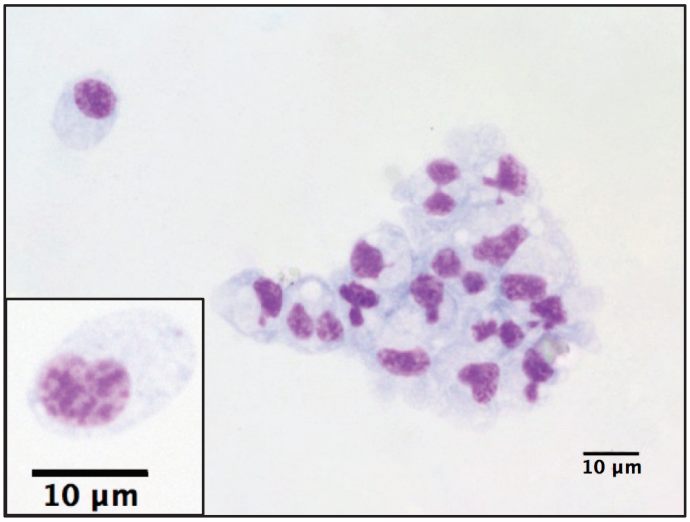


FIGURE E.1 – Hémocytes (non-triés) de *Lymnaea stagnalis* observés après une double coloration de May-Grunwald-Giemsa

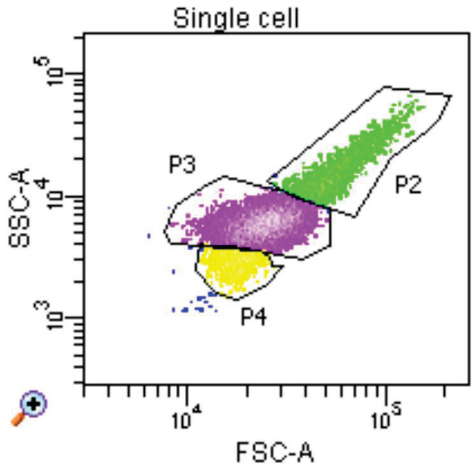


FIGURE E.2 – Cytogramme des hémocytes de *L. stagnalis* avec le cytomètre FACSDiva (version 6.2) et régions utilisées pour le tri cellulaire des sous-populations

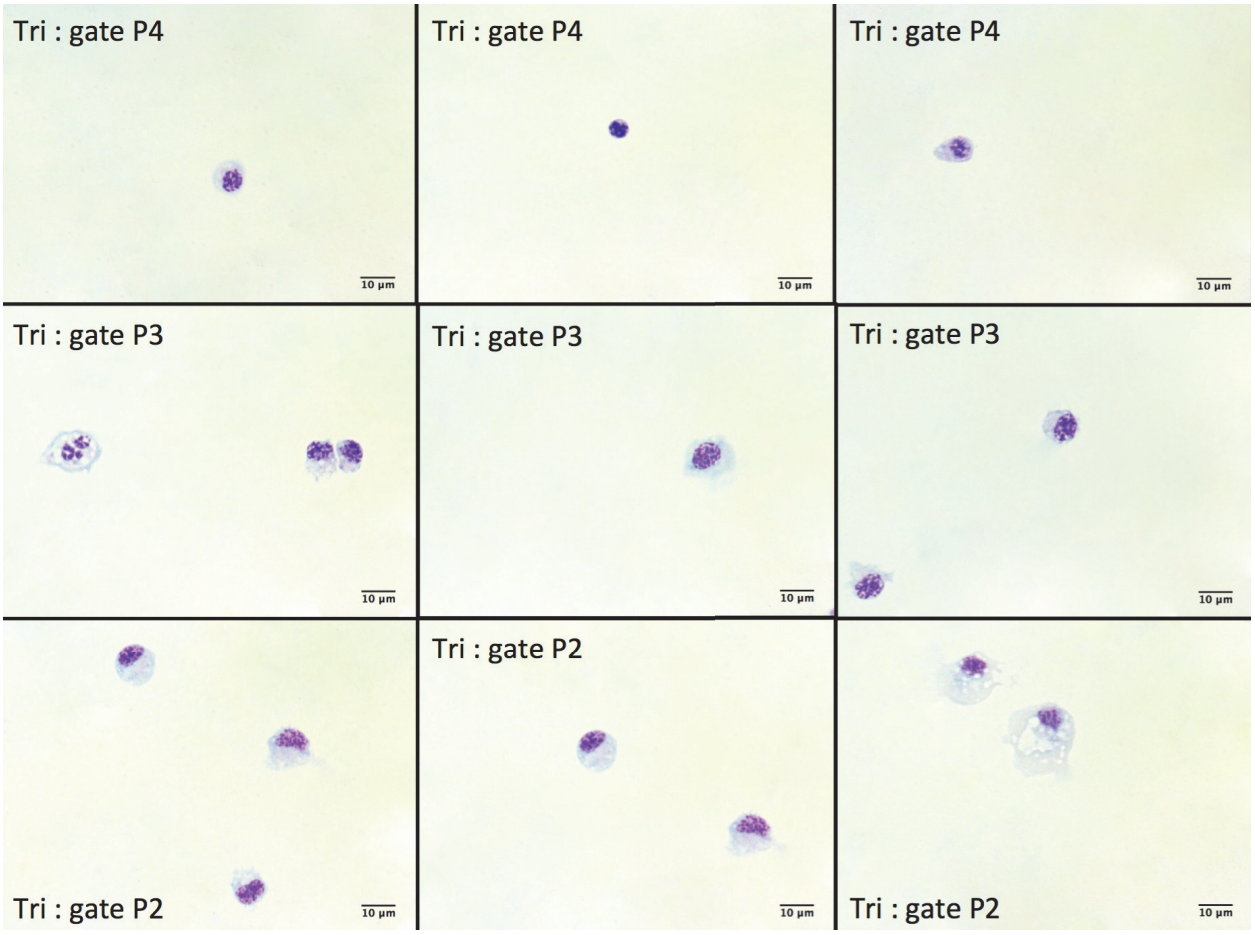


FIGURE E.3 – Hémocytes de *L. stagnalis* triés selon les régions de la figure E.2, puis colorés au May-Grünwald-Giemsa

Annexe F

Informations sur les classifications (éco)toxicologiques des substances étudiées selon la réglementation REACH

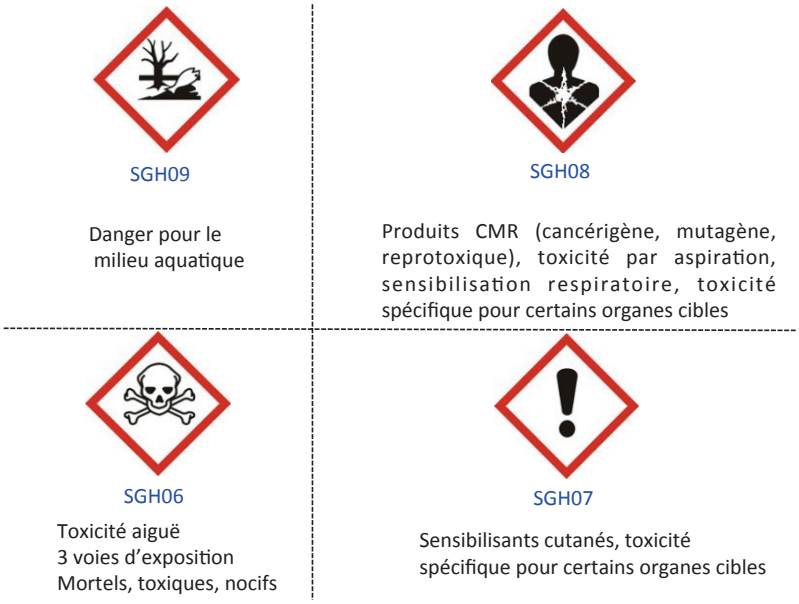


FIGURE F.1 – Exemples de quelques pictogrammes de produits commerciaux qui peuvent résulter de tests (éco)toxicologiques prospectifs

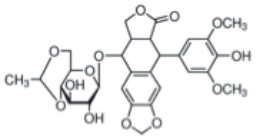
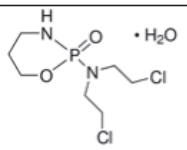
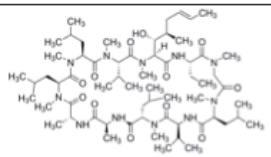
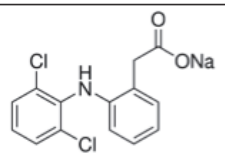
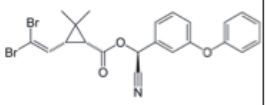
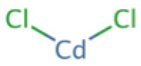
Molécule, CAS	Formule chimique semi-développée	Coefficient de partage octanol-eau (Log Kow)	pictogrammes	Mention de danger
Etoposide N°CAS: 33419-42-0	 **$C_{29}H_{32}O_{13}$**	0.6[a]	 GHS07, GHS08	H302- H350
Cyclophosphamide monohydrate (Synonyme=Cytoxan) N°CAS: 6055-19-2	 **$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$**	0.63[a]	 GHS06, GHS08	H301- H350
Cyclosporine A N°CAS: 59865-13-3	 **$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$**	2.92[b]	 GHS07, GHS08	H302- H350- H360
Diclofenac (synonyme= Voltarène) N°CAS: 15307-79-6	 **$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$**	4.51[a]	 GHS06	H301
Deltaméthrine N°CAS: 52918-63-5	 **$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$**	6.20[a]	 GHS06, GHS09	H300- H312- H331- H410
Cadmium chlorure N°CAS: 10108-64-2	 **$CdCl_2$**	0.21[a]	 GHS06, GHS08, GHS9	H301- H330- H340- H350- H360FD- H372- H410

FIGURE F.2 – Informations (éco)toxicologiques des xénobiotiques étudiés selon la classification GHS de la réglementation REACH

a : Pubchem.ncbi

b : ChemIDplus 2009

Mentions de danger :

- H300 : Mortel en cas d'ingestion.
- H 301 : Toxique en cas d'ingestion.
- H302 : Nocif en cas d'ingestion.
- H312 : Nocif par contact cutané.
- H330 : Mortel par inhalation.
- H331 : Toxique par inhalation.
- H350 : Peut provoquer le cancer.
- H360 : Peut nuire à la fertilité ou au foetus
- H361 : Susceptible de nuire á la fertilité ou au foetus.
- H362 : Peut être nocif pour les bébés nourris au lait maternel.
- H370 : Risque avéré d'effets graves pour les organes.
- H371 : Risque présumé d'effets graves pour les organes .
- H372 : Risque avéré d'effets graves pour les organes á la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée .
- H410 : Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Annexe G

Expositions au diclofenac

Les expositions de courtes durées de produits pharmaceutiques du chapitre 4 ont pointé deux molécules ayant un effet important sur les traits immunitaires des organismes : l'Etoposide et le diclofenac (DC). La suite logique était d'étudier l'effet d'une exposition de longue durée d'un de ces xénobiotiques. Puisqu'il est financièrement impossible d'exposer l'Etoposide en renouvellement continu pendant une longue période, nous avons choisi d'étudier l'effet du DC sur L. stagnalis au cours d'une exposition initialement prévue de 60 jours. Le design expérimental consistait à mesurer des traits de vie (survie et reproduction) et en parallèle des traits immunitaires (densité hémocytaire, viabilité hémocytaire, activité de phagocytose, activité phénol-oxydase et activité oxydative des hémocytes). Deux essais infructueux ont été réalisés.

- Premier essai :

L'approvisionnement en limnées s'est fait en collaboration avec l'Inra de Rennes. Les organismes avaient été élevés en laboratoire (souche Renilys). Les limnées sont arrivées par chronopost dans de la ouate de cellulose. Elles ont été acclimatées une semaine à l'eau du laboratoire d'Irstea avant de commencer l'expérience mais déjà beaucoup de mortalités avaient été observées à l'arrivée et pendant l'acclimatation. Une cohorte de 90 organismes (30 $\pm$1 mm) a été aléatoirement et équitablement répartie dans 15 aquariums. Cing conditions expérimentales ont été mises en place : témoins eau, DC 0.5 μg/L, DC 5 μg/L, DC 50 μg/L et DC 500 μg/L. Un système à renouvellement continu avait été mis en place avec l'utilisation de pompes péristaltiques (voir photo p. 430). Il était initialement prévu de faire durer l'expérience pendant 60 jours. Malheureusement beaucoup de mortalité a été observée. Nous avons été contraint d'arrêter l'expérimentation car la survie des organismes dans toutes les conditions, y compris les témoins, était d'environ 25% au jour 8.

- Deuxième essai :

La même souche Renilys (la seule disponible à ce moment) a été utilisée. En revanche, je suis allé récupérer les limnées sur place à Rennes et les ai ramené à Irstea-Villeurbanne en voiture dans des sceaux remplis de leur eau d'élevage. Les organismes (120 organismes répartis aléatoirement et équitablement dans 15 aquariums) ont été acclimatés une semaine avant de débuter l'expérimentation. Peu de mortalité a été observée. Le dispositif expérimental était identique au premier essai, à l'exception du fait que plus d'organismes ont été utilisés. La survie était meilleure que lors du premier essai (voir fig. C.2 p.431). Néanmoins, elle chutait continuellement pour toutes les conditions. Au jour 30, la survie était de 50 % dans les témoins et donc il a été décidé de stopper l'expérimentation au jour 34 car elle continuait à baisser. Concernant la survie des organismes, le test du log rank ne suggère pas de différences significatives entre les conditions ($p > 0.05$). Les densités et viabilités hémocytaires ont été mesurées aux jours 0, 10, 21 et 34. Les organismes expulsaient très peu d'hémolymphe ce qui a rendu l'analyse difficile. Plusieurs échantillons ont dû être dilués afin d'atteindre le volume minimal requis pour la lecture en cytométrie de flux. L'analyse me parait délicate. Au jour 0, le volume était approximativement de 440

– 520 μl, au jour 10 de 250 – 450 μl, au jour 21 de 120 – 130 μl et au jour 34 de 100 – 130 μl. Le réflexe de rétraction dans la coquille était souvent difficile à déclencher. Nous pouvons néanmoins observer une augmentation des densités pour le groupe 0.5 μg/L au jour 21 par rapport aux témoins (voir fig. C.3 p.431). Nous pouvons également remarquer qu'au jour 34 la densité hémocytaire est plus faible qu' au jour 0 pour toutes les conditions.

Dans la mesure où la survie était très faible dans toutes les conditions, nous pouvons considérer que les organismes étaient en mauvaise santé. Cela coincide à une chute des densités hémocytaires, ce qui laisse penser que ces paramètres immunitaires rendent compte de l'état de santé des organismes et qu'une corrélation directe peut exister. Enfin, la viabilité hémocytaire au jour 34 est affectée seulement dans les groupes témoins et DC 0.5 μg/L (voir fig. C.4 p.432). Malgré une interprétation délicate des résultats à cause de la forte mortalité inexpliquée dans toutes les conditions, il ne semble pas qu'il y ait un effet important du DC sur la survie des organismes ou sur leur densité et viabilité hémocytaire.

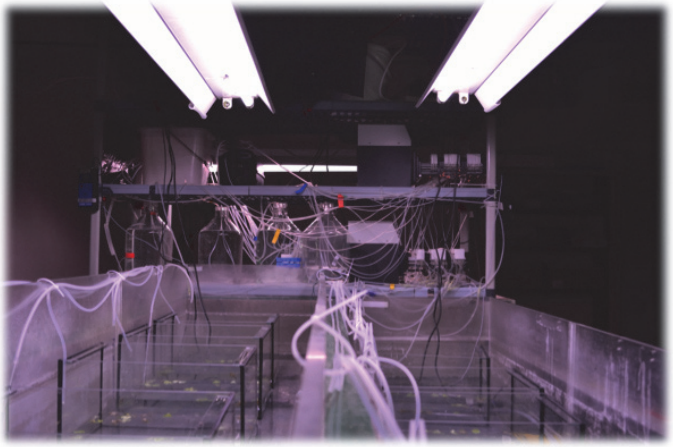


FIGURE G.1 – Photo du dispositif exprérimental

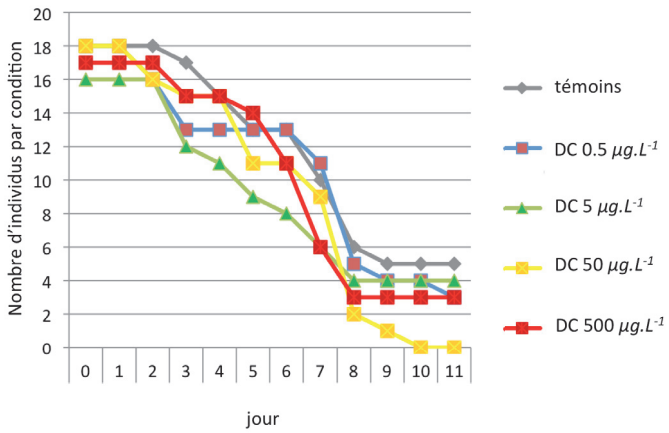


FIGURE G.2 – Courbes de survie des organismes lors du premier essai d'expérimentation de longue durée avec le diclofenac

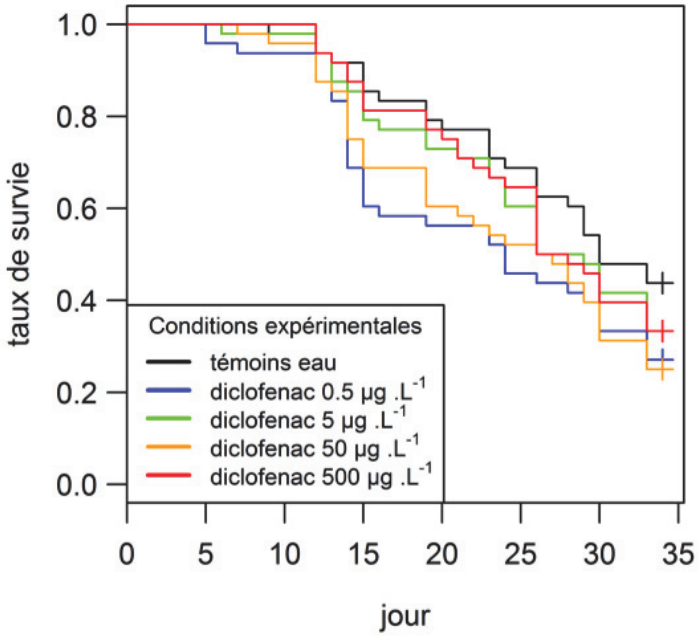


FIGURE G.3 – Courbes de survie des organismes lors du deuxième essai d'expérimentation de longue durée avec le diclofenac

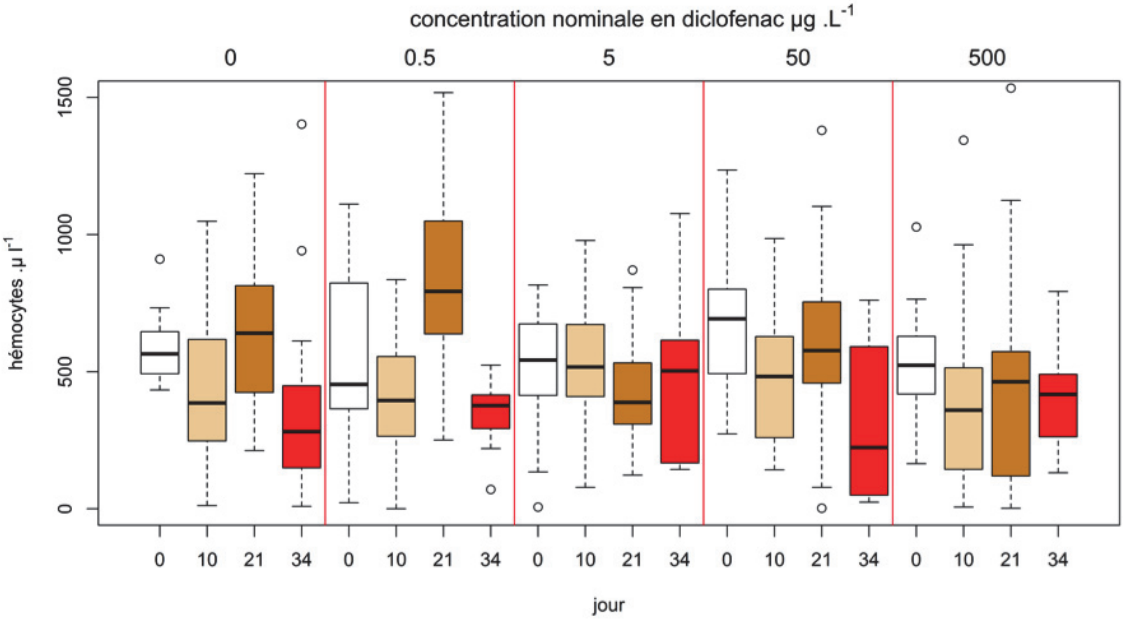


FIGURE G.4 – Densité hémocytaire

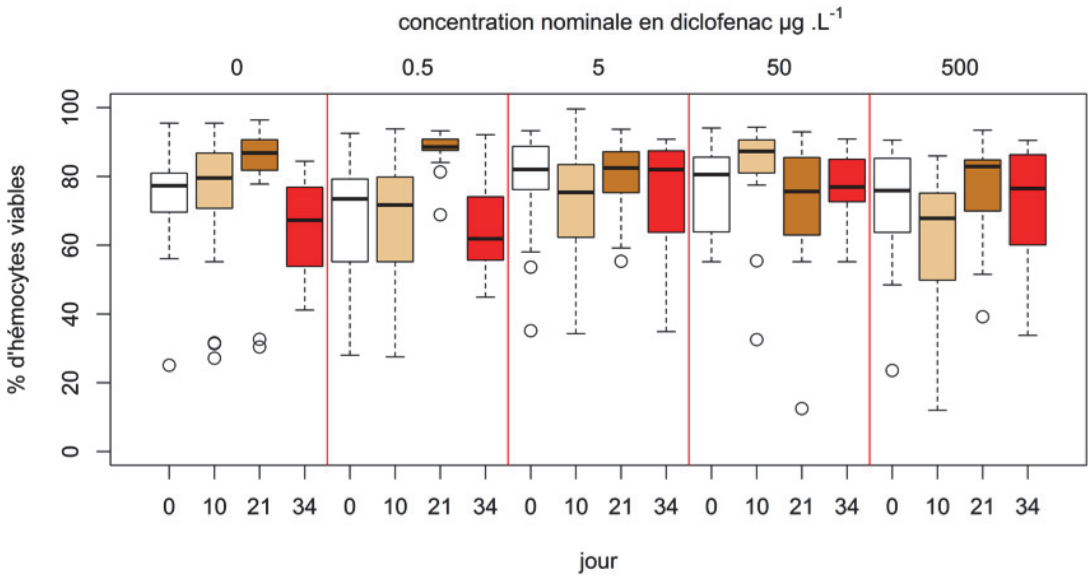


FIGURE G.5 – Viabilité hémocytaire

Annexe H

Diagramme d'analyse d'un biomarqueur immunitaire en écotoxicologie

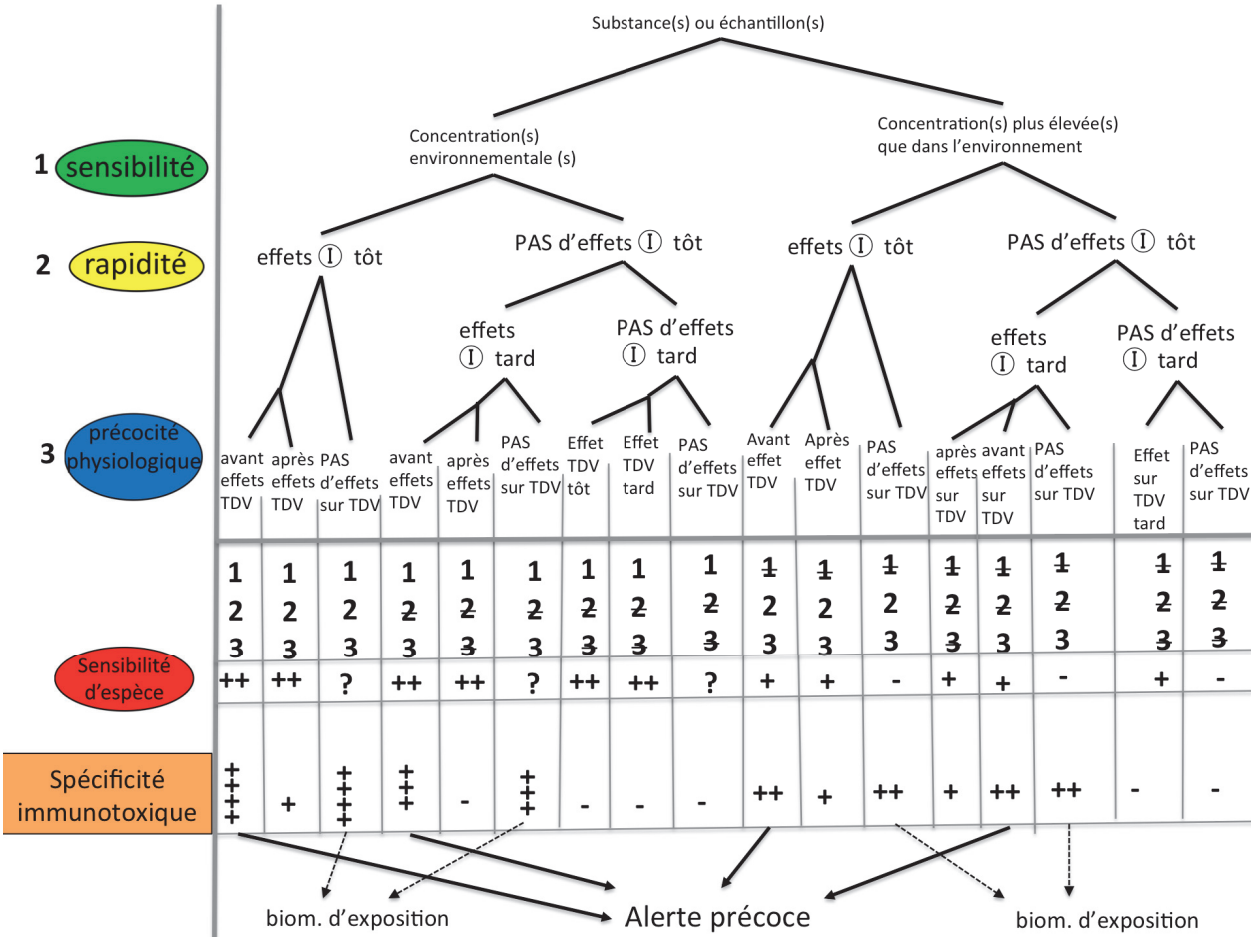


FIGURE H.1 – Diagramme d'analyse d'un biomarqueur immunitaire en écotoxicologie
TDV = Trait de vie ; biom. = biomarqueur

Ce modèle de classification est imparfait par nature car il est impossible, dans l'absolu, de juger chaque élément indépendamment des autres. Néanmoins, il peut aider à situer l'issue d'une expérimentation immunotoxicologique dans un contexte écotoxicologique et d'avancer sur la réflexion autour de la pertinence d'utilisation du biomarqueur immunitaire évalué.

- Le premier critère est de considérer la concentration à laquelle les organismes sont exposés au xénobiotique.
- Le deuxième critère est la rapidité de réponse de l'immunomarqueur.
- Le troisième critère est la précocité de modulation de l'immunomarqueur par rapport à d'autres traits d'histoire de vie ou processus physiologiques des organismes.
- La caractérisation de la spécificité immunotoxique peut se faire selon les trois premiers critères (sensibilité, rapidité et précocité). Nous pourrons qualifier les immunomarqueurs comme des **marqueurs d'alerte précoce** lorsque des effets fortement marqués sont observés sur les TDV et cela de manière postérieure aux effets immunitaires.

Bibliographie

2008/105/EC, Directive. 2008. 3 Priority substances under the European Water Framework Directive. http ://ec.europa.eu/environment/waterdangersub/pri-substances.htmlist.

Adam, Olivier, Degiorgi, François, Crini, Grégorio, & Badot, Pierre-Marie. 2010. High sensitivity of Gammarus sp. juveniles to deltamethrin : outcomes for risk assessment. *Ecotoxicology and environmental safety*, **73**(6), 1402–1407.

Adema, CM, van Deutekom-Mulder, EC, van der Knaap, WP, & Sminia, T. 1993. NADPH-oxidase activity : the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of leukocyte biology*, **54**(5), 379–383.

Adema, CM, van Deutekom-Mulder, EC, Van Der Knaap, WPW, & Sminia, T. 1994a. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes : the role of oxygen radicals. *Parasitology*, **109**(04), 479–485.

Adema, Coen M, Mohandas, Ambat, van der Knaap, Wil PW, & Sminia, Taede. 1994b. Separation of *Lymnaea stagnalis* hemocytes by density gradient centrifugation. *Developmental & Comparative Immunology*, **18**(1), 25–31.

Adema, Coen M, Hertel, Lynn A, Miller, Robert D, & Loker, Eric S. 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(16), 8691–8696.

Ahrens, Lutz, Felizeter, Sebastian, Sturm, Renate, Xie, Zhiyong, & Ebinghaus, Ralf. 2009. Polyfluorinated compounds in waste water treatment plant effluents and surface waters along the river Elbe, Germany. *Marine Pollution Bulletin*, **58**(9), 1326–1333.

Akaishi, Fabiola M, St-Jean, Sylvie D, Bishay, Farida, Clarke, John, Rabitto, Inês da S, & de Oliveira Ribeiro, Ciro A. 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology*, **82**(1), 1–14.

Akira, Shizuo, Uematsu, Satoshi, & Takeuchi, Osamu. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**(4), 783–801.

Allam, Bassem, & Espinosa, Emmanuelle Pales. 2016. Bivalve immunity and response to infections : Are we looking at the right place ? *Fish & shellfish immunology*, **53**, 4–12.

Allam, Bassem, Paillard, Christine, Auffret, Michel, & Ford, Susan E. 2006. Effects of the pathogenic Vibrio tapetis on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species : II. cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish & shellfish immunology*, **20**(3), 384–397.

Alvarez, Marvin R, Friedl, Frank E, & Roman, Francisco Ruiz. 1995. *In vivo* chemoactivation of oyster hemocytes induced by bacterial secretion products. *Journal of invertebrate pathology*, **66**(3), 287–292.

Amen, Renée I, Tijnagel, Jolanda MG, van der Knaap, Wil PW, Meuleman, Elisabeth A, de Lange-de Klerk, Elly SM, & Sminia, Taede. 1991a. Effects of *Trichobilharzia ocellata* on hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Developmental & Comparative Immunology*, **15**(3), 105–115.

Amen, Renée I, Aten, Jacob A, Baggen, Josefien MC, Meuleman, Elisabeth A, de Lange-de Klerk, Elly SM, & Sminia, Taede. 1992a. *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis* : a flow cytometric approach to study its effects on hemocytes. *Journal of invertebrate pathology*, **59**(1), 95–98.

Amen, RI, Baggen, JMC, Meuleman, EA, Wijsman-Grootendorst, A, Boon, ME, Bezemer, PD, & Sminia, T. 1991b. *Trichobilharzia ocellata* : quantification of effects on haemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by morphometric means. *Tissue and Cell*, **23**(5), 665–676.

Amen, RI, Baggen, JMC, Bezemer, PD, & de Jong-Brink, M. 1992b. Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology*, **104**(01), 33–40.

Aminot, Yann, Le Menach, Karyn, Pardon, Patrick, Etcheber, Henri, & Budzinski, Hélène. 2016. Inputs and seasonal removal of pharmaceuticals in the estuarine Garonne river. *Marine Chemistry*.

Anderson, Robert S, & Beaven, Amy E. 2001. Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquatic Living Resources*, **14**(6), 343–349.

Aragon, T, Fay, MP, & Wollschlaeger, D. 2010. EpiTools : R package for epidemiologic data and graphics. *Comprehensive R Archive Network*.

Arala-Chaves, Mário, & Sequeira, Teresa. 2000. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates ? *Aquaculture*, **191**(1), 247–258.

Araya, Mebrahtu T, Siah, Ahmed, Mateo, Dante R, Markham, Frederick, McKenna, Patty, Johnson, Gerry R, & Berthe, Franck CJ. 2009. Morphological and molecular effects of *Vibrio splendidus* on hemocytes of softshell clams, *Mya arenaria*. *Journal of Shellfish Research*, **28**(4), 751–758.

Arthur, Wallace. 1982. Control of shell shape in *Lymnaea stagnalis*. *Heredity*, **49**(2), 153–161.

Artigas, Joan, Arts, Gertie, Babut, Marc, Caracciolo, Anna Barra, Charles, Sandrine, Chaumot, Arnaud, Combourieu, Bruno, Dahllöf, Ingela, Despréaux, Denis, Ferrari, Benoit, *et al.* . 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environmental pollution*, **160**, 201–206.

Ashton-Alcox, KA, & Ford, SE. 1998. Variability in molluscan hemocytes : a flow cytometric study. *Tissue and Cell*, **30**(2), 195–204.

Auffret, Michel. 2005. Bivalves as models for marine immunotoxicology. *Investigative immunotoxicology*, 29–48.

Auffret, Michel, Mujdzic, Nedzad, Corporeau, Charlotte, & Moraga, Dario. 2002. Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine environmental research*, **54**(3), 585–589.

Auffret, Michel, Duchemin, Matthieu, Rousseau, Sabrina, Boutet, Isabelle, Tanguy, Arnaud, Moraga, Dario, & Marhic, Alain. 2004. Monitoring of immunotoxic responses in oysters reared in areas contaminated by the "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resources*, **17**(3), 297–302.

Auffret, Michel, Rousseau, Sabrina, Boutet, Isabelle, Tanguy, Arnaud, Baron, Jacques, Moraga, Dario, & Duchemin, Matthieu. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in western mediterranea. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**(3), 393–405.

Auli, M, Domenech, A, Andres, A, Orta, M, Salva, M, Descotes, J, & Prats, N. 2012. Multiparametric immunotoxicity screening in mice during early drug development. *Toxicology letters*, **214**(2), 200–208.

Avdeef, A, Box, KJ, Comer, JEA, Hibbert, C, & Tam, KY. 1998. pH-Metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of lonizable drugs. *Pharmaceutical research*, **15**(2), 209–215.

Aydin, Birsen. 2011. Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide biochemistry and physiology*, **100**(2), 165–171.

Babior, Bernard M, Benna, Jamel El, Chanock, Stephen J, & Smith, Robert M. 1997. The NADPH oxidase of leukocytes : the respiratory burst oxidase. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, **34**, 737–783.

Bado-Nilles, Anne, Gagnaire, Béatrice, Thomas-Guyon, Hélène, Le Floch, Stéphane, & Renault, Tristan. 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro*, **22**(6), 1610–1617.

Bado-Nilles, Anne, Betoulle, Stéphane, Geffard, Alain, Porcher, Jean-Marc, Gagnaire, Béatrice, & Sanchez, Wilfried. 2013. Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus L.*) immune cells : applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**(5), 2692–2704.

Bakry, Fayez A, Hasheesh, Wafaa S, & Hamdi, Salwa AH. 2011. Biological, biochemical, and molecular parameters of *Helisoma duryi* snails exposed to the pesticides Malathion and Deltamethrin. *Pesticide biochemistry and physiology*, **101**(2), 86–92.

Balian, EV, Segers, H, Lévêque, Christian, & Martens, Koenraad. 2008. The freshwater animal diversity assessment : an overview of the results. *Hydrobiologia*, **595**(1), 627–637.

Bandow, Cornelia, & Weltje, Lennart. 2012. 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*, **435**, 90–95.

Barber, Iain, Berkhout, Boris W, & Ismail, Zalina. 2016. Thermal Change and the Dynamics of Multi-Host Parasite Life Cycles in Aquatic Ecosystems. *Integrative and comparative biology*, icw025.

Barbosa, Marta O, Moreira, Nuno FF, Ribeiro, Ana R, Pereira, Manuel FR, & Silva, Adrián MT. 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants : An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water research*, **94**, 257–279.

Bates, Douglas, Mächler, Martin, Bolker, Ben, & Walker, Steve. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv :1406.5823*.

Bathige, SDNK, Umasuthan, Navaneethaiyer, Kasthuri, Saranya Revathy, Whang, Ilson, Lim, Bong-Soo, Nam, Bo-Hye, & Lee, Jehee. 2013. A bifunctional invertebrate-type lysozyme from the disk abalone, *Haliotis discus discus* : genome organization, transcriptional profiling and biological activities of recombinant protein. *Developmental & Comparative Immunology*, **41**(2), 282–294.

Beaudry, Alexandre, Fortier, Marlène, Masson, Stéphane, Auffret, Michel, Brousseau, Pauline, & Fournier, Michel. 2016. Effect of temperature on immunocompetence of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Xenobiotics*, **6**(1).

Bekius, Reimer. 1971. The circulatory system of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*, **22**(1), 1–58.

Benjamin, Paul R. 2008. *Lymnaea*. *Scholarpedia*, **3**(1), 4124.

Berrie, AD. 1965. On the life cycle of *Lymnaea stagnalis* (L.) in the west of Scotland. *Journal of Molluscan Studies*, **36**(5), 283–295.

Berteloot. 2015. Diet quality influences chronic toxicity of copper to the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Poster at SETAC, Barcelona*.

Besse, Jean-Philippe, & Garric, Jeanne. 2008. Human pharmaceuticals in surface waters : implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology letters*, **176**(2), 104–123.

Besse, Jean-Philippe, Latour, Jean-François, & Garric, Jeanne. 2012. Anticancer drugs in surface waters : what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs ? *Environment international*, **39**(1), 73–86.

Bianchi, Virginia A, Castro, Juan M, Rocchetta, Iara, Nahabedian, Daniel E, Conforti, Visitación, & Luquet, Carlos M. 2015. Long-term feeding with Euglena gracilis cells modulates immune responses, oxidative balance and metabolic condition in *Diplodon chilensis* (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) exposed to living *Escherichia coli*. *Fish & shellfish immunology*, **42**(2), 367–378.

Bisson, Michele. 2014. Cadmium et ses dérivés. *INERIS - Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*.

Bohlken, S, & Joosse, J. 1981. The effect of photoperiod on female reproductive activity and growth of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* kept under laboratory breeding conditions. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, **4**(4), 213–222.

Boisseaux, Paul, Gust, Marion, Betoulle, Stéphane, & Garric, Jeanne. 2014. Short-term immunotoxic effects of an anticancer drug (Etoposide) on the freshwater pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Xenobiotics*, **4**(2).

Boisseaux, Paul, Delignette-Muller, Marie-Laure, Abbaci, Khédidja, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2016a. Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis* : Characterization and effects of repeated hemolymph collections. *Fish & Shellfish Immunology*.

Boisseaux, Paul, Noury, Patrice, Delignette-Muller, Marie-Laure, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2016b. Recomendations for the analysis of hemocyte-related oxidative activities in the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal Of Xenobiotics (accepted)*.

Boisseaux, Paul, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2017a. An overview of immunormakers in *Lymnaea stagnalis* and potential applications in ecotoxicology. *to submit*.

Boisseaux, Paul, Delignette-Muller, Marie-Laure, Noury, Patric, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2017b. Exploring the immunotoxicity of cadmium to the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *to submit*.

Boisseaux, Paul, Delignette-Muller, Marie-Laure, Noury, Patrice, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2017c. Immune responses

of the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* facing treated urban wastewaters. *to submit.*

Boisseaux, Paul, Delignette-Muller, Marie-Laure, Noury, Patrice, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2017d. Immune responses of the aquatic snail *Lymnaea stagnalis* following short-term exposures of pharmaceuticals. *Ecotoxicology and Environmental Safety (accepted).*

Boisseaux, Paul, Chazarin, Dante, Noury, Patrice, Delignette-Muller, Marie-Laure, Thomas, Hélène, & Garric, Jeanne. 2017e. Is the insecticide deltamethrin likely to exert immunotoxicity to natural populations of *Lymnaea stagnalis* ? *to submit.*

Booker, Victoria, Halsall, Crispin, Llewellyn, Neville, Johnson, Andrew, & Williams, Richard. 2014. Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. *Science of the Total Environment*, **473**, 159–170.

Boon-Niermeijer, Elida K, Tuyl, Mark, & van de Scheur, Henry. 1986. Evidence for two states of thermotolerance. *International Journal of Hyperthermia*, **2**(1), 93–105.

Bouchard, Nicole, Pelletier, Émilien, & Fournier, Michel. 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**(3), 519–522.

Bouétard, Anthony, Côte, Jessica, Besnard, Anne-Laure, Collinet, Marc, & Coutellec, Marie-Agnès. 2014. Environmental versus anthropogenic effects on population adaptive divergence in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *PloS one*, **9**(9), e106670.

Bouilly, Karine, Gagnaire, Béatrice, Bonnard, Marc, Thomas-Guyon, Hélène, Renault, Tristan, Miramand, Pierre, & Lapègue, Sylvie. 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic toxicology*, **78**(2), 149–156.

Brezden, B. L., & Gardner, D. R. 1992. Review of the electrophysiological, pharmacological and single channel properties of heart ventricle muscle cells in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Experientia*, **48**(9), 841–852.

Brezden, BL, Benjamin, PR, & Gardner, DR. 1991. The peptide FMRFamide activates a divalent cation-conducting channel in heart muscle cells of the snail *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of physiology*, **443**, 727.

Bridelli, MG, Ciati, A, & Crippa, PR. 2006. Binding of chemicals to melanins re-examined : adsorption of some drugs to the surface of melanin particles. *Biophysical chemistry*, **119**(2), 137–145.

Brion, François, Tyler, CR, Palazzi, Xavier, Laillet, B, Porcher, Jean-Marc, Garric, Jeanne, & Flammarion, Patrick. 2004. Impacts of 17β-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile-and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, **68**(3), 193–217.

Brix, Kevin V, Esbaugh, Andrew J, & Grosell, Martin. 2011. The toxicity and physiological effects of copper on the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, **154**(3), 261–267.

Brix, Kevin V, Esbaugh, Andrew J, Munley, Kathleen M, & Grosell, Martin. 2012. Investigations into the mechanism of lead toxicity to the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology*, **106**, 147–156.

Brockhurst, Michael A, & Koskella, Britt. 2013. Experimental coevolution of species interactions. *Trends in ecology & evolution*, **28**(6), 367–375.

Brodin, Tomas, Piovano, Susanna, Fick, Jerker, Klaminder, Jonatan, Heynen, Martina, & Jonsson, Micael. 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **369**(1656), 20130580.

Broeg, Katja, Köhler, Angela, & Westernhagen, HV. 2002. Disorder and recovery of environmental health monitored by means of lysosomal stability in liver of European flounder (*Platichthys flesus L.*). *Marine environmental research*, **54**(3), 569–573.

Brousseau, P., Dunier, M., Deshaux, P., Guise, S. De, Krzystyniak, K., & Fournier, M. 1998a. Marqueurs immunologiques (chapitre 13 de *Biomarqueurs en écotoxicologie — Aspects fondamentaux*, L. Lagadic, T. Caquet, JC Amiard, F. Ramade).

Brousseau, Pauline, Yves, Payette, Helen, Tryphonas, Barry, Blakley, Herman, Boermans, Denis, Flipo, & Michel, Fournier, 1998b. Manual of immunotoxicological methods.

Brousseau, Pauline, Pillet, Stéphane, Frouin, Héloïse, Auffret, Michel, Gagné, François, & Fournier, Michel. 2012. Linking immunotoxicity and ecotoxicological effects at higher biological levels. *In : Ecological Biomarkers : Indicators of Ecotoxicological Effects*. Taylor and Francis France.

Brown, Kenneth M. 1979. Effects of experimental manipulations on the life history pattern of *Lymnaea stagnalis appressa* Say (Pulmonata : Lymnaeidae). *Hydrobiologia*, **65**(2), 165–176.

Buck, Leslie T, Bond, Hilary C, & Malik, Aqsa. 2017. Assessment of anoxia tolerance and photoperiod dependence of GABAergic polarity in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, **203**, 193–200.

Buerge, Ignaz J, Buser, Hans-Rudolf, Poiger, Thomas, & Müller, Markus D. 2006. Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental science & technology*, **40**(23), 7242–7250.

Buser, Hans-Rudolf, Poiger, Thomas, & Müller, Markus D. 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters : rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science & Technology*, **32**(22), 3449–3456.

Calabrese, Edward J. 2008. Hormesis : why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**(7), 1451–1474.

Calow, Peter. 1993. Handbook of ecotoxicology. **1**.

Canadien, Veronica, Tan, Tracy, Zilber, Rachelle, Szeto, Jason, Perrin, Andrew J, & Brumell, John H. 2005. Cutting edge : microbial products elicit formation of dendritic cell aggresome-like induced structures in macrophages. *The Journal of immunology*, **174**(5), 2471–2475.

Canesi, Laura, Gallo, Gabriella, Gavioli, Miriam, & Pruzzo, Carla. 2002. Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique*, **57**(6), 469–476.

Canesi, Laura, Ciacci, Caterina, Betti, Michele, Lorusso, Lucia Cecilia, Marchi, Barbara, Burattini, Sabrina, Falcieri, Elisabetta, & Gallo, Gabriella. 2004. Rapid effects of 17β-estradiol on cell signaling and function of Mytilus hemocytes. *General and comparative endocrinology*, **136**(1), 58–71.

Canesi, Laura, Lorusso, Lucia Cecilia, Ciacci, Caterina, Betti, Michele, Rocchi, Marco, Pojana, Giulio, & Marcomini, Antonio. 2007. Immunomodulation of Mytilus hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens : *in vitro* and *in vivo* studies. *Aquatic toxicology*, **81**(1), 36–44.

Canesi, Laura, Ciacci, Caterina, Betti, Michele, Fabbri, Rita, Canonico, Barbara, Fantinati, Andrea, Marcomini, Antonio, & Pojana, Giulio. 2008. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes. *Environment international*, **34**(8), 1114–1119.

Canesi, Laura, Ciacci, Caterina, Fabbri, Rita, Marcomini, Antonio, Pojana, Giulio, & Gallo, Gabriella. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, **76**, 16–21.

Canty, Angelo, & Ripley, BD. boot : Bootstrap R (S-Plus) Functions, 2014. *R package version*, 1–3.

Canty, Martin N, Hutchinson, Thomas H, Brown, Rebecca J, Jones, Malcolm B, & Jha, Awadhesh N. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences : differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, **94**(1), 68–76.

Caquet, Thierry, Hanson, Mark L, Roucaute, Marc, Graham, David W, & Lagadic, Laurent. 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. II. Benthic macroinvertebrate responses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**(6), 1280–1290.

Carfi, M, Gennari, A, Malerba, I, Corsini, E, Pallardy, M, Pieters, R, Van Loveren, H, Vohr, H Werner, Hartung, T, & Gribaldo, L. 2007. *In vitro* tests to evaluate immunotoxicity : a preliminary study. *Toxicology*, **229**(1), 11–22.

Caruso, Raffaele, Perico, Norberto, Cattaneo, Dario, Piccinini, Giampiero, Bonazzola, Samantha, Remuzzi, Giuseppe, & Gaspari, Flavio. 2001. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clinical chemistry*, **47**(9), 1679–1687.

Cédat, Bruno, de Brauer, Christine, Métivier, Hélène, Dumont, Nathalie, & Tutundjan, Renaud. 2016. Are UV photolysis and UV/H 2 O 2 process efficient to

treat estrogens in waters ? Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water research*, **100**, 357–366.

Chakraborty, Chiranjib, Hsu, Chi H, Wen, Zhi Hong, Lin, Chang Shing, & Agoramoorthy, Govindasamy. 2009. Zebrafish : a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Current drug metabolism*, **10**(2), 116–124.

Champeau, O, Auffret, Michel, Cajaraville, MP, Basseres, A, & Narbonne, J-F. 2007. Immunological and cytotoxicological responses of the Asian clam, *Corbicula fluminea* (M.), experimentally exposed to cadmium. *Biomarkers*, **12**(2), 173–187.

Charles, Sandrine, Ducrot, Virginie, Azam, Didier, Benstead, Rachel, Brettschneider, Denise, De Schamphelaere, Karel, Goncalves, Sandra Filipe, Green, John W, Holbech, Henrik, Hutchinson, Thomas H, *et al.* . 2016. Optimizing the design of a reproduction toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **81**, 47–56.

Châtel, Amelie, Hamer, Bojan, Talarmin, Helene, Dorange, Germaine, Schröder, HC, & Müller, Werner EG. 2010. Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution. *Aquatic toxicology*, **96**(4), 247–255.

Chemeris, NK, Kazachenko, VN, Kislov, AN, & Kurchikov, AL. 1982. Inhibition of acetylcholine responses by intracellular calcium in *Lymnaea stagnalis* neurones. *The Journal of physiology*, **323**, 1.

Cheng, Thomas C. 1984. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. *Pages 111–146 of : Invertebrate Blood*. Springer.

Cheng, Thomas C, & Howland, Keith H. 1979. Chemotactic attraction between hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, **33**(2), 204–210.

Chisholm, June RS, & Smith, Valerie J. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, **110**(1), 39–45.

Chorus, Ingrid. 2001. Cyanotoxin occurrence in freshwaters. *Pages 5–101 of : Cyanotoxins*. Springer.

Clément, B, Devaux, Alain, Perrodin, Y, Danjean, M, & Ghidini-Fatus, M. 2004. Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms. *Ecotoxicology*, **13**(4), 323–333.

Coates, Christopher J, & Decker, Heinz. 2016. Immunological properties of oxygen-transport proteins : hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1–25.

Cochennec-Laureau, Nathalie, Auffret, Michel, Renault, Tristan, & Langlade, Aymé. 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of invertebrate pathology*, **83**(1), 23–30.

Coeurdassier, M, De Vaufleury, A, & Badot, P-M. 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **45**(1), 0102–0109.

Coeurdassier, M, De Vaufleury, A, Scheifler, R, Morhain, E, & Badot, P-M. 2004. Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca : Gastropoda). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **72**(5), 1083–1090.

Coles, Jackie A, Farley, Sophia R, & Pipe, Richard K. 1995. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Diseases of Aquatic Organisms*, **22**(1), 59–65.

Conte, Angela, & Ottaviani, Enzo. 1995. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS letters*, **365**(2-3), 120–124.

Cooper, Edwin L, & Parrinello, Nicoló. 1996. Comparative immunologic models can enhance analyses of environmental immunotoxicity. *Annual Review of Fish Diseases*, **6**, 179–191.

Cooper, Max D, & Alder, Matthew N. 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, **124**(4), 815–822.

Côte, Jessica, Bouétard, Anthony, Pronost, Yannick, Besnard, Anne-Laure, Coke, Maïra, Piquet, Fabien, Caquet, Thierry, & Coutellec, Marie-Agnès. 2015. Genetic variation of *Lymnaea stagnalis* tolerance to copper : a test of selection hypotheses and its relevance for ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, **205**, 209–217.

Cousteau, Christine. 2009. Immunité des mollusques vecteurs de parasites humains.

Coutellec, Marie-Agnès, & Lagadic, Laurent. 2006. Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology*, **15**(2), 199–213.

Coutellec, Marie-Agnès, Delous, Georges, Cravedi, Jean-Pierre, & Lagadic, Laurent. 2008. Effects of the mixture of diquat and a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on fecundity and progeny early performances of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in laboratory bioassays and microcosms. *Chemosphere*, **73**(3), 326–336.

Coutellec, Marie-Agnès, Collinet, Marc, & Caquet, Thierry. 2011. Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology*, **20**(3), 524–534.

Coutellec, Marie-Agnès, Besnard, Anne-Laure, & Caquet, Thierry. 2013. Population genetics of *Lymnaea stagnalis* experimentally exposed to cocktails of pesticides. *Ecotoxicology*, **22**(5), 879–888.

Cox, Kingsley JA, Tensen, Cornelis P, Van der Schors, Roel C, Li, Ka Wan, van Heerikhuizen, Harm, Vreugdenhil, Erno, Geraerts, Wijnand PM, & Burke, Julian F. 1997. Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from *Lymnaea stagnalis* and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. *The Journal of neuroscience*, **17**(4), 1197–1205.

Crevel, RWR, Buckley, P, Robinson, JA, & Sanders, IJ. 1997. Immunotoxicological assessment of cyclosporin A by conventional pathological techniques and immune function testing in the rat. *Human & experimental toxicology*, **16**(2), 79–88.

Cuklev, Filip, Kristiansson, Erik, Fick, Jerker, Asker, Noomi, Förlin, Lars, & Larsson, DG. 2011. Diclofenac in fish : blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30**(9), 2126–2134.

CWQG, Canadian Water Quality Guidelines for the protection of Aquatic Life. 2014. Cadmium. *Canadian council of Ministers of the Environment*.

Czech, Petra, Weber, Klaus, & Dietrich, Daniel R. 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis L. Aquatic Toxicology*, **53**(2), 103–114.

Dagher, Ramzi, Johnson, John, Williams, Grant, Keegan, Patricia, & Pazdur, Richard. 2004. Accelerated approval of oncology products : a decade of experience. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**(20), 1500–1509.

Dagnino, Sonia, Gomez, Elena, Picot, Bernadette, Cavaillès, Vincent, Casellas, Claude, Balaguer, Patrick, & Fenet, Hélène. 2010. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Science of the total environment*, **408**(12), 2608–2615.

Dakeshita, Satoru, Kawai, Tomoko, Uemura, Hirokazu, Hiyoshi, Mineyoshi, Oguma, Etsuko, Horiguchi, Hyogo, Kayama, Fujio, Aoshima, Keiko, Shirahama, Satoshi, Rokutan, Kazuhito, *et al.* . 2009. Gene expression signatures in peripheral blood cells from Japanese women exposed to environmental cadmium. *Toxicology*, **257**(1), 25–32.

Dalesman, Sarah, Rundle, Simon D, & Cotton, Peter A. 2007. Predator regime influences innate anti-predator behaviour in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Freshwater Biology*, **52**(11), 2134–2140.

Dan, G, Lall, SB, & Rao, DN. 2000. Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. *Drug and chemical toxicology*, **23**(2), 349–360.

Daniele, Gaëlle, Fieu, Maëva, Joachim, Sandrine, James-Casas, Alice, Andres, Sandrine, Baudoin, Patrick, Bonnard, Marc, Bonnard, Isabelle, Geffard, Alain, & Vulliet, Emmanuelle. 2016. Development of a multi-residue analysis of diclofenac and some transformation products in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to samples from mesocosm studies. *Talanta*, **155**, 1–7.

Davison, A, & Blaxter, ML. 2005. An expressed sequence tag survey of gene expression in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, an intermediate vector of *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **130**(05), 539–552.

Dayrat, Benoît, Conrad, Michele, Balayan, Shaina, White, Tracy R, Albrecht, Christian, Golding, Rosemary, Gomes, Suzete R, Harasewych, MG, & de Frias Martins, António Manuel. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of pulmonate gastropods (Mollusca) : new insights from increased taxon sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **59**(2), 425–437.

De Boer, PACM, Jansen, RF, Koene, JM, & Ter Maat, A. 1997. Nervous control of

male sexual drive in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Experimental Biology*, **200**, 941–951.

de Freitas Rebelo, Mauro, de Souza Figueiredo, Eliane, Mariante, Rafael M, Nóbrega, Alberto, de Barros, Cintia Monteiro, & Allodi, Silvana. 2013. New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PloS one*, **8**(2), e57384.

De Jong-Brink, Marijke. 1995. How schistosomes profit from the stress responses they elicit in their hosts. *Advances in parasitology*, **35**, 177–256.

De Lange, RPJ, Van Golen, FA, & Van Minnen, J. 1997. Diversity in cell specific coexpression of four neuropeptide genes involved in control of male copulation behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **78**(1), 289–299.

De Montaudouin, Xavier, Paul-Pont, Ika, Lambert, Christophe, Gonzalez, Patrice, Raymond, Natalie, Jude, Florence, Legeay, Alexia, Baudrimont, M, Dang, Cécile, Le Grand, F, *et al.* . 2010. Bivalve population health : multistress to identify hot spots. *Marine pollution bulletin*, **60**(8), 1307–1318.

De Schamphelaere, Karel AC, & Janssen, Colin R. 2010. Cross-phylum extrapolation of the Daphnia magna chronic biotic ligand model for zinc to the snail *Lymnaea stagnalis* and the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Science of the total environment*, **408**(22), 5414–5422.

De Vaufleury, A Gomot, & Pihan, F. 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, **40**(3), 275–284.

de Vaufleury, Annette. 2015. Landsnail for ecotoxicological assessment of chemicals and soil contamination–ecotoxicological assessment of chemicals and contaminated soils using the terrestrial snail, *Helix aspersa*, at various stage of its life cycle : a review. *Pages 365–391 of : Environmental Indicators*. Springer.

De Zoysa, Mahanama, & Lee, Jehee. 2009. Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2) homologue in disk abalone : cloning, sequence characterization and expression analysis. *Fish & shellfish immunology*, **26**(3), 500–508.

De Zoysa, Mahanama, Jung, Sungju, & Lee, Jehee. 2009. First molluscan TNF-α homologue of the TNF superfamily in disk abalone : molecular characterization and expression analysis. *Fish & shellfish immunology*, **26**(4), 625–631.

De Zoysa, Mahanama, Nikapitiya, Chamilani, Kim, Yucheol, Oh, Chulhong, Kang, Do-Hyung, Whang, Ilson, Kim, Se-Jae, Lee, Jae-Seong, Choi, Cheol Young, & Lee, Jehee. 2010. Allograft inflammatory factor-1 in disk abalone (*Haliotis discus discus*) : molecular cloning, transcriptional regulation against immune challenge and tissue injury. *Fish & shellfish immunology*, **29**(2), 319–326.

Decker, Heinz, & Jaenicke, Elmar. 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, **28**(7), 673–687.

Decker, Heinz, & Tuczek, Felix. 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins : structural basis and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences*, **25**(8), 392–397.

Delignette-Muller, Marie Laure, Lopes, Christelle, Veber, Philippe, & Charles, Sandrine. 2014. Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. *Environmental science & technology*, **48**(13), 7544–7551.

Della Torre, Camilla, Bocci, Elena, Focardi, Silvano Ettore, & Corsi, Ilaria. 2014. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine environmental research*, **93**, 56–63.

Descotes, J. 1991. Immunotoxicology of cadmium. *IARC scientific publications*, 385–390.

Desouky, Mahmoud MA. 2006. Tissue distribution and subcellular localization of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration. *Aquatic toxicology*, **77**(2), 143–152.

Dewaal, ERIC J, Timmerman, Helga H, Dortant, Paul M, Kranjc, Magda AM, & Vanloveren, HENK. 1995. Investigation of a screening battery for immunotoxicity of pharmaceuticals within a 28-day oral toxicity study using azathioprine and cyclosporin A as model compounds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **21**(3), 327–338.

Di, Guilan, Zhang, Zhaoxia, & Ke, Caihuan. 2013. Phagocytosis and respiratory burst activity of haemocytes from the ivory snail, *Babylonia areolata*. *Fish & shellfish immunology*, **35**(2), 366–374.

Di Gioacchino, Mario, Petrarca, Claudia, Perrone, Angela, Farina, Massimo, Sabbioni, Enrico, Hartung, Thomas, Martino, Simone, Esposito, Diana L, Lotti, Lavinia Vittoria, & Mariani-Costantini, Renato. 2008. Autophagy as an ultrastructural marker of heavy metal toxicity in human cord blood hematopoietic stem cells. *Science of the total environment*, **392**(1), 50–58.

Dikkeboom, R, Van der Knaap, WP, Meuleman, EA, & Sminia, T. 1985a. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunology*, **55**(3), 547.

Dikkeboom, Ronald, van der Knaap, Wil PW, Meuleman, Elisabeth A, & Sminia, Taede. 1984. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and tissue research*, **238**(1), 43–47.

Dikkeboom, Ronald, Knaap, Wil PW, Maaskant, Janneke J, & Jonge, Abraham JR. 1985b. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnaea stagnalis* : a characterization using monoclonal antibodies. *Parasitology Research*, **71**(6), 815–819.

Dikkeboom, Ronald, Tijnagel, Jolanda MGH, Mulder, Elly C, & van der Knaap, Wil PW. 1987. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *Journal of invertebrate pathology*, **49**(3), 321–331.

Dikkeboom, Ronald, Bayne, Christopher J, van der Knaap, Wil PW, & Tijnagel, Jolanda MGH. 1988a. Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitology Research*, **75**(2), 148–154.

Dikkeboom, Ronald, van der Knapp, Wil PW, van den Bovenkamp, Wim, Tijnagel, Jolanda MGH, & Bayne, Christopher J. 1988b. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Developmental & Comparative Immunology*, **12**(3), 509–520.

Dikkeboom, Ronald, Tijnagel, Jolanda MGH, & van der Knaap, Wil PW. 1989. Monoclonal antibody recognized hemocyte subpopulations in juvenile and adult *Lymnaea stagnalis* : functional characteristics and lectin binding. *Developmental & Comparative Immunology*, **12**(1), 17–32.

Ding, Jianfeng, Wang, Rui, Yang, Feng, Zhao, Liqiang, Qin, Yanjie, Zhang, Guofan, & Yan, Xiwu. 2014. Identification and characterization of a novel phage-type like lysozyme from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Developmental & Comparative Immunology*, **47**(1), 81–89.

Directive 2013/39/EU, of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. 2013. European Parliament, Council of the European Union. *Off J Eur Union*, 1–17.

Dogterom, GE, Bohlken, S, & Joosse, J. 1983. Effect of the photoperiod on the time schedule of egg mass production in *Lymnaea stagnalis*, as induced by ovulation hormone injections. *General and comparative endocrinology*, **49**(2), 255–260.

Dogterom, Greet E, Thijssen, René, & van Loenhout, Harry. 1985. Environmental and hormonal control of the seasonal egg laying period in field specimens of *Lymnaea stagnalis*. *General and comparative endocrinology*, **57**(1), 37–42.

Doi, Hideyuki, Yurlova, Natalia I, Kikuchi, Eisuke, Shikano, Shuichi, Yadrenkina, Elena N, Vodyanitskaya, Svetlana N, & Zuykova, Elena I. 2010. Stable isotopes indicate individual level trophic diversity in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Molluscan Studies*, **76**(4), 384–388.

Donaghy, Ludovic, Lambert, Christophe, Choi, Kwang-Sik, & Soudant, Philippe. 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) : current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, **297**(1), 10–24.

Donaghy, Ludovic, Hong, Hyun-Ki, Lambert, Christophe, Park, Heung-Sik, Shim, Won Joon, & Choi, Kwang-Sik. 2010. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish & shellfish immunology*, **28**(1), 87–97.

Donaghy, Ludovic, Kraffe, Edouard, Le Goïc, Nelly, Lambert, Christophe, Volety, Aswani K, & Soudant, Philippe. 2012. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* : a mitochondrial involvement. *PloS one*, **7**(10), e46594.

Donaghy, Ludovic, Hong, Hyun-Ki, Jauzein, Cécile, & Choi, Kwang-Sik. 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish & shellfish immunology*, **42**(1), 91–97.

Duchemin, Matthieu. 2007. *Validation des outils immunotoxicologiques pour l'étude des effets biologiques des contaminants du milieu marin*. Ph.D. thesis, Université de Bretagne occidentale-Brest ; Institut National de la Recherche Scientifique.

Duchemin, Matthieu B, Fournier, Michel, & Auffret, Michel. 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, **264**(1), 73–81.

Duchemin, Matthieu B, Auffret, Michel, Wessel, Nathalie, Fortier, Marlène, Morin, Yves, Pellerin, Jocelyne, & Fournier, Michel. 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures. *Environmental pollution*, **153**(2), 416–423.

Ducrot, Virginie, Teixeira-Alves, Mickaël, Lopes, Christelle, Delignette-Muller, Marie-Laure, Charles, Sandrine, & Lagadic, Laurent. 2010a. Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* : a case-study with vinclozolin. *Ecotoxicology*, **19**(7), 1312–1321.

Ducrot, Virginie, Péry, Alexandre RR, & Lagadic, Laurent. 2010b. Modelling effects of diquat under realistic exposure patterns in genetically differentiated populations of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, **365**(1557), 3485–3494.

Ducrot, Virginie, Askem, Clare, Azam, Didier, Brettschneider, Denise, Brown, Rebecca, Charles, Sandrine, Coke, Maïra, Collinet, Marc, Delignette-Muller, Marie-Laure, Forfait-Dubuc, Carole, *et al.* . 2014. Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **70**(3), 605–614.

Dumètre, Aurélien, Aubert, Dominique, Puech, Pierre-Henri, Hohweyer, Jeanne, Azas, Nadine, & Villena, Isabelle. 2012. Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Applied and environmental microbiology*, **78**(4), 905–912.

Dyakonova, Varvara, Hernádi, László, Ito, Etsuro, Dyakonova, Taisia, Zakharov, Igor, & Sakharov, Dmitri. 2015. The activity of isolated snail neurons controlling locomotion is affected by glucose. *BIOPHYSICS*, **11**(0), 55–60.

Elangovan, R, White, KN, & McCrohan, CR. 1997. Bioaccumulation of aluminium in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* at neutral pH. *Environmental Pollution*, **96**(1), 29–33.

Elger, A, & Lemoine, Damien. 2005. Determinants of macrophyte palatability to the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Freshwater Biology*, **50**(1), 86–95.

Elinder, Carl-Gustaf, Edling, Christer, Lindberg, Erik, Kågedal, Bertil, & Vesterberg, Olof. 1985. β2-microglobulinuria among workers previously exposed to cadmium : follow-up and dose-response analyses. *American journal of industrial medicine*, **8**(6), 553–564.

Ericson, Hanna, Thorsén, Gunnar, & Kumblad, Linda. 2010. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology*, **99**(2), 223–231.

Evariste, Lauris, Auffret, Michel, Audonnet, Sandra, Geffard, Alain, David, Elise, Brousseau, Pauline, Fournier, Michel, & Betoulle, Stéphane. 2016. Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha*. *Fish & Shellfish Immunology*, **56**, 144–154.

Farcy, E, Gagné, F, Martel, L, Fortier, M, Trépanier, S, Brousseau, P, & Fournier, M. 2011. Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environmental research*, **111**(8), 1096–1106.

Fawcett, Lynda B, & Tripp, Marenes R. 1994. Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to bacteria *in vitro*. *Journal of invertebrate pathology*, **63**(3), 275–284.

Fedonkin, Mikhail A, & Waggoner, Benjamin M. 1997. The Late Precambrian fossil Kimberella is a mollusc-like bilaterian organism. *Nature*, **388**(6645), 868–871.

Feito, Raquel, Valcárcel, Yolanda, & Catalá, Myriam. 2012. Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays : diclofenac as a case study. *Ecotoxicology*, **21**(1), 289–296.

Feng, ZP, Zhang, Z, Van Kesteren, RE, Straub, VA, Van Nierop, P, Jin, K, Nejatbakhsh, N, Goldberg, JI, Spencer, GE, Yeoman, MS, *et al.* . 2009. Transcriptome analysis of the central nervous system of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *BMC genomics*, **10**(1), 1.

Fent, Karl, Kunz, Petra Y, & Gomez, Elena. 2008. UV filters in the aquatic environment induce hormonal effects and affect fertility and reproduction in fish. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, **62**(5), 368–375.

Ferguson, Graham P, & Benjamin, PAUL R. 1991a. The whole-body withdrawal response of *Lymnaea stagnalis*. I. Identification of central motoneurones and muscles. *Journal of Experimental Biology*, **158**(1), 63–95.

Ferguson, Graham P, & Benjamin, PAUL R. 1991b. The whole-body withdrawal response of *Lymnaea stagnalis*. II. Activation of central motoneurones and muscles by sensory input. *Journal of Experimental Biology*, **158**(1), 97–116.

Ferrari, Benoit, Paxeus, Nicklas, Giudice, Roberto Lo, Pollio, Antonino, & Garric, Jeanne. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters : study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**(3), 359–370.

Ferrari, Benoĭt, Mons, Raphael, Vollat, Bernard, Fraysse, Benoĭt, Paxēaus, Nicklas, Giudice, Roberto Lo, Pollio, Antonino, & Garric, Jeanne. 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals : are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment ? *Environmental toxicology and chemistry*, **23**(5), 1344–1354.

Février, Yann, Russo, Jacqueline, & Madec, Luc. 2009. Intraspecific variation in life history traits of a land snail after a bacterial challenge. *Journal of Zoology*, **277**(2), 149–156.

Fidder, Bridgette N. 2015. *The toxicological effects of pyraclostrobin on the energy allocation pattern of the freshwater gastropod, Lymnaea stagnalis*. Ph.D. thesis, Texas Tech University.

Fogarty, Robert V, & Tobin, John M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**(4), 311–317.

for the Testing of Chemicals, OECD Guidelines. 2006. Summary of considerations in the report from the OECD expert groups on short-term and long-term toxicology. *Section 4*.

Ford, Susan E, & Haskin, Harold H. 1988. Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, **90**(1), 183–187.

Ford, Susan E, & Paillard, Christine. 2007. Repeated sampling of individual bivalve mollusks I : Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Fish & shellfish immunology*, **23**(2), 280–291.

Ford, Susan E, Kanaley, Sheila A, & Littlewood, DTJ. 1993. Cellular responses of oysters infected with Haplosporidium nelsoni : changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *Journal of invertebrate pathology*, **61**(1), 49–57.

Fournier, M, Pellerin, J, Clermont, Y, Morin, Y, & Brousseau, P. 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology*, **161**(3), 201–211.

Fournier, M, Pellerin, J, Lebeuf, M, Brousseau, P, Morin, Y, & Cyr, D. 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic toxicology*, **59**(1), 83–92.

Franceschi, Claudio, Cossarizza, Andrea, Monti, Daniela, & Ottaviani, Enzo. 1991. Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.)(Gastropoda pulmonata) : implications for the evolution of natural killer cells. *European journal of immunology*, **21**(2), 489–493.

Franchi, Nicola, & Ballarin, Loriano. 2013. Influence of cadmium on the morphology and functionality of haemocytes in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, **158**(1), 29–35.

Franchini, A, & Ottaviani, E. 2000. Repair of molluscan tissue injury : role of PDGF and TGF-β. *Tissue and Cell*, **32**(4), 312–321.

Frỳda, Jirí, Nützel, Alex, & Wagner, Peter J. 2008. Paleozoic gastropoda. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*, 239–270.

Gagnaire, Beatrice, Thomas-Guyon, H, & Renault, Tristan. 2004. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, **16**(4), 501–512.

Gagnaire, Beatrice, Gay, Melanie, Huvet, Arnaud, Daniel, Jean-Yves, Saulnier, Denis, & Renault, Tristan. 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge : *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic toxicology*, **84**(1), 92–102.

Gagné, F, Blaise, C, Aoyama, I, Luo, R, Gagnon, C, Couillard, Y, Campbell, P, & Salazar, M. 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environmental toxicology*, **17**(3), 149–159.

Gagné, F, André, C, Cejka, P, Hausler, R, Fournier, M, & Blaise, C. 2008. Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation : a pilot plant study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**(3), 366–373.

Gagnon, C, Turcotte, P, Trépanier, S, Gagné, F, & Cejka, P-J. 2014. Impacts of municipal wastewater oxidative treatments : changes in metal physical speciation and bioavailability. *Chemosphere*, **97**, 86–91.

Gál, József, Bobkova, Marina V, Zhukov, Valery V, Shepeleva, Irina P, & Meyer-Rochow, V Benno. 2004. Fixed focal-length optics in pulmonate snails (Mollusca, Gastropoda) : squaring phylogenetic background and ecophysiological needs (II). *Invertebrate Biology*, **123**(2), 116–127.

Galloway, Tamara S, & Depledge, Michael H. 2001. Immunotoxicity in invertebrates : measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, **10**(1), 5–23.

Galloway, TS, & Handy, RD. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides Ecotoxicology 12 : 345–363. *Find this article online*.

Gan, Tong J. 2010. Diclofenac : an update on its mechanism of action and safety profile. *Current medical research and opinion*, **26**(7), 1715–1731.

Gardner, Martin J, & Altman, Douglas G. 1986. Confidence intervals rather than P values : estimation rather than hypothesis testing. *Br Med J (Clin Res Ed)*, **292**(6522), 746–750.

Garric, Jeanne. 2009. L'écotoxicologie : entre recherche et applications, quelques notions introductives. *La démarche écotoxicologique pour la protection et l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques (Zone Atelier Bassin du Rhône)*.

Gélinas, Malorie, Fortier, Marlene, Lajeunesse, André, Fournier, Michel, Gagnon, Christian, & Gagné, François. 2013. Energy status and immune system alterations in *Elliptio complanata* after ingestion of cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*. *Ecotoxicology*, **22**(3), 457–468.

Gerecke, Andreas C, Schärer, Michael, Singer, Heinz P, Müller, Stephan R, Schwarzenbach, René P, Sägesser, Martin, Ochsenbein, Ueli, & Popow, Gabriel. 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland : pesticide load through waste water treatment plants—-current situation and reduction potential. *Chemosphere*, **48**(3), 307–315.

Giusti, Arnaud. 2013. *Impacts of EDC on the hermaphroditic freshwater snail Lymnaea stagnalis*. Ph.D. thesis, University of Liege.

Giusti, Arnaud, Lagadic, Laurent, Barsi, Alpar, Thomé, Jean-Pierre, Joaquim-Justo, Célia, & Ducrot, Virginie. 2014. Investigating apical adverse effects of four endocrine active substances in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*, **493**, 147–155.

Gnatyshyna, LL, Fal'fushinskaya, GI, Golubev, OP, Dallinger, R, & Stoliar, OB. 2011. Role of metallothioneins in adaptation of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca : Pulmonata) to environment pollution. *Hydrobiological Journal*, **47**(5).

Gomez-Mendikute, A, & Cajaraville, MP. 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo [a] pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in vitro*, **17**(5), 539–546.

Gomot, Annette. 1998. Toxic Effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicology and environmental safety*, **41**(3), 288–297.

Gomot, Annette, & Pihan, François. 1997. Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (Helix). *Ecotoxicology and environmental safety*, **38**(2), 85–94.

Gomot-de Vaufleury, A, & Kerhoas, I. 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **64**(3), 434–442.

Gonsette, RE, Demonty, L, & Delmotte, P. 1977. Intensive immunosuppression with cyclophosphamide in multiple sclerosis. *Journal of neurology*, **214**(3), 173–181.

Gopalakrishnan, Singaram, Thilagam, Harikrishnan, Huang, Wei-Bin, & Wang, Ke-Jian. 2009. Immunomodulation in the marine gastropod Haliotis diversicolor exposed to benzo (a) pyrene. *Chemosphere*, **75**(3), 389–397.

Graham, Andrea L, Allen, Judith E, & Read, Andrew F. 2005. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 373–397.

Graham, Andrea L, Hayward, Adam D, Watt, Kathryn A, Pilkington, Jill G, Pemberton, Josephine M, & Nussey, Daniel H. 2010. Fitness correlates of heritable variation in antibody responsiveness in a wild mammal. *Science*, **330**(6004), 662–665.

Granger, D, Capdeville, M-J, Dumora, C, Dufour, V, Polard, T, Gonthier, A, Mazerat, S, Ducos, T, Dalcin, W, Cruz, J, *et al.* . 2016. Stratégie de réduction des micropolluants à l'échelle d'une agglomération : comparaison entre les effluents d'exutoires pluviaux et d'une station d'épuration. *Pollution des rejets urbains de temps de pluie/Pollution of wet weather flow-Acquisition de données/Data acquisition*.

Grant Reid, Iain. 2013. *Geographical variation in life history response to stress in the freshwater snail, Lymnaea stagnalis*. Ph.D. thesis, Edinburgh Napier University.

Grimaldi, Anna Maria, Belcari, Paola, Pagano, Ester, Cacialli, Franco, & Locatello, Lisa. 2013. Immune responses of *Octopus vulgaris* (Mollusca : Cephalopoda) exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **447**, 123–127.

Grosell, Martin, Gerdes, Robert M, & Brix, Kevin V. 2006. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates — *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**(1), 97–104.

Grote-Koska, Denis, Czajkowski, Stefan, Klauke, Rainer, Panten, Eva, Brand, Korbinian, & Schumann, Gerhard. 2014. A candidate reference measurement procedure for Cyclosporine A in whole blood. *Accreditation and Quality Assurance*, **19**(3), 147–157.

Guernic, Antoine Le, Felix, Christophe, Bigot, Aurélie, David, Elise, Dedourge-Geffard, Odile, Geffard, Alain, & Betoulle, Stéphane. 2015. Food deprivation and modulation of hemocyte activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Journal of Shellfish Research*, **34**(2), 423–431.

Gust, M, Fortier, M, Garric, J, Fournier, M, & Gagné, F. 2013a. Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*, **445**, 210–218.

Gust, M, Fortier, M, Garric, J, Fournier, M, & Gagné, F. 2013b. Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology*, **126**, 393–403.

Gust, Marion, Buronfosse, Thierry, Geffard, Olivier, Mons, Raphael, Queau, Herve, Mouthon, Jacques, & Garric, Jeanne. 2010. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. *Water research*, **44**(15), 4517–4528.

Gust, Marion, Gagné, Francois, Berlioz-Barbier, Alexandra, Besse, JP, Buronfosse, Thierry, Tournier, Mikaël, Tutundjian, Renaud, Garric, Jeanne, & Cren-Olivé, Cécile. 2014. Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as an integrated field biomonitoring tool : exposure assessment and reprotoxic effects of water column contamination. *water research*, **54**, 222–236.

Hahn, Bevra H, Knotts, Linda, Ng, Mary, & Hamilton, Tom R. 1975. Influence of cyclophosphamide and other immunosuppressive drugs on immune disorders and neoplasia in NZB/NZW mice. *Arthritis & Rheumatism*, **18**(2), 145–152.

Hahn, Ulrike K, Bender, Randall C, & Bayne, Christopher J. 2000. Production of reactive oxygen species by hemocytes of Biomphalaria glabrata : carbohydrate-specific stimulation. *Developmental & Comparative Immunology*, **24**(6), 531–541.

Harley, Sarah S. 2008. Nanoecotoxicity testing with *Lymnaea stagnalis*. *www.safenano.org*.

Harrison, Paul Thomas Clifford. 1978. *Studies on temperature acclimation in the freshwater pulmonate mollusc Lymnaea stagnalis (L.)*. Ph.D. thesis.

Hartmann, Markus, Mayer-Nicolai, Christine, & Pfaff, Otmar. 2013. Approval probabilities and regulatory review patterns for anticancer drugs in the European Union. *Critical reviews in oncology/hematology*, **87**(2), 112–121.

Hatakeyama, Dai, Fujito, Yutaka, Sakakibara, Manabu, & Ito, Etsuro. 2004. Expression and distribution of transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein in the central nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Cell and tissue research*, **318**(3), 631–641.

Haukoos, Jason S, & Lewis, Roger J. 2005. Advanced statistics : bootstrapping confidence intervals for statistics with "difficult" distributions. *Academic emergency medicine*, **12**(4), 360–365.

Hélène, Arambourou, & Robby, Stoks. 2015. Warmer winters modulate life history and energy storage but do not affect sensitivity to a widespread pesticide in an aquatic insect. *Aquatic Toxicology*, **167**, 38–45.

Hermann, Corinna, von Aulock, Sonja, Graf, Kathrin, & Hartung, Thomas. 2003. A model of human whole blood lymphokine release for *in vitro* and *ex vivo* use. *Journal of immunological methods*, **275**(1), 69–79.

Hermann, Petra M, Park, Deborah, Beaulieu, Emily, & Wildering, Willem C. 2013. Evidence for inflammation-mediated memory dysfunction in gastropods : putative PLA 2 and COX inhibitors abolish long-term memory failure induced by systemic immune challenges. *BMC neuroscience*, **14**(1), 1.

Hoeger, Birgit, Köllner, Bernd, Dietrich, Daniel R, & Hitzfeld, Bettina. 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, **75**(1), 53–64.

Hoek, Robert M, Smit, August B, Frings, Heleen, Vink, Jacqueline M, de Jong-Brink, Marijke, & Geraerts, Wijnand PM. 1996. A new Ig-superfamily member, molluscan defence molecule (MDM) from *Lymnaea stagnalis*, is down-regulated during parasitosis. *European journal of immunology*, **26**(4), 939–944.

Hohagen, Jennifer, & Jackson, Daniel J. 2013. An ancient process in a modern mollusc : early development of the shell in *Lymnaea stagnalis*. *BMC developmental biology*, **13**(1), 1.

Hooper, Celia, Day, Rob, Slocombe, Ron, Handlinger, Judith, & Benkendorff, Kirsten. 2007. Stress and immune responses in abalone : limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology*, **22**(4), 363–379.

Horak, P, & Deme, R. 1998. Lectins and saccharides inLymnaea stagnalis haemocyte recognition. *Comparative Haematology International*, **8**(4), 210–218.

Horák, P, Neeleman, AP, Van der Knaap, WPW, & Sminia, T. 1998. Effect of saccharides on plasma mediated haemagglutination and in vitro phagocytosis by haemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Haematology International*, **8**(1), 43–49.

Howard, David H, Bach, Peter B, Berndt, Ernst R, & Conti, Rena M. 2015. Pricing in the market for anticancer drugs. *The Journal of Economic Perspectives*, **29**(1), 139–162.

Hudson, Michelle Lynn Sawyers. 2013. *Ecotoxicology of Gold Nanomaterials : effects on periphyton, L. Stagnalis, and H. Azteca in an aquatic food chain study*. Ph.D. thesis, University of Michigan.

Hughes, Francis M, Foster, Brent, Grewal, Snimar, & Sokolova, Inna M. 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish & shellfish immunology*, **29**(2), 247–257.

Ings, RMJ. 1984. The melanin binding of drugs and its implications. *Drug metabolism reviews*, **15**(5-6), 1183–1212.

Insee. www.insee.fr.

Islas-Flores, Hariz, Gómez-Oliván, Leobardo Manuel, Galar-Martínez, Marcela, Colín-Cruz, Arturo, Neri-Cruz, Nadia, & García-Medina, Sandra. 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, **92**, 32–38.

Ito, E, Kojima, S, Lukowiak, K, & Sakakibara, M. 2013. From likes to dislikes : conditioned taste aversion in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Canadian Journal of Zoology*, **91**(6), 405–412.

Ito, Etsuro, Kobayashi, Suguru, Kojima, Satoshi, Sadamoto, Hisayo, & Hatakeyama, Dai. 1999. Associative learning in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Zoological Science*, **16**(5), 711–723.

Janse, C, Van der Wilt, GJ, Van der Plas, J, & Van der Roest, M. 1985. Central and peripheral neurones involved in oxygen perception in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, **82**(2), 459–469.

Jeong, Kathleen H, Lie, Kian Joe, & Heyneman, Donald. 1983. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, **7**(2), 217–228.

Johnson, John R, Ning, Yang-Min, Farrell, Ann, Justice, Robert, Keegan, Patricia, & Pazdur, Richard. 2011. Accelerated approval of oncology products : the food and drug administration experience. *Journal of the National Cancer Institute*, **103**(8), 636–644.

Joky, Alexandre, Matricon-Gondran, Michelle, & Benex, Jacqueline. 1985. Response to the amoebocyte-producing organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni miracidia*. *Journal of invertebrate pathology*, **45**(1), 28–33.

Juhlin, Tord, Björkman, Sven, Gunnarsson, Bodil, Fyge, Åsa, Roth, Bodil, & Höglund, Peter. 2004. Acute administration of diclofenac, but possibly not long term low dose aspirin, causes detrimental renal effects in heart failure patients treated with ACE-inhibitors. *European journal of heart failure*, **6**(7), 909–916.

Juma, FD, Rogers, HJ, & Trounce, JR. 1979. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and alkylating activity in man after intravenous and oral administration. *British journal of clinical pharmacology*, **8**(3), 209–217.

Jumel, Audrey, Coutellec, Marie-Agnes, Cravedi, Jean-Pierre, & Lagadic, Laurent. 2002. Nonylphenol polyethoxylate adjuvant mitigates the reproductive toxicity of fomesafen on the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* in outdoor experimental ponds. *Environmental toxicology and chemistry*, **21**(9), 1876–1888.

Kabata-Pendias, Alina. 1993. Behavioural properties of trace metals in soils. *Applied geochemistry*, **8**, 3–9.

Kandel, Éric. 2007. *À la recherche de la mémoire : Une nouvelle théorie de l'esprit*. Odile Jacob.

Kanzler, S, Gerken, G, Dienes, HP, Meyer, zum Büschenfelde KH, & Lohse, AW. 1997. Cyclophosphamide as alternative immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis–report of three cases. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, **35**(7), 571–578.

Karanova, MV, & Gakhova, EN. 2007. Biochemical strategy of survival of the freshwater mollusc *Lymnaea stagnalis* at near-zero temperatures. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **43**(3), 310–317.

Kari, Gabor, Rodeck, Ulrich, & Dicker, Adam P. 2007. Zebrafish : an emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **82**(1), 70–80.

Katalin, V, Fernandez, Dalia Salabarria, Salánki, János, *et al.* . 1988. Heavy metal concentrations of *Lymnaea stagnalis* L. in the environs of lake Balaton (Hungary). *Water Research*, **22**(10), 1205–1210.

Kawai, Taro, & Akira, Shizuo. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, **21**(4), 317–337.

Kefford, Ben J, & Zalizniak, Liliana. 2013. Stimulatory responses, hormesis, and essentiality, in ecotoxicology. *Pages 1097–1104 of : Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer.

Kendall, SB, *et al.* . 1949. *Lymnaea stagnalis* as an intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Nature*, **163**(4153), 880–881.

Kerkhoven, RM, Croll, RP, Van Minnen, J, Bogerd, J, Ramkema, MD, Lodder, H, & Boer, HH. 1991. Axonal mapping of the giant peptidergic neurons VD1 and RPD2 located in the CNS of the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with particular reference to the innervation of the auricle of the heart. *Brain research*, **565**(1), 8–16.

Klimisch, H-J, Andreae, M, & Tillmann, U. 1997. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory toxicology and pharmacology*, **25**(1), 1–5.

Köck-Schulmeyer, Marianne, Villagrasa, Marta, de Alda, Miren López, Céspedes-Sánchez, Raquel, Ventura, Francesc, & Barceló, Damià. 2013. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of the total environment*, **458**, 466–476.

Koene, Joris M. 2010. Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails : mechanisms and evolution. *Frontiers in behavioral neuroscience*, **4**, 167.

Koene, Joris M, & Ter Maat, Andries. 2007. Coolidge effect in pond snails : male motivation in a simultaneous hermaphrodite. *BMC Evolutionary Biology*, **7**(1), 212.

Koene, Joris M, Montagne-Wajer, Kora, & Ter Maat, Andries. 2006. Effects of frequent mating on sex allocation in the simultaneously hermaphroditic great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **60**(3), 332–338.

Kojima, Satoshi, Yamanaka, Mari, Fujito, Yutaka, & Ito, Etsuro. 1996. Differential neuroethological effects of aversive and appetitive reinforcing stimuli on associative learning in *Lymnaea stagnalis*. *Zoological Science*, **13**(6), 803–812.

Kontreczky, CS, Farkas, A, Nemcsok, J, & Salanki, J. 1997. Short-and long-term effects of Deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea L.*). *Ecotoxicology and environmental safety*, **38**(3), 195–199.

Korneev, Sergei, & O'Shea, Michael. 2002. Evolution of nitric oxide synthase regulatory genes by DNA inversion. *Molecular biology and evolution*, **19**(8), 1228–1233.

Korneev, Sergei A, Piper, Marian R, Picot, Joanna, Phillips, Rose, Korneeva, Elena I, & O'Shea, Michael. 1998. Molecular characterization of NOS in a mollusc : expression in a giant modulatory neuron. *Journal of neurobiology*, **35**(1), 65–76.

Kortet, Raine, & Vainikka, Anssi. 2008. Seasonality of innate immunity ; evolutionary aspects and latest updates. *New Research on Innate Immunity. New York : Nova Science Publishers Inc*, 13–45.

Kremer, Natacha, Schwartzman, Julia, Augustin, René, Zhou, Lawrence, Ruby, Edward G, Hourdez, Stéphane, & McFall-Ngai, Margaret J. 2014. The dual nature of haemocyanin in the establishment and persistence of the squid–vibrio symbiosis. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, **281**(1785), 20140504.

Kruse, Michael, Steffen, Renate, Batel, Renato, Muller, IM, & Muller, WE. 1999. Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto-and allograft response in marine sponges. *Journal of Cell Science*, **112**(23), 4305–4313.

Kryukova, Natalia A, Yurlova, Natalia I, Rastyagenko, Natalia M, Antonova, Elena V, & Glupov, Viktor V. 2014. The influence of Plagiorchis mutationis larval infection on the cellular immune response of the snail host *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of parasitology*, **100**(3), 284–287.

Kudlai, O, *et al.* . 2009. The discovery of the intermediate host for the trematode *Moliniella anceps* (Trematoda, Echinostomatidae) in Ukraine. *Vestn. Zool*, **43**, e11–e13.

Kumar, Anoop, Bhaskar, Amand, Chandra, Saket, Sasmal, D, Mukhopadhyay, Kunal Mukhopadhyay, & Sharma, Neelima. 2015. Mechanism of deltamethrin induced immunotoxicity : current and future perspectives. *Receptors & Clinical Investigation*, **2**(2).

Kümmerer, Klaus. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use–present knowledge and future challenges. *Journal of environmental management*, **90**(8), 2354–2366.

Kuper, C Frieke, Van Zijverden, Maaike, Klaassen, Carlijn, Tegelenbosch-Schouten, Mariska, & Wolterbeek, Andre PM. 2007. Effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on Peyer's patches in rat, exposed in utero and neonatally or during adult age. *Toxicologic pathology*, **35**(2), 226–232.

Kurt, Deniz, & KAYIŞ, TAMER. 2015. Effects of the pyrethroid insecticide deltamethrin on the hemocytes of *Galleria mellonella*. *Turkish Journal of Zoology*, **39**(3), 452–457.

Lacaze, E, Devaux, Alain, Bony, Sylvie, Bruneau, A, André, C, Pelletier, M, & Gagné, F. 2013. Genotoxic impact of a municipal effluent dispersion plume in the freshwater mussel *Elliptio complanata* : an in situ study. *Journal of Xenobiotics*, **3**(1S), 6.

Ladhar-Chaabouni, Rim, Machreki-Ajmi, Monia, Serpentini, Antoine, Lebel, Jean-Marc, & Hamza-Chaffai, Amel. 2015. Does a short-term exposure to cadmium chloride affects haemocyte parameters of the marine gastropod *Haliotis tuberculata* ? *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(22), 17343–17349.

Lagadic, Laurent, Caquet, Thierry, Amiard, Jean-Claude, & Ramade, Fran¸cois. 1998. Biomarqueurs en écotoxicologie — Aspects fondamentaux.

Lagadic, Laurent, Coutellec, Marie-Agnès, & Caquet, Thierry. 2007. Endocrine disruption in aquatic pulmonate molluscs : few evidences, many challenges. *Ecotoxicology*, **16**(1), 45–59.

Lambert, Christophe, Soudant, Philippe, Jegaden, Marine, Delaporte, Maryse, Labreuche, Yannick, Moal, Jeanne, & Samain, Jean-François. 2007. *In vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture*, **270**(1), 413–421.

Lammel, Tobias, Boisseaux, Paul, Fernández-Cruz, Maria-Luisa, & Navas, José M. 2013. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and fibre toxicology*, **10**(1), 1.

Lammel, Tobias, Boisseaux, Paul, & Navas, José M. 2015. Potentiating effect of graphene nanomaterials on aromatic environmental pollutant-induced cytochrome P450 1A expression in the topminnow fish hepatoma cell line PLHC-1. *Environmental toxicology*, **30**(10), 1192–1204.

Lance, Emilie, Brient, Luc, Bormans, Myriam, & Gérard, Claudia. 2006. Interactions between cyanobacteria and gastropods : I. ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnaea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. *Aquatic Toxicology*, **79**(2), 140–148.

Lance, Emilie, Desprat, Julia, Holbech, Bente Frost, Gérard, Claudia, Bormans, Myriam, Lawton, Linda A, Edwards, Christine, & Wiegand, Claudia. 2016. Accumulation and detoxication responses of the gastropod *Lymnaea stagnalis* to single and combined exposures to natural (cyanobacteria) and anthropogenic (the herbicide RoundUp® Flash) stressors. *Aquatic Toxicology*, **177**, 116–124.

Langezaal, I, Coecke, S, & Hartung, T. 2001. Whole blood cytokine response as a measure of immunotoxicity. *Toxicology in vitro*, **15**(4), 313–318.

Latire, Thomas, Le Pabic, Charles, Mottin, Elmina, Mottier, Antoine, Costil, Katherine, Koueta, Noussithé, Lebel, Jean-Marc, & Serpentini, Antoine. 2012. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic toxicology*, **109**, 213–221.

Le Foll, Frank, Rioult, Damien, Boussa, Sofiane, Pasquier, Jennifer, Dagher, Zeina, & Leboulenger, François. 2010. Characterisation of Mytilus edulis hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish & shellfish immunology*, **28**(2), 372–386.

Le Guernic, Antoine, Sanchez, Wilfried, Palluel, Olivier, Bado-Nilles, Anne, Floriani, Magali, Turies, Cyril, Chadili, Edith, Della Vedova, Claire, Cavalié, Isabelle, Adam-Guillermin, Christelle, *et al.* . 2016. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology*, **25**(8), 1478–1499.

Lebel, Jean-Marc, Giard, Wilfrid, Favrel, Pascal, & Boucaud-Camou, Eve. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biology of the Cell*, **86**(1), 67–72.

Leclercq, Marie, Mathieu, Olivier, Gomez, Elena, Casellas, Claude, Fenet, Hélène, & Hillaire-Buys, Dominique. 2009. Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **56**(3), 408–415.

Lee, Jinyoung, Ji, Kyunghee, Kho, Young Lim, Kim, Pilje, & Choi, Kyungho. 2011. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and environmental safety*, **74**(5), 1216–1225.

Lee, Youngdeuk, Choi, Jin-young, Oh, Chulhong, Kang, Do-Hyoung, Choi, Su-young, Heo, Gang-Joon, Lee, Jehee, & De Zoysa, Mahanama. 2014. Molecular cloning and characterization of SOCS-2 from Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Fish & shellfish immunology*, **36**(2), 453–458.

Legierse, Karin CHM, Sijm, Dick THM, van Leeuwen, Cees J, Seinen, Willem, & Hermens, Joop LM. 1998. Bioconcentration kinetics of chlorobenzenes and the organophosphorus pesticide chlorthion in the pond snail *Lymnaea stagnalis*—a comparison with the guppy P*oecilia reticulata*. *Aquatic toxicology*, **41**(4), 301–323.

Leicht, Katja, Jokela, Jukka, & Seppälä, Otto. 2013. An experimental heat wave changes immune defense and life history traits in a freshwater snail. *Ecology and evolution*, **3**(15), 4861–4871.

Lelouard, Hugues, Ferrand, Vincent, Marguet, Didier, Bania, Jacek, Camosseto, Voahirana, David, Alexandre, Gatti, Evelina, & Pierre, Philippe. 2004. Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *The Journal of cell biology*, **164**(5), 667–675.

Léonard, Pascale M, Adema, Coen M, Zhang, Si-Ming, & Loker, Eric S. 2001. Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalariaglabrata*. *Gene*, **269**(1), 155–165.

Leung, Kenneth MY, Grist, Eric PM, Morley, Neil J, Morritt, David, & Crane, Mark. 2007. Chronic toxicity of tributyltin to development and reproduction of the European freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Chemosphere*, **66**(7), 1358–1366.

Li, Shiguo, Liu, Yangjia, Liu, Chuang, Huang, Jingliang, Zheng, Guilan, Xie, Liping, & Zhang, Rongqing. 2016. Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish & shellfish immunology*, **51**, 263–270.

Lilienblum, W, Dekant, W, Foth, H, Gebel, T, Hengstler, JG, Kahl, R, Kramer, P-J, Schweinfurth, H, & Wollin, K-M. 2008. Alternative methods to safety studies in experimental animals : role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Archives of toxicology*, **82**(4), 211–236.

Little, Tom J, & Kraaijeveld, Alex R. 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**(2), 58–60.

Liu, M Maureen, Davey, John W, Jackson, Daniel J, Blaxter, Mark L, & Davison, Angus. 2014. A conserved set of maternal genes ? Insights from a molluscan transcriptome. *The International journal of developmental biology*, **58**, 501.

Lochmiller, Robert L, & Deerenberg, Charlotte. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology : just what is the cost of immunity ? *Oikos*, **88**(1), 87–98.

Loker, Eric. 2010. Gastropod immunobiology. *Pages 17–43 of : Invertebrate immunity*. Springer.

Loker, Eric S, Adema, Coen M, Zhang, Si-Ming, & Kepler, Thomas B. 2004. Invertebrate immune systems–not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological reviews*, **198**(1), 10–24.

Longley, Roger D, & Peterman, Misa. 2013. Neuronal control of pedal sole cilia in the pond snail *Lymnaea stagnalis appressa*. *Journal of Comparative Physiology A*, **199**(1), 71–86.

Lorenzon, S, Francese, M, Smith, VJ, & Ferrero, EA. 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & shellfish immunology*, **11**(6), 459–472.

Lowe, DM, Soverchia, C, & Moore, MN. 1995. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic toxicology*, **33**(2), 105–112.

Loy, C, & Haas, W. 2001. Prevalence of cercariae from *Lymnaea stagnalis* snails in a pond system in southern Germany. *Parasitology research*, **87**(10), 878–882.

Lu, Jian, Jin, Taiyi, Nordberg, Gunnar, & Nordberg, Monica. 2005. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium. *Toxicology and applied pharmacology*, **206**(2), 150–156.

Lukowiak, Ken, Sangha, Susan, McComb, Chloe, Varshney, Nishi, Rosenegger, David, Sadamoto, Hisayo, & Scheibenstock, Andi. 2003. Associative learning and memory in *Lymnaea stagnalis* : how well do they remember ? *Journal of Experimental Biology*, **206**(13), 2097–2103.

Lydeard, Charles, Cowie, Robert H, Ponder, Winston F, Bogan, Arthur E, Bouchet, Philippe, Clark, Stephanie A, Cummings, Kevin S, Frest, Terrence J, Gargominy, Olivier, Herbert, Dai G, *et al.* . 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, **54**(4), 321–330.

Madondo, Mutsa Tatenda, Quinn, Michael, & Plebanski, Magdalena. 2016. Low dose cyclophosphamide : Mechanisms of T cell modulation. *Cancer treatment reviews*, **42**, 3–9.

Mailler, Romain, Gasperi, Johnny, Coquet, Yves, Deshayes, Steven, Zedek, Sifax, Cren-Olivé, Cécile, Cartiser, Nathalie, Eudes, Véronique, Bressy, Adèle, Caupos, Emilie, *et al.* . 2015. Study of a large scale powdered activated carbon pilot : removals of a wide range of emerging and priority micropollutants from wastewater treatment plant effluents. *Water research*, **72**, 315–330.

Malagoli, D, Casarini, L, & Ottaviani, E. 2006. Monitoring of the immune efficiency of *Mytilus galloprovincialis* in adriatic sea mussel farms in 2005. *Inv. Surv. J*, **3**, 1–3.

Malagoli, D, Casarini, L, Fiori, F, & Ottaviani, E. 2008. Cytotoxic activity by the mussel Mytilus galloprovincialis and the Venus clam *Chamelea gallina* in the Adriatic sea in 2007. *Invertebrate Survival Journal*, **5**, 50–53.

Malfuson, Jean-Valère. 2014. *Rôle de la niche mésenchymateuse dans la régulation du phénotype SP des progéniteurs hématopoïétiques humains*. Ph.D. thesis, Citeseer.

Mamaca, Emina, Bechmann, Renee K, Torgrimsen, Sigfryd, Aas, Endre, Bjørnstad, Anne, Baussant, Thierry, & Le Floch, Stéphane. 2005. The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (Symphodus melops) exposed to styrene. *Aquatic Toxicology*, **75**(3), 191–201.

Marie, Benjamin. 2008. *Evolution des biominéralisations nacrées chez les mollusques : caractérisation moléculaire des matrices coquillières du céphalopode nautiloide Natilus macromphalus et du bivalve paléohétérodonte Unio pictorum*. Ph.D. thesis, Universiteé de Bourgogne.

Martens, Kara R, De Caigny, Pascaline, Parvez, Kashif, Amarell, Martin, Wong, Carolyn, & Lukowiak, Ken. 2007. Stressful stimuli modulate memory formation in *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiology of learning and memory*, **87**(3), 391–403.

Matozzo, V. 2014. Effects of pharmaceuticals on immune parameters of aquatic invertebrates. *ISJ*, **11**, 163–173.

Matozzo, V. 2016. Aspects of ecoimmunology in molluscs. *ISJ*, **13**, 116–121.

Matozzo, V, Ballarin, L, Pampanin, DM, & Marin, MG. 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **41**(2), 163–170.

McClelland, Gary, & Bourns, TKR. 1969. Effects of *Trichobilharzia ocellata* on growth, reproduction, and survival of *Lymnaea stagnalis*. *Experimental Parasitology*, **24**(2), 137–146.

Medzhitov, Ruslan, & Janeway, Charles A. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**(5566), 298–300.

Mehinto, Alvine C, Hill, Elizabeth M, & Tyler, Charles R. 2010. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental science & technology*, **44**(6), 2176–2182.

Merian, Ernest, *et al.* . 1991. *Metals and their compounds in the environment : occurrence, analysis and biological relevance*. VCH Verlagsgesellschaft mbH.

Meshcheryakov, VN. 1990. The common pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Pages 69–132 of : Animal species for developmental studies*. Springer.

Meuleman, Elisabeth A, Huyer, AR, & Luub, TWJ. 1984a. Injection of *Lymnaea stagnalis* with miracidia of *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology Research*, **70**(2), 275–278.

Meuleman, Elisabeth A, Huyer, AR, & Mooij, JH. 1984b. Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neth J Zool*, **34**, 414–7.

Mialhe, Eric, Boulo, Viviane, & Grizel, Henri. 1988. Bivale mollusc cell culture. *American Fisheries Society Special Publication*, **18**, 311–315.

Miege, Cécile, Gabet, V, Coquery, M, Karolak, S, Jugan, M-L, Oziol, L, Levi, Yves, & Chevreuil, M. 2009a. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **28**(2), 186–195.

Miege, Cecile, Choubert, JM, Ribeiro, L, Eusèbe, M, & Coquery, M. 2009b. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants–conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, **157**(5), 1721–1726.

Minguez, Laëtitia, Buronfosse, Thierry, Beisel, Jean-Nicolas, & Giambérini, Laure. 2012. Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination. *Environmental pollution*, **162**, 234–240.

Mitta, Guillaume, Vandenbulcke, Franck, Hubert, Florence, & Roch, Philippe. 1999. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J Cell Sci*, **112**(23), 4233–4242.

Mohamed, Azza H. 2011. Sublethal toxicity of roundup to immunological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* to *Schistosoma mansoni* infection. *Ecotoxicology and environmental safety*, **74**(4), 754–760.

Mohandas, A, Adema, CM, Van der Knaap, WPW, & Sminia, T. 1992. The effect of haemolymph extraction on distribution of lysosomal enzymes in *Lymnaea stagnalis* haemocytes : a cytochemical study. *Comparative Haematology International*, **2**(2), 61–67.

Monteil, JF, & Matricon-Gondran, M. 1991. Hemocyte production in trematode-infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology research*, **77**(6), 491–497.

Mottin, Elmina, Caplat, Christelle, Mahaut, Marie-Laure, Costil, Katherine, Barillier, Daniel, Lebel, Jean-Marc, & Serpentini, Antoine. 2010. Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish & shellfish immunology*, **29**(5), 846–853.

Mouthon, J. 1982. Les mollusques dulcicoles-Données biologiques et écologiques-Clés de détermination des principaux genres de bivalves et de gastéropodes de France. *Bulletin Français de Pisciculture*, 1–27.

Moyer, Thomas P, Post, Gregory R, Sterioff, Sylvester, & Anderson, Carl F. 1988. Cyclosporine nephrotoxicity is minimized by adjusting dosage on the basis of drug concentration in blood. *Pages 241–247 of : Mayo Clinic Proceedings*, vol. 63. Elsevier.

Müller, C, Ruby, S, Brousseau, P, Cyr, D, Fournier, M, & Gagné, F. 2009. Immunotoxicological effects of an activated-sludge-treated effluent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, **150**(3), 390–394.

Munley, Kathleen M, Brix, Kevin V, Panlilio, Jennifer, Deforest, David K, & Grosell, Martin. 2013. Growth inhibition in early life-stage tests predicts full life-cycle toxicity effects of lead in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic toxicology*, **128**, 60–66.

Mydlarz, Laura D, Jones, Laura E, & Harvell, C Drew. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 251–288.

Nakadera, Yumi, Swart, Elferra M, Maas, Jeroen PA, Montagne-Wajer, Kora, Ter Maat, Andries, & Koene, Joris M. 2015. Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behavioral Ecology*, **26**(1), 232–241.

Nakamura, Hiroshi, Kobayashi, Suguru, Kojima, Satoshi, Urano, Akihisa, & Ito, Etsuro. 1999. PKA-dependent regulation of synaptic enhancement between a buccal motor neuron and its regulatory interneuron in *Lymnaea stagnalis*. *Zoological science*, **16**(3), 387–394.

Nakayama, Koji, & Maruyama, Tadashi. 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Developmental & Comparative Immunology*, **22**(2), 151–159.

Nélieu, Sylvie, Bonnemoy, Frédérique, Bonnet, Jean-Louis, Lefeuvre, Luz, Baudiffier, Damien, Heydorff, Micheline, Quémeneur, Alphonse, Azam, Didier, Ducrot, Paul-Henri, Lagadic, Laurent, *et al.* . 2010. Ecotoxicological effects of diuron and chlorotoluron nitrate-induced photodegradation products : monospecific and aquatic mesocosm-integrated studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**(12), 2644–2652.

Newman, Michael C., & Unger, Michael A. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*.

Ng, Tania Y-T, Pais, Nish M, & Wood, Chris M. 2011. Mechanisms of waterborne Cu toxicity to the pond snail *Lymnaea stagnalis* : physiology and Cu bioavailability. *Ecotoxicology and environmental safety*, **74**(6), 1471–1479.

Nilsen, Inge W, Øverbø, Kersti, Sandsdalen, Erling, Sandaker, Elin, Sletten, Knut, & Myrnes, Bjørnar. 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS letters*, **464**(3), 153–158.

Nosanchuk, Joshua D, & Casadevall, Arturo. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology*, **5**(4), 203–223.

Nosanchuk, Joshua D, & Casadevall, Arturo. 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50**(11), 3519–3528.

Novas, Ana, Barcia, Ramiro, & Ramos-Martínez, Juan Ignacio. 2007. Implication of PKC in the seasonal variation of the immune response of the hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its role in interleukin-2-induced nitric oxide synthesis. *IUBMB life*, **59**(10), 659–663.

Nunez, PE, Ademal, CM, & de Jong-Brink, M. 1994. Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology*, **109**(03), 299–310.

Oaks, J Lindsay, Gilbert, Martin, Virani, Munir Z, Watson, Richard T, Meteyer, Carol U, Rideout, Bruce A, Shivaprasad, HL, Ahmed, Shakeel, Chaudhry, Muhammad Jamshed Iqbal, Arshad, Muhammad,

et al. . 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, **427**(6975), 630–633.

Oanh, Dth, Tien, Tran Viet, & Phuong, Nguyen Thanh. 2014. Effect of insecticide containing deltamethrin on immune response of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Asian Fisheries Science*, **27**, 90–103.

Okin, Daniel, & Medzhitov, Ruslan. 2012. Evolution of inflammatory diseases. *Current Biology*, **22**(17), R733–R740.

Olabarrieta, I, L'azou, B, Yuric, S, Cambar, J, & Cajaraville, MP. 2001. *In vitro* effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in vitro*, **15**(4), 511–517.

Oliver, Ana López-Serrano, Croteau, Marie-Noële, Stoiber, Tasha L, Tejamaya, Mila, Römer, Isabella, Lead, Jamie R, & Luoma, Samuel N. 2014. Does water chemistry affect the dietary uptake and toxicity of silver nanoparticles by the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*? *Environmental Pollution*, **189**, 87–91.

Orr, Michael V, El-Bekai, Malik, Lui, Melissa, Watson, Katrina, & Lukowiak, Ken. 2007. Predator detection in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Experimental Biology*, **210**(23), 4150–4158.

Ottaviani, Enzo. 1992. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.)(Gastropoda, Pulmonata). *Italian Journal of Zoology*, **59**(2), 129–139.

Oubella, R, Maes, P, Paillard, C, & Auffret, M. 1993. Experimentally induced variation in hemocyte density for Ruditapes philippinarum and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of aquatic organisms*, **15**(3), 193–197.

Ozaki, Noriatsu, Takamura, Yoshihiro, Kojima, Keisuke, & Kindaichi, Tomonori. 2015. Loading and removal of PAHs in a wastewater treatment plant in a separated sewer system. *Water research*, **80**, 337–345.

Pais, Nish M. 2012. Studies on Waterborne Cadmium Exposure to *Lymnaea stagnalis* in varying water qualities and the development of a novel tissue residue approach.

Pankey, Sabrina, Sunada, Hiroshi, Horikoshi, Tetsuro, & Sakakibara, Manabu. 2010. Cyclic nucleotide-gated channels are involved in phototransduction of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Comparative Physiology B*, **180**(8), 1205–1211.

Park, Eun-Mi, Kim, Young-Ok, Nam, Bo-Hye, Kong, Hee Jeong, Kim, Woo-Jin, Lee, Sang-Jun, Kong, In-Soo, & Choi, Tae-Jin. 2008. Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-α factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, **24**(1), 11–17.

Parolini, Marco, Binelli, Andrea, & Provini, Alfredo. 2011. Assessment of the potential cyto–genotoxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water, Air, & Soil Pollution*, **217**(1-4), 589–601.

Parrinello, Nicolò, & Arizza, Vincenzo. 1992. Cytotoxic activity of invertebrate hemocytes with preliminary findings on the tunicate *Ciona intstinalis*. *Italian Journal of Zoology*, **59**(2), 183–189.

Pavlova, Galina A. 2010. Muscular waves contribute to gliding rate in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Comparative Physiology A*, **196**(4), 241–248.

Perrodin, Yves. 2012. Évaluation des risques écologiques : développements prioritaires et recherches concomitantes. *VertigO-la revue électronique en sciences de l'environnement*.

Pimpao, CT, Zampronio, AR, & De Assis, HC Silva. 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**(2), 122–127.

PIP, EVA. 1992. Cadmium, copper and lead in gastropods of the lower Nelson river system, Manitoba, Canada. *Journal of molluscan studies*, **58**(2), 199–205.

Pipe, Richard K, & Coles, Jackie A. 1995. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, **5**(8), 581–595.

Plows, Louise D, Cook, Richard T, Davies, Angela J, & Walker, Anthony J. 2004. Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1692**(1), 25–33.

Plows, Louise D, Cook, Richard T, Davies, Angela J, & Walker, Anthony J. 2005. Carbohydrates that mimic schistosome surface coat components affect ERK and PKC signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes. *International journal for parasitology*, **35**(3), 293–302.

Plows, Louise D, Cook, Richard T, Davies, Angela J, & Walker, Anthony J. 2006. Phagocytosis by Lymnaea stagnalis haemocytes : a potential role for phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase A. *Journal of invertebrate pathology*, **91**(1), 74–77.

Ponomareva, EV, & Petson, EV. 2005. Vasopressin enhances sensitization of defensive reflex in the edible snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **41**(3), 368–370.

Présing, Mátyás. 1993. Influence of an insecticide, K-Othrine, on the reproduction and mortality of the pond snail (*Lymnaea stagnalis* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **25**(3), 387–393.

Présing, Mtyás, Katalin, V, Salánki, János, *et al.* . 1993. Cadmium uptake and depuration in different organs of *Lymnaea stagnalis L.* and the effect of cadmium on the natural zinc level. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **24**(1), 28–34.

Puurtinen, Mikael, Hytönen, Mirjami, Knott, K Emily, Taskinen, Jouni, Nissinen, Kari, & Kaitala, Veijo. 2004. The effects of mating system and genetic variability on susceptibility to trematode parasites in a freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Evolution*, **58**(12), 2747–2753.

Pyatt, A, Pyatt, F, & Pentreath, V. 2002. Lead toxicity, locomotion and feeding in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Invertebrate Neuroscience*, **4**(3), 135–140.

Quinn, Brian, Schmidt, Wiebke, O'Rourke, Kathleen, & Hernan, Robert. 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere*, **84**(5), 657–663.

R, Team. 2016. R : A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*.

Ramade, François. 2007. *Introduction à l'écotoxicologie : fondements et applications*. Lavoisier.

Raman, Thiagarajan, Arumugam, Munusamy, & Mullainadhan, Periasamy. 2008. Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & shellfish immunology*, **24**(3), 337–345.

Rault, P, Fortier, M, Pédelucq, J, Lacaze, E, Brousseau, P, Auffret, M, & Fournier, M. 2013. Immunotoxicity of heavy metals (silver, cadmium, mercury and lead) on marine bivalve *Mytilus edulis* : *in vitro* exposure of hemocytes. *Journal of Xenobiotics*, **3**(1S), 8.

Ray, Mitali, Bhunia, Anindya Sundar, Bhunia, Niladri Sekhar, & Ray, Sajal. 2013. Density shift, morphological damage, lysosomal fragility and apoptosis of hemocytes of indian molluscs exposed to pyrethroid pesticides. *Fish & shellfish immunology*, **35**(2), 499–512.

Ray, Shailendra, & Agrawal, Nirupama. 2015. Rhythmicity in the emergence of Cercaria tondoni sp., a gymnocephalus cercaria from *Lymnea stagnalis* (Linnaeus, 1758). *Biological Rhythm Research*, **46**(3), 299–305.

Reátegui-Zirena, Evelyn G, Fidder, Bridgette N, & Salice, Christopher J. 2016. A cost or a benefit ? Counterintuitive effects of diet quality and cadmium in *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology*, **25**(10), 1771–1781.

Ren, Hong-Lin, Xu, Dan-Dan, Gopalakrishnan, Singaram, Qiao, Kun, Huang, Wei-Bin, & Wang, Ke-Jian. 2009. Gene cloning of a sigma class glutathione S-transferase from abalone (*Haliotis diversicolor*) and expression analysis upon bacterial challenge. *Developmental & Comparative Immunology*, **33**(9), 980–990.

Renault, T. 2011. *Effects of pesticides on marine bivalves : what do we know and what do we need to know ?* INTECH Open Access Publisher.

Renault, T. 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish & shellfish immunology*, **46**(1), 88–93.

Rezvani, Andrew R, McCune, Jeannine S, Storer, Barry E, Batchelder, Ami, Kida, Aiko, Deeg, H Joachim, & McDonald, George B. 2013. Cyclophosphamide followed by intravenous targeted busulfan for allogeneic hematopoietic cell transplantation : pharmacokinetics and clinical outcomes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **19**(7), 1033–1039.

Ricklefs, Robert E, & Wikelski, Martin. 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**(10), 462–468.

Riley, EM, & Chappell, LH. 1992. Effect of infection with Diplostomum spathaceum on the internal defense system of *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(2), 190–196.

Rioult, Damien, Lebel, Jean-Marc, & Le Foll, Frank. 2013. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro*. *Cytotechnology*, **65**(5), 749–758.

Rizzo, DM, Blanchette, RA, & Palmer, MA. 1992. Biosorption of metal ions by *Armillaria rhizomorphs*. *Canadian Journal of Botany*, **70**(8), 1515–1520.

Roberto, Amilcar, Larsson, Bengt S, & Tjälve, Hans. 1996. Uptake of 7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene and Benzo (a) pyrene in Melanin-Containing Tissues. *Pharmacology & toxicology*, **79**(2), 92–99.

Robinson, WE, & Ryan, DK. 1988. Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology*, **97**(1), 101–109.

Roesijadi, G, Brubacher, LL, Unger, ME, & Anderson, RS. 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **118**(2), 171–176.

Rondelaud, Daniel, & Barthe, Dominique. 1981. The development of the amoebocyte-producing organ in *Lymnaea truncatula* Müller infected by *Fasciola hepatica L. Zeitschrift für Parasitenkunde*, **65**(3), 331–341.

Rondelaud, Daniel, & Barthe, Dominique. 1982. Relationship of the Amoebocyte-Producing Organ with the Generalized Amoebocytic Reaction in *Lymnaea truncatula* Müller Infected by *Fasciola hepatica L. The Journal of parasitology*, **68**(5), 967–969.

Rowley, Andrew F, & Powell, Adam. 2007. Invertebrate immune systems–specific, quasi-specific, or nonspecific ? *The Journal of Immunology*, **179**(11), 7209–7214.

Russell-Hunter, WD. 1983. Overview : planetary distribution of and ecological constraints upon the Mollusca. *The mollusca*, **6**, 1–27.

Russo, J, & Lagadic, L. 2000. 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*, **16**(1), 15–30.

Russo, Jacqueline, & Lagadic, Laurent. 2004. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution*, **127**(2), 303–311.

Russo, Jacqueline, & Madec, Luc. 2007. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell and tissue research*, **328**(2), 431–441.

Russo, Jacqueline, & Madec, Luc. 2011. Dual strategy for immune defense in the land snail *Cornu aspersum* (Gastropoda, Pulmonata). *Physiological and Biochemical Zoology*, **84**(2), 212–221.

Russo, Jacqueline, & Madec, Luc. 2013. Linking immune patterns and life history shows two distinct defense strategies in land snails (Gastropoda, Pulmonata). *Physiological and Biochemical Zoology*, **86**(2), 193–204.

Russo, Jacqueline, Lefeuvre-Orfila, Luz, & Lagadic, Laurent. 2007. Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental pollution*, **146**(2), 420–427.

Russo, Jacqueline, Madec, Luc, & Brehélin, Michel. 2008. Effect of a toxicant on phagocytosis pathways in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and tissue research*, **333**(1), 147–158.

Russo, Jacqueline, Madec, Luc, & Brehélin, Michel. 2009. Haemocyte lysosomal fragility facing an environmental reality : a toxicological perspective with atrazine and *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) as a test case. *Ecotoxicology and environmental safety*, **72**(6), 1719–1726.

Rustum, Abu M, & Hoffman, Norman E. 1987. Determination of cyclophosphamide in whole blood and plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, **422**, 125–134.

Sadamoto, Hisayo, Takahashi, Hironobu, Okada, Taketo, Kenmoku, Hiromichi, Toyota, Masao, & Asakawa, Yoshinori. 2012. De novo sequencing and transcriptome analysis of the central nervous system of mollusc *Lymnaea stagnalis* by deep RNA sequencing. *PloS one*, **7**(8), e42546.

Sadd, Ben M, & Schmid-Hempel, Paul. 2006. Insect immunity shows specificity in

protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology*, **16**(12), 1206–1210.

Salo, Harri M, Hébert, Nancy, Dautremepuits, Claire, Cejka, Patrick, Cyr, Daniel G, & Fournier, Michel. 2007. Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, **84**(4), 406–414.

Sanchez, Vanesa C, Pietruska, Jodie R, Miselis, Nathan R, Hurt, Robert H, & Kane, Agnes B. 2009. Biopersistence and potential adverse health impacts of fibrous nanomaterials : what have we learned from asbestos ? *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **1**(5), 511–529.

Sandland, Gregory J, & Carmosini, Nadia. 2006. Combined effects of a herbicide (atrazine) and predation on the life history of a pond snail, *Physa gyrina*. *Environmental toxicology and chemistry*, **25**(8), 2216–2220.

Satarug, Soisungwan, Baker, Jason R, Urbenjapol, Supanee, Haswell-Elkins, Melissa, Reilly, Paul EB, Williams, David J, & Moore, Michael R. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology letters*, **137**(1), 65–83.

Sawchuk, Ronald J, & Cartier, LL. 1981. Liquid-chromatographic determination of cyclosporin A in blood and plasma. *Clinical chemistry*, **27**(8), 1368–1371.

Schröder, H Fr. 1993. Surfactants : nonbiodegradable, significant pollutants in sewage treatment plant effluents : separation, identification and quantification by liquid chromatography, flow-injection analysis—mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **647**(2), 219–234.

Schulte, Agnes, Althoff, Jürgen, Ewe, Sigrid, Richter-Reichhelm, Hans-Bernhard, Investigators, BGVV Group, *et al.* . 2002. Two immunotoxicity ring studies according to OECD TG 407—comparison of data on cyclosporin A and hexachlorobenzene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **36**(1), 12–21.

Schuurman, Henk-Jan, Kuper, C Frieke, & Vos, Joseph G. 1994. Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. *Toxicology*, **86**(3), 187–212.

Segner, Helmut, Möller, Anja Maria, Wenger, Michael, & Casanova-Nakayama, Ayako. 2012a. Fish immunotoxicology : research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Environmental Pollution and Ecotoxicology. TERRAPUB, Okusawa, Setagaya-ku, Tokyo, Japan*, 1–12.

Segner, Helmut, Wenger, Michael, Möller, Anja Maria, Köllner, Bernd, & Casanova-Nakayama, Ayako. 2012b. Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish—how to assess them ? *Environmental Science and Pollution Research*, **19**(7), 2465–2476.

Seppälä, Otto, & Jokela, Jukka. 2010. Maintenance of genetic variation in immune defense of a freshwater snail : role of environmental heterogeneity. *Evolution*, **64**(8), 2397–2407.

Seppälä, Otto, & Jokela, Jukka. 2011. Immune defence under extreme ambient temperature. *Biology letters*, **7**(1), 119–122.

Seppälä, Otto, & Leicht, Katja. 2013. Activation of the immune defence of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* by different immune elicitors. *Journal of Experimental Biology*, **216**(15), 2902–2907.

Seuge, J, & Bluzat, R. 1979. Toxicité chronique du carbaryl et du lindane chez le Mollusque d'eau douce *Lymnea stagnalis*. *Water Research*, **13**(3), 285–293.

Shvedova, Anna A, Yanamala, Naveena, Kisin, Elena R, Tkach, Alexey V, Murray, Ashley R, Hubbs, Ann, Chirila, Madalina M, Keohavong, Phouthone, Sycheva, Lyudmila P, Kagan, Valerian E, *et al.* . 2014. Long-term effects of carbon containing engineered nanomaterials and asbestos in the lung : one year postexposure comparisons. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **306**(2), L170–L182.

Siddiqui, Nurul Islam, Akosung, Roland Forben, & Gielens, Constant. 2006. Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochemical and biophysical research communications*, **348**(3), 1138–1144.

Sidorov, AV, & Polyanina, IP. 2003. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behavior of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **39**(5), 555–561.

Silverman-Gavrila, LB, Lu, TZ, Prashad, RC, Nejatbakhsh, N, Charlton, MP, & Feng, Z-P. 2009. Neural phosphoproteomics of a chronic hypoxia model—*Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, **161**(2), 621–634.

Singh, Ravindra, & Agarwal, RA. 1981. Cyclophosphamide as a potential chemosterilant for harmful snails. *Acta pharmacologica et toxicologica*, **49**(3), 195–199.

Skála, Vladimír, Bulantová, Jana, Walker, Anthony J, & Horák, Petr. 2014. Insights into the development of Notocotylus attenuatus (Digenea : Notocotylidae) in *Lymnaea stagnalis* : from mother sporocyst to cercariae. *Parasitology international*, **63**(1), 94–99.

Sminia, T. 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh water pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, **130**(4), 497–526.

Sminia, T. 1974. Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. *Cell and tissue research*, **150**(4), 443–454.

Sminia, T. 1981. *Invertebrate blood cells 1, General Aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods*. Reading, Massachusetts : Academic Press.

Sminia, T, & Boer, HH. 1973. Haemocyanin production in pore cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and Tissue Research*, **145**(3), 443–445.

Sminia, T, & Van der Knaap, WPW. 1986. Immunorecognition in invertebrates with special reference to molluscs. *Pages 112–124 of : Immunity in invertebrates*. Springer.

Sminia, T, Pietersma, K, & Scheerboom, JEM. 1973. Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, **141**(4), 561–573.

Sminia, T, Van der Knaap, WPW, & Kroese, FGM. 1979a. Fixed phagocytes in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell and tissue research*, **196**(3), 545–548.

Sminia, T, Van der Knaap, WPW, & Edelenbosch, P. 1979b. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental & Comparative Immunology*, **3**, 37–44.

Sminia, T, Van der Knaap, WPW, & Van Asselt, LA. 1983. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs. *Developmental & Comparative Immunology*, **7**(4), 665–668.

Sminia, Taede, & van der Knaap, Wil. 1981. The internal defence system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental & Comparative Immunology*, **5**, 87–97.

Smit, August B, de Jong-Brink, Marijke, Li, Ka Wan, Sassen, Marion MJ, Spijker, Sabine, van Elk, René, Buijs, Stèphanie, van Minnen, Jan, & van Kesteren, Ronald E. 2004. Granularin, a novel molluscan opsonin comprising a single vWF type C domain is up-regulated during parasitation. *The FASEB journal*, **18**(7), 845–847.

Sohi, SS. 1971. *In vitro* cultivation of hemocytes of *Malacosoma disstria* Hübner (Lepidoptera : Lasiocampidae). *Canadian journal of zoology*, **49**(10), 1355–1358.

Sokolova, IM, Evans, S, & Hughes, FM. 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *Journal of Experimental Biology*, **207**(19), 3369–3380.

Soldánová, Miroslava, Selbach, Christian, Sures, Bernd, Kostadinova, Aneta, & Pérez-del Olmo, Ana. 2010. Larval trematode communities in *Radix auricularia* and *Lymnaea stagnalis* in a reservoir system of the Ruhr River. *Parasites & vectors*, **3**(1), 1.

Soldánová, Miroslava, Selbach, Christian, & Sures, Bernd. 2016. The early worm catches the bird ? Productivity and patterns of *Trichobilharzia szidati* cercarial emission from *Lymnaea stagnalis*. *PloS one*, **11**(2), e0149678.

Souza, Samaly dos Santos, & Andrade, Zilton Araújo. 2012. The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **107**(5), 598–603.

Stearns, Steven C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*, **3**(3), 259–268.

Stehle, Sebastian, Knäbel, Anja, & Schulz, Ralf. 2013. Probabilistic risk assessment of insecticide concentrations in agricultural surface waters : a critical appraisal. *Environmental monitoring and assessment*, **185**(8), 6295–6310.

Stenström, T, Vahter, M, *et al.* . 1974. Cadmium and lead in Swedish commercial fertilizers. *Ambio*, **3**(2), 91–2.

Sullivan, John T, Belloir, Joseph A, Beltran, Roxxana V, Grivakis, Aris, & Ransone, Kathryn A. 2014. Fucoidan stimulates cell division in the amebocyte-producing organ of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of invertebrate pathology*, **123**, 13–16.

Suzuki, Tohru, Yoshinaka, Reiji, Mizuta, Shoshi, Funakoshi, Shoji, & Wada, Koji. 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Cell and tissue research*, **266**(1), 75–82.

Svensson, Samuel PS, Lindgren, Sofi, Powell, Wendy, & Green, Henrik. 2003. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment cell research*, **16**(4), 351–354.

Syed, NI, & Winlow, W. 1989. Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in *Lymnaea stagnalis (L.)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, **93**(3), 633–644.

Syed, NI, & Winlow, W. 1991. Coordination of locomotor and cardiorespiratory networks of *Lymnaea stagnalis* by a pair of identified interneurones. *Journal of Experimental Biology*, **158**(1), 37–62.

Syed, NI, Harrison, D, & Winlow, W. 1991. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. I : Behavioral analysis and the identification of motor neurons. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, **169**(5), 541–555.

Szeto, Jason, Kaniuk, Natalia A, Canadien, Veronica, Nisman, Rozalia, Mizushima, Noboru, Yoshimori, Tamotsu, Bazett-Jones, David P, & Brumell, John H. 2006. ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy*, **2**(3), 189–199.

Tachet, Henri. 2008. *Invertébrés d'eau douce, systémique, biologie, écologie*. CRC Press.

Tafalla, Carolina, Novoa, Beatriz, & Figueras, Antonio. 2002. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, **132**(2), 423–431.

Takeda, Kiyoshi, Kaisho, Tsuneyasu, & Akira, Shizuo. 2003. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*, **21**(1), 335–376.

Takigami, Satoshi, Sunada, Hiroshi, Horikoshi, Tetsuro, & Sakakibara, Manabu. 2014. Morphological and physiological characteristics of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*. *BIOPHYSICS*, **10**(0), 77–88.

Taylor, Barbara E, & Lukowiak, Ken. 2000. The respiratory central pattern generator of *Lymnaea* : a model, measured and malleable. *Respiration physiology*, **122**(2), 197–207.

Taylor, Sean, Landman, Michael J, & Ling, Nicholas. 2009. Flow cytometric characterization of freshwater crayfish hemocytes for the examination of physiological status in wild and captive animals. *Journal of aquatic animal health*, **21**(3), 195–203.

Ter Maat, A, Lodder, JC, & Wilbrink, M. 1983. Induction of egg-laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis* by environmental stimulation of the release of ovulation hormone from the aaudo—dorsal cells. *International journal of invertebrate reproduction*, **6**(4), 239–247.

Ter Maat, A, Pieneman, AW, & Koene, JM. 2012. The effect of light on induced egg laying in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *Journal of molluscan studies*, eys008.

Ter Maat, Andries, Zonneveld, Cor, de Visser, J Arjan GM, Jansen, René F, Montagne-Wajer, Kora, & Koene, Joris M. 2007. Food intake, growth, and reproduction as affected by day length and food availability in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *American Malacological Bulletin*, **23**(1), 113–120.

Therneau, TM. 2015. *A package for survival analysis in S. 2015. Version 2.38*.

Thomas, Colette R, Hose, Grant C, Warne, Michael StJ, & Lim, Richard P. 2008. Effects of river water and salinity on the toxicity of deltamethrin to freshwater shrimp, cladoceran, and fish. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **55**(4), 610–618.

Tirouvanziam, Rabindra, Davidson, Colin J, Lipsick, Joseph S, & Herzenberg, Leonard A. 2004. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of Drosophila hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(9), 2912–2917.

Tixier, Céline, Singer, Heinz P, Oellers, Sjef, & Müller, Stephan R. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental science & technology*, **37**(6), 1061–1068.

Torreilles, Jean, & GuÉRin, Marie-Christine. 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish & Shellfish Immunology*, **9**(7), 509–518.

Travers, Marie-Agnès, Da Silva, Patricia Mirella, Le Goïc, Nelly, Marie, Dominique, Donval, Anne, Huchette, Sylvain, Koken, Marcel, & Paillard, Christine. 2008a. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & shellfish immunology*, **24**(4), 400–411.

Travers, Marie-Agnès, Le Goïc, Nelly, Huchette, Sylvain, Koken, Marcel, & Paillard, Christine. 2008b. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & shellfish immunology*, **25**(6), 800–808.

Triebskorn, R, Casper, H, Heyd, A, Eikemper, R, Köhler, H-R, & Schwaiger, J. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac : Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, **68**(2), 151–166.

Tryphonas, Helen, Fournier, Michel, Blakley, Barry R, Smits, Judit, & Brousseau, Pauline. 2005. *Investigative immunotoxicology*. CRC Press.

Tufi, Sara, Wassenaar, Pim NH, Osorio, Victoria, De Boer, Jacob, Leonards, Pim EG, & Lamoree, Marja H. 2016. Pesticide mixture toxicity in surface water extracts in snails (*Lymnaea stagnalis*) by an *in vitro* acetylcholinesterase inhibition assay and metabolomics. *Environmental science & technology*, **50**(7), 3937–3944.

Urbaniak, Magdalena, & Kiedrzyńska, Edyta. 2015. Concentrations and toxic equivalency of polychlorinated biphenyls in Polish wastewater treatment plant effluents. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **95**(4), 530–535.

US-EPA. 1995. A framework for ecological risk assessment. In : introduction to environmental toxicology : impact of chemicals upon ecological system, (Landis, W. G. and Yu, M.H., Eds.), Lewis Pub., CRC, 271 315.

Valavanidis, Athanasios, Vlahogianni, Thomais, Dassenakis, Manos, & Scoullos, Michael. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, **64**(2), 178–189.

Van Bruwaene, R, Kirchmann, R, & Impens, R. 1984. Cadmium contamination in agriculture and zootechnology. *Experientia*, **40**(1), 43–52.

Van de Ven, AMH, & Roubos, EW. 1990. Effects of diet on spontaneous and experimentally induced egg laying of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Invertebrate Reproduction & Development*, **18**(3), 209–212.

Van der Knaap, WP, Tensen, CP, Kroese, FG, & Boerrigter-Barendsen, LH. 1981a. Adaptive defence reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental and comparative immunology*, **6**(4), 775–780.

Van der Knaap, WP, Sminia, T, Schutte, R, & Boerrigter-Barendsen, LH. 1983a. Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes : *in vitro* phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis*. *Immunology*, **48**(2), 377.

Van der Knaap, WPW, & Loker, ES. 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitology Today*, **6**(6), 175–182.

Van der Knaap, WPW, Sminia, T, Kroese, FGM, & Dikkeboom, R. 1981b. Elimination of bacteria from the circulation of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental & Comparative Immunology*, **5**(1), 21–32.

Van der Knaap, WPW, Boerrigter-Barendsen, LH, Van den Hoeven, DSP, & Sminia, T. 1981c. Immunocytochemical demonstration of a humoral defence factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell and tissue research*, **219**(2), 291–296.

Van der Knaap, WPW, Doderer, A, Boerrigter-Barendsen, LH, & Sminia, T. 1982. Some properties of an agglutinin in the haemolymph of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *The Biological Bulletin*, **162**(3), 404–412.

Van der Knaap, WPW, Boots, AMH, & Sminia, T. 1983b. Immunorecognition in *Lymnaea stagnalis*. *Developmental & Comparative Immunology*, **7**(4), 645–648.

Van der Knaap, WPW, Boots, AMH, Van Asselt, LA, & Sminia, T. 1983c. Specificity and memory in increased defence reactions against bacteria in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Developmental & Comparative Immunology*, **7**(3), 435–443.

Van der Knaap, WPW, Meuleman, EA, & Sminia, T. 1987. Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology research*, **73**(1), 57–65.

Van der Knaap, WPW, Adema, CM, & Sminia, T. 1993. Invertebrate blood cells : morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Haematology International*, **3**(1), 20–26.

Van Der Steen, Willem Johan. 1966. The influence of environmental factors on the oviposition of *Lymnaea stagnalis* (L.) under laboratory conditions. *Archives Néerlandaises de Zoologie*, **17**(4), 403–468.

Van Duivenboden, Yvonne A, Pieneman, AW, & Ter Maat, A. 1985. Multiple mating suppresses fecundity in the hermaphrodite freshwater snail *Lymnaea stagnalis* : a laboratory study. *Animal Behaviour*, **33**(4), 1184–1191.

van Nierop, Pim, Bertrand, Sonia, Munno, David W, Gouwenberg, Yvonne, van Minnen, Jan, Spafford, J David, Syed, Naweed I, Bertrand, Daniel, & Smit, August B. 2006. Identification and functional expression of a family of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the central nervous system of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(3), 1680–1691.

Vehovszky, Ágnes, Agricola, Hans-Jürgen, Elliott, Christopher JH, Ohtani, Masahiro, Kárpáti, Levente, & Hernádi, László. 2005. Crustacean cardioactive peptide (CCAP)-related molluscan peptides (MCCAPs) are potential extrinsic modulators of the buccal feeding network in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience letters*, **373**(3), 200–205.

Victor, B. 1993. Responses of hemocytes and gill tissues to sublethal cadmium chloride poisoning in the crab *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Archives of environmental contamination and toxicology*, **24**(4), 432–439.

Vinarski, Maxim V. 2015. Conceptual shifts in animal systematics as reflected in the taxonomic history of a common aquatic snail species (*Lymnaea stagnalis*). *Zoosystematics and Evolution*, **91**(2)), 91.

Viran, Rukiye, Erkoç, Figen Ünlü, Polat, Hilal, & Koçak, Oner. 2003. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and environmental safety*, **55**(1), 82–85.

Voronezhskaya, Elena E, Hiripi, Laszlo, Elekes, Karoly, & Croll, Roger P. 1999. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* : I. embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. *Journal of Comparative Neurology*, **404**(3), 285–296.

Vulfius, CA, Gorbacheva, EV, Starkov, VG, Kasheverov, IE, Andreeva, TV, Osipov, AV, Tsetlin, VI, & Utkin, YN. 2013. Phospholipases A2 isolated from snake venoms block acetylcholine-elicited currents in identified *Lymnaea stagnalis* neurons. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A : Membrane and Cell Biology*, **7**(3), 203–206.

Wagatsuma, Akiko, Sugai, Rio, Chono, K, Azami, Sachiyo, Hatakeyama, D, Sadamoto, Hisayo, & Ito, E. 2004. The early snail acquires the learning. Comparison of scores for conditioned taste aversion between morning and afternoon. *Acta biologica Hungarica*, **55**(1-4), 149–155.

Wagner, Peter J. 2002. Phylogenetic relationships of the earliest anisostrophically coiled gastropods.

Wang, Mengqiang, Yang, Jialong, Zhou, Zhi, Qiu, Limei, Wang, Lingling, Zhang, Huan, Gao, Yang, Wang, Xingqiang, Zhang, Li, Zhao, Jianmin, *et al.* . 2011. A primitive Toll-like receptor signaling pathway in mollusk Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**(4), 511–520.

Wasserstein, Ronald L. 2016. *ASA statement on statistical significance and p-values*.

Waters, Valerie, Sokol, Sach, Reddy, Bharat, Soong, Grace, Chun, Jarin, & Prince, Alice. 2005. The effect of cyclosporin A on airway cell proinflammatory signaling and pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **33**(2), 138–144.

Wickham, Hadley. 2009. *ggplot2 : elegant graphics for data analysis*. Springer Science & Business Media.

Wigh, Adriana, Devaux, Alain, Brosselin, Vanessa, Gonzalez-Ospina, Adriana, Domenjoud, Bruno, Aït-Aïssa, Selim, Creusot, Nicolas, Gosset, Antoine, Bazin, Christine, & Bony, Sylvie. 2016. Proposal to optimize ecotoxicological evaluation of wastewater treated by conventional biological and ozonation processes. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**(4), 3008–3017.

Wijsman, Theodorus CM, van der Lugt, Hans C, & Hoogland, Hans P. 1985. Anaerobic metabolism in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* : haemolymph as a reservoir of D-lactate and succinate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, **81**(4), 889–895.

Wikfors, Gary H, & Alix, Jennifer H. 2014. Granular hemocytes are phagocytic, but agranular hemocytes are not, in the Eastern *Oyster Crassostrea virginica*. *Invertebrate Immunity*, **1**, 15–21.

Wilbrink, M, De Vries, J, Vermeulen, NPE, Janse, C, & De Vlieger, TA. 1987. Effects of dihalogenated biphenyls on various functional parameters in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, **87**(4), 1025–1031.

Wilson, Ken. 1999. Immunocompetence : a neglected life history trait or conspicuous red herring ? *Taxon*, **46**, 735–738.

Winkelstein, Alan. 1973. Mechanisms of immunosuppression : effects of cyclophosphamide on cellular immunity. *Blood*, **41**(2), 273–284.

Winlow, We, & Haydon, PG. 1986. A behavioural and neuronal analysis of the locomotory system of *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, **83**(1), 13–21.

Woin, Per, & Brönmark, Christer. 1992. Effect of DDT and MCPA (4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid) on reproduction of the pond snail, *Lymnaea stagnalis* . *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **48**(1), 7–13.

Wood, EJ, Corfield, GC, & Siggens, KW. 1981. Biosynthesis of haemocyanin in *Lymnaea stagnalis* L.(Gastropoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, **69**(4), 877–880.

Wright, Bernice, Lacchini, Audrey H, Davies, Angela J, & Walker, Anthony J. 2006. Regulation of nitric oxide production in snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells : a role for PKC and ERK signalling pathways. *Biology of the Cell*, **98**(5), 265–278.

Xue, Qing-Gang, Schey, Kevin L, Volety, Aswani K, Chu, Fu-Lin E, & La Peyre, Jerome F. 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, **139**(1), 11–25.

Yakovleva, NV, Samoilovich, MP, & Gorbushin, AM. 2001. The diversity of strategies of defense from pathogens in molluscs. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, **37**(4), 358–367.

Yu, Jing, Hu, Jiangyong, Tanaka, Shuhei, & Fujii, Shigeo. 2009. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in sewage treatment plants. *Water research*, **43**(9), 2399–2408.

Yu, Yundong, Qiu, Limei, Song, Linsheng, Zhao, Jianmin, Ni, Duojiao, Zhang, Ying, & Xu, Wei. 2007. Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF-α factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish & shellfish immunology*, **23**(2), 419–429.

Yurlova, Natalia I, Vodyanitskaya, Svetlana N, Serbina, Elena A, Biserkov, Valko Y, Georgiev, Boyko B, & Chipev, Nesho H. 2006. Temporal variation in prevalence and abundance of metacercariae in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* in Chany Lake, West Siberia, Russia : long-term patterns and environmental covariates. *Journal of Parasitology*, **92**(2), 249–259.

Zapata, Felipe, Wilson, Nerida G, Howison, Mark, Andrade, Sónia CS, Jörger, Katharina M, Schrödl, Michael, Goetz, Freya E, Giribet, Gonzalo, & Dunn, Casey W. 2014. Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, **281**(1794), 20141739.

Zelikoff, Judith T, Bowser, D, Squibb, KS, & Frenkel, K. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish : an alternative animal model for immunotoxicological studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, **45**(3), 235–248.

Zhang, Linlin, Li, Li, & Zhang, Guofan. 2011. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish & shellfish immunology*, **30**(2), 653–660.

Zhang, Si-Ming, Léonard, Pascale M, Adema, Coen M, & Loker, Eric S. 2001. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata* : characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics*, **53**(8), 684–694.

Zhang, Si-Ming, Loker, Eric S, & Sullivan, John T. 2016. Pathogen-associated molecular patterns activate expression of genes involved in cell proliferation, immunity and detoxification in the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental & Comparative Immunology*, **56**, 25–36.

Zhang, Yang, Li, Jun, Yu, Feng, He, Xiaocui, & Yu, Ziniu. 2013. Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, **34**(5), 1071–1077.

Zhang, Yongjun, Geißen, Sven-Uwe, & Gal, Carmen. 2008. Carbamazepine and diclofenac : removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, **73**(8), 1151–1161.

Zhao, Ming, Antunes, Fernando, Eaton, John W, & Brunk, Ulf T. 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, **270**(18), 3778–3786.

Zhou, Jin, Cai, Zhong-hua, Zhu, Xiao-shan, Li, Lei, & Gao, Yun-feng. 2010. Innate immune parameters and haemolymph protein expression profile to evaluate the immunotoxicity of tributyltin on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Developmental & Comparative Immunology*, **34**(10), 1059–1067.

Zimmer, Elke I, Jager, T, Ducrot, Virginie, Lagadic, Laurent, & Kooijman, SALM. 2012. Juvenile food limitation in standardized tests : a warning to ecotoxicologists. *Ecotoxicology*, **21**(8), 2195–2204.

Zlateva, T, Di Muro, P, Salvato, B, & Beltramini, M. 1996. The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS letters*, **384**(3), 251–254.

Zonneveld, C, & Kooijman, SALM. 1989. Application of a dynamic energy budget model to *Lymnaea stagnalis* (L.). *Functional Ecology*, 269–278.

Zurawell, Ronald W, Holmes, Charles FB, & Prepas, Ellie E. 2006. Elimination of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin from the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis jugularis* (Say). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **69**(4), 303–318.

Zuykov, Michael, Gudkov, Dmitry, Vinarski, Maxim, Pelletier, Emilien, Harper, David AT, & Demers, Serge. 2011. Does radioactive contamination affect the shell morphology of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in the exclusion zone of the Chernobyl NPP (Ukraine) ? *The Environmentalist*, **31**(4), 369–375.

Résumé / *Abstract*

Dans l'environnement, les organismes sont soumis à des stress de multiples natures (*e.g.*, polluants et pathogènes/parasites). Dans ce contexte, le système immunitaire joue un rôle fondamental. La pression chimique exercée par les polluants peut impacter leur système immunitaire, affaiblir leur santé et les prédisposer à contracter des maladies infectieuses. En écotoxicologie, l'évaluation de marqueurs d'immunocompétence peut servir à diagnostiquer l'état de santé des organismes et mieux comprendre le danger immunotoxique des xénobiotiques. *Lymnaea stagnalis* est un gastéropode d'eau douce représentatif de nombreux milieux lentiques sur la planète. Des tests OCDE de reprotoxicité sont disponibles mais peu d'études se sont focalisées sur des paramètres immunotoxiques. Le premier axe de la thèse se porte sur la connaissance et le développement de méthodes pour évaluer l'immunocompétence de manière répétée à l'échelle individuelle chez *L. stagnalis*. Le deuxième axe évalue cette approche multibiomarqueurs dans différents contextes écotoxicologiques. Plusieurs populations (élevages *vs* terrain), temps d'expositions (3 *vs* 29 – 44 jours), concentrations d'exposition (environnementales *vs* non réalistes) et contaminants ont été évalués : des médicaments (les anti-cancéreux Etoposide et cyclophosphamide, l'anti-rejet de greffes cyclosporine A et l'anti-inflammatoire diclofenac), l'insecticide deltaméthrine, le métal cadmium et des effluents de station d'épuration. Des comparaisons entre des traits de vie et des traits immunitaires ont été réalisées. La réflexion est bâtie sur les questionnements relatifs à (i) la sensibilité de l'approche, (ii) le temps de réponse des marqueurs, (iii) leur précocité physiologique, (iv) la transposition d'immunotoxicité de xénobiotiques entre le phylum des *chordata* et *L. stagnalis* et (vi) l'utilisation pratique de *L. stagnalis* (élevages, collecte en milieu naturel, calibration, reproduction).

Mots-clés : *Lymnaea stagnalis* ; eau douce ; gastéropode ; hémocytes ; immunocompétence ; écotoxicologie ; traits de vie ; pertinence

In natural environments, animals encounter multiple stresses (*e.g.*, pollutants and pathogens/parasites). In this context, the immune system plays a pivotal role. Chemical insults from pollutants can jeopardize the immune system of these animals, weaken their health and make them vulnerable to contracting infectious diseases. In ecotoxicology, assessment of immunocompetence markers can be used to diagnose the health of organisms and better understand the immunotoxic hazard of xenobiotics. *Lymnaea stagnalis* is a freshwater gastropod representative of several lentic ecosystems on the planet. OECD reprotoxicity tests are available using this species, but too few studies have focused on immunotoxic parameters. The first part of this thesis covers the description, comprehension and development of the methods used to assess the immunocompetence at an individual scale and repeatedly within an experiment in *L. stagnalis*. The second part assesses this multibiomarker approach in several ecotoxicological contexts. Several populations (laboratory-bred vs collected in the field), time exposures (3 *vs* 29–44 days), concentrations (environmental *vs* unrealistic) and contaminants were evaluated : pharmaceuticals (the anti-cancer drugs etoposide and cyclophosphamide, the anti-xenograft rejection drug cyclosporine A, the anti-inflammatory drug diclofenac), the insecticide deltamethrin, the metal cadmium and wastewater treatment plant effluents. The general reasoning is built on questions relative to (i) the sensitivity of the approach, (ii) the rapidity of the response, (iii) their physiological precocity of alteration (immune *vs* life-history traits), (iv) the transposition of xenobiotic immunotoxicity between *L. stagnalis* and the *Chordata* phylum and (vi) the pragmatic use of *L. stagnalis* (breeding, collection in the environment, calibration and reproduction).

Keywords : *Lymnaea stagnalis* ; freshwater ; gastropod ; hemocytes ; immunocompetence ; ecotoxicology ; life-history traits ; relevance