

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
ANGELA PAQUET-WALSH

SURVIE ET RÉPONSES BIOCHIMIQUES DES LARVES DE PERCHAUDE  
EXPOSÉES AUX NÉONICOTINOÏDES ET AU RAYONNEMENT  
ULTRAVIOLET NATUREL

DÉCEMBRE 2018

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur Andrea Bertolo ainsi que ma codirectrice Monique Boily qui m'ont dirigé et encouragé à travers les différentes étapes de ce passionnant projet. Je serai à jamais reconnaissante de la confiance que vous m'avez témoignée. Andrea, je te remercie pour tes innombrables idées et précieuses discussions qui m'ont permis d'évoluer dans le monde de la recherche et de devenir une meilleure scientifique. Monique, sans ta générosité, ta patience et ta rigueur scientifique, ce projet n'aurait pu être acheminé aussi loin.

Je tiens également à remercier de nombreuses personnes à l'Université du Québec à Trois-Rivières et l'Université du Québec à Montréal qui m'ont aidé sur le terrain et en laboratoire. Je voudrais remercier tout spécialement Patricia Bolduc, Catherine Landry et Maxime Gauthier pour leurs judicieux conseils, leur écoute et surtout, leur générosité sans limite. Vous avez transformé cette maîtrise en deux belles années de recherche et d'amitié. Je remercie également Matteo Giacomazzo et Lucas Deschamps qui, avec leurs projets conjoints sur la perchaude du lac Saint-Pierre, m'ont permis d'approfondir mes réflexions et de propulser ce projet vers de nouveaux horizons.

Je remercie aussi les membres de mon comité, Philippe Brodeur (ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Gouvernement du Québec) et André Lajeunesse (Université du Québec à Trois-Rivières). Je me considère privilégiée d'avoir fait votre rencontre et équipe avec vous. Un grand merci va aussi à Hélène Glémet, Chantal Fournier et à l'équipe des bâtiments et du CAPS, en particulier Sylvain Bourque, de l'Université du Québec à Trois-Rivières, pour la mise en place du système d'élevage et de montages expérimentaux faits sur mesure pour ce projet.

Je désire aussi souligner que ce projet de maîtrise n'aurait pas été possible sans le support financier du Groupe National Consultatif sur les Contaminants du Ministère de la Pêche et des Océans (MPO) octroyé à Monique Boily et Andrea Bertolo (2014-2017).

En dernier lieu, je souhaite souligner le soutien inconditionnel de ma famille et de mes précieuses amies. Par votre écoute, votre soutien et votre amour, vous avez une part tout aussi importante dans la complétion de ce projet de maîtrise.

## RÉSUMÉ

Par le lessivage des terres agricoles cultivées en maïs et en soya, des concentrations importantes d'insecticides de type néonicotinoïde (NEOCs) se retrouvent dans le lac Saint-Pierre (LSP, Québec) et ses tributaires. L'imidaclopride et le thiaméthoxame, qui sont des NEOCs appliqués dans l'enrobage des semences pour lutter contre les insectes ravageurs, se retrouvent en concentrations élevées, parfois même au-delà du critère établi au Québec pour le maintien de la vie aquatique (Critère de la Vie Aquatique Chronique, CVAC;  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$ ). Le nombre d'études grandissant démontrant les effets des NEOCs sur les organismes non ciblés, particulièrement les vertébrés, est inquiétant. Par leur mécanisme d'action, les NEOCs étaient considérés jusqu'à tout récemment comme sécuritaires pour les vertébrés. Les NEOCs perturbent le système cholinergique en ciblant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) impliqués dans la transmission de l'influx nerveux. Leur affinité étant plus forte pour les récepteurs nAChRs des insectes que ceux des vertébrés, leur utilisation était jugée sécuritaire pour les vertébrés. Par contre, les plus récentes études suggèrent que la présence des NEOCs en milieu aquatique pourrait nuire aux vertébrés, tel que la perchaude (*Perca flavescens*). Cette espèce de poisson se reproduit dans la plaine d'inondation du LSP. Ses oeufs et ses larves sont exposés à des eaux qui sont reconnues pour contenir des NEOCs, à cause de la connexion hydrologique avec les cultures du maïs et du soya. La présence du RUV affecterait non seulement directement la survie des larves, mais pourrait aussi avoir des effets indirects, en accentuant les effets toxiques des NEOCs. Ceci pourrait avoir des répercussions importantes sur la situation déjà précaire de la population de perchaudes. Le recrutement de cette espèce est actuellement déficient et est souvent cité comme une des causes potentielles ayant contribué à l'effondrement du stock de perchaude au LSP dans les années 1990.

Afin de déterminer comment la présence simultanée des NEOCs et du RUV affecte la survie des larves de perchaude, trois expériences en conditions semi-naturelles ont été réalisées avec l'imidaclopride (IMI) et le thiaméthoxame (TMX) qui sont deux NEOCs communément utilisés dans les cultures de maïs et de soya, très présentes dans les bassins versants des tributaires du LSP. De plus, dans l'objectif de reproduire les risques d'exposition des larves de perchaude dans leur environnement, des formulations commerciales de NEOCs ainsi qu'une exposition au RUV naturel ont été utilisées. Des larves de perchaude provenant de milieu naturel (LSP et lac à la Perchaude, Shawinigan, Québec) ont ainsi été exposées au thiaméthoxame, à l'imidaclopride ou simultanément à ces deux NEOCs. Les concentrations ont été choisies de façon à reproduire le dépassement du CVAC et ont été croisées avec trois niveaux de RUV naturel (sans UV, UVA, UVA + UVB). Durant les expériences, d'une durée de 4 ou 7 jours, le taux de survie a été déterminé en comptabilisant quotidiennement la mortalité des larves dans chacun des traitements. Les larves de perchaude survivantes à la fin des expériences ont été conservées pour l'analyse de biomarqueurs; 1) la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) en tant qu'indicateur d'une perturbation

cholinergique par les NEOCs, 2) la mesure de peroxydation des lipides en tant qu'indicateur des dommages résultant d'un stress oxydatif.

Globalement, les trois expériences ont permis de confirmer que l'exposition au RUV peut causer une mortalité importante chez les larves de perchaude (dans certains cas allant jusqu'à 50 % de plus par rapport au contrôle). L'effet du RUV sur le taux de survie était toutefois grandement variable entre les trois expériences et dépendait de la dose journalière maximale à laquelle les larves étaient exposées plutôt que de la dose totale reçue (c'est-à-dire de la dose cumulative reçue au cours de l'expérience). Combiné aux NEOCs, la présence du RUV a augmenté la toxicité du TMX et a diminué celle de l'IMI. Malgré la forte variabilité dans les réponses, on a mis en évidence que le RUV a augmenté la mortalité du TMX d'au moins 400 %. Dans le cas d'une exposition à l'IMI, la présence de RUV a diminué d'au moins 70 % la mortalité des larves par rapport au contrôle. Ces résultats, qui sont à l'inverse des résultats attendus, pourraient être expliqués par une interaction entre le RUV et les NEOCs qui auraient changé la toxicité des NEOCs en créant des produits de photodégradation d'une toxicité similaire, plus grande ou inférieure à la molécule mère. En ce qui concerne les biomarqueurs, la présence de l'imidaclopride a été associée à une perturbation du système cholinergique, une augmentation de la concentration de protéines dans les tissus et une diminution de la peroxydation des lipides. Ces derniers résultats suggèrent la mise en place de mécanismes de détoxification et/ou une baisse importante des réserves lipidiques due à un coût énergétique important relié au processus de détoxification. Les résultats obtenus au cours de cette étude contribueront à une meilleure compréhension des facteurs pouvant nuire au recrutement et au rétablissement de la population de perchaudes du LSP en lien avec les activités agricoles.

**Mots-clés :** acétylcholinestérase, biomarqueur, imidaclopride, larve de perchaude, néonicotinoïde, peroxydation de lipides, survie, thiaméthoxame, rayonnement ultraviolet

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAU .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>ÉTAT DES CONNAISSANCES.....</b>	<b>5</b>
1.1 Le déclin de la perchaude au Lac Saint-Pierre .....	5
1.2 Néonicotinoïdes .....	8
1.2.1 Caractéristiques physico-chimiques .....	9
1.2.2 Dégradation dans le milieu aquatique.....	11
1.2.3 Formation de sous-produits .....	12
1.2.4 Détection dans le milieu aquatique.....	12
1.2.5 Mécanisme d'action .....	14
1.2.6 Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase .....	18
1.2.7 Toxicité chez les organismes non ciblés.....	18
1.2.8 Potentiel de bioaccumulation.....	20
1.3 Rayonnement ultraviolet.....	21
1.3.1 Effets néfastes du rayonnement ultraviolet.....	21
1.3.2 Atténuation du rayonnement ultraviolet en milieu lacustre.....	22
1.4 Stress oxydatif .....	23
1.5 Objectifs et hypothèses.....	25
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIQUES .....</b>	<b>26</b>
2.1 Collecte, éclosion et transfert des larves de perchaude .....	28
2.2 Conditions expérimentales .....	28
2.3 Protocole d'exposition au rayonnement ultraviolet.....	29

2.4	Protocole d'exposition aux néonicotinoïdes .....	30
2.4.1	Expérience A : thiaméthoxame x UV .....	30
2.4.2	Expérience B : imidaclopride x UV .....	31
2.4.3	Expérience C : thiaméthoxame x imidaclopride x UV .....	31
2.5	Survie et collecte des tissus .....	32
2.6	Analyses biochimiques .....	32
<b>CHAPITRE III</b>		
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>		<b>34</b>
	Abstract .....	36
	Introduction .....	37
	Materials and methods .....	40
	Yellow perch larvae harvesting .....	40
	Experimental conditions .....	40
	Experimental design .....	41
	Larval survival and tissue collection .....	43
	Biochemical analyses .....	43
	Statistical analysis.....	44
	Survival analysis.....	44
	Biomarkers.....	45
	Results .....	47
	Environmental conditions during the experiments .....	47
	Survival analysis.....	47
	Biomarkers.....	49
	Discussion .....	51
	Conclusions .....	57
	Acknowledgements .....	58
	Litterature cited .....	59
	Supplementary material .....	77
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>84</b>



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Résumé d'un potentiel d'action permettant la propagation de l'influx nerveux le long d'un neurone .....	16
1.2	Résumé des principales étapes de la transmission de l'influx nerveux au-delà de la fente synaptique.....	17
 <b>Tableau</b>		
2.1	Expériences réalisées en 2015 et 2016 avec des larves de perchaude exposées à des formulations commerciales de thiaméthoxame (TMX) et de l'imidaclopride (IMI) ainsi qu'au RUV naturel .....	27

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Français / *Anglais*

ACH	Acétylcholine / <i>Acetylcholine</i>
ACHE	Acétylcholinestérase / <i>Acetylcholinesterase</i>
AICC	Critère d'information d'Akaike pour petits échantillons / <i>Akaike Information Criterion corrected for small samples</i>
ALP	Lac à la Perchaude / <i>À la Perchaude Lake</i>
CAT	Catalase
CLO	Clothianidine / <i>Clothianidin</i>
CDOM	Matière organique dissoute colorée / <i>Chromophoric Dissolved Organic Matter</i>
CPD	Dimères cyclobutaniques de pyrimidines / <i>Cyclobutan Pyrimidine Dimer</i>
CVAC	Critère de vie aquatique chronique / <i>Chronic Aquatic life Criterion</i>
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène / <i>Reactive Oxygen Species</i>
IMI	Imidaclopride / <i>Imidacloprid</i>
GST	Glutathion S-transférase / <i>Glutathione S-Transferase</i>
LSP	Lac Saint-Pierre
Log P	Coefficient de partition octanol-eau
nACHR	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine / <i>Nicotinic acetylcholine receptor</i>
NEOC	Néonicotinoïde / <i>Neonicotinoid</i>
SOD	Superoxyde dismutase / <i>Superoxide dismutase</i>
TBARS	Substances réagissant à l'acide thiobarbiturique / <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TMX	Thiaméthoxame / <i>Thiamethoxam</i>
RUV	Rayonnement ultraviolet / <i>Ultraviolet Radiation (UVR)</i>
WI	Poids d'Akaike / <i>Akaike's weight</i>

## INTRODUCTION

Le lac Saint-Pierre (LSP), situé au centre de plusieurs grands pôles industriels, urbains et agricoles, est reconnu pour son importance écologique et économique (UNESCO, 2012, <http://www.biospherelac-st-pierre.qc.ca/content/index.html>; The RAMSAR Convention Secretariat, 2014, <https://rsis Ramsar.org/fr/ris/949>). Soumis à de nombreuses pressions anthropiques, la qualité de cet écosystème s'est grandement et rapidement détériorée au cours des dernières années (Hudon et Carignan, 2008; Hudon et al., 2011; Goyette et al., 2016). Une des causes qui a été identifiée est l'intensification des activités agricoles dans la plaine inondable du LSP (de la Chenelière et al., 2014). Les cultures qui dominent aujourd'hui le bassin versant et le paysage littoral du LSP, en particulier au sud, sont le maïs et le soya (Dauphin et Jobin, 2016). L'omniprésence de ces cultures, ainsi que l'utilisation en parallèle de pesticides et de fertilisants constituent une source de pollution importante pour les organismes aquatiques (Hudon et Carignan, 2008; Hudon et al., 2011; Giroux, 2015; Giroux et al., 2016; Giroux, 2018; Simoneau, 2017).

Par le lessivage des terres agricoles, plusieurs pesticides sont introduits dans le LSP et ses tributaires (Simoneau, 2017; Giroux, 2018). On s'inquiète particulièrement de la présence des néonicotinoïdes (NEOCs) qui sont une classe d'insecticides appliqués, entre autres dans l'enrobage des semences de maïs et de soya comme moyen de lutte contre les insectes ravageurs (Jeschke et al., 2011; Main et al., 2014; Giroux, 2016). Leur utilisation grandissante est visible en Amérique du Nord ainsi que mondialement et les semences alternatives sans NEOCs sont aujourd'hui peu nombreuses (Main et al., 2014; Simon-Delso et al., 2015; Schaafsma et al., 2016). L'imidaclopride (IMI), le thiaméthoxame (TMX) et le clothianidine (CLO), qui sont les principaux NEOCs utilisés avec ces types de semences (Hladik et al., 2014, Schaafsma et al., 2015), ont été fréquemment détectés dans les cours d'eau bordant des terres agricoles (Main et al., 2014; Hladik et al., 2014), incluant les tributaires du LSP (Giroux, 2018). Dans le LSP, les masses d'eau, où des concentrations élevées ont été mesurées,

longent les rives du LSP et s'écoulent dans des habitats peu profonds, essentiels pour le développement des larves de perchaude (Bertolo et al., 2012). Des concentrations élevées ont été observées, surtout au printemps suite à la fonte des neiges, aux pluies printanières et à la plantation des semences (fin avril - début mai) (Hladik et al., 2014; Giroux, 2014, 2018). Les concentrations détectées durant cette période dépassaient le seuil du critère de vie aquatique chronique (CVAC) établi au Québec à 8,3 ng/l (Giroux, 2014, 2018).

La détection des NEOCs dans le milieu aquatique de même que le nombre grandissant d'études démontrant leurs effets sur des organismes non ciblés est inquiétant (Gibbons et al., 2015; Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2015; Morrissey et al., 2015). Par leur mécanisme d'action, les NEOCs étaient considérés jusqu'à tout récemment comme sécuritaires pour les vertébrés. Ces insecticides neurotoxiques perturbent le système cholinergique de l'insecte en se fixant aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) impliqués dans la transmission de l'influx nerveux (Jeschke et al., 2011). Cette liaison, estimée comme irréversible et possiblement cumulative chez les insectes, entraîne une sur-stimulation du système nerveux qui résulte en une paralysie, un effet tétanique et entraîne la mort de l'individu intoxiqué. Chez les vertébrés, malgré que l'affinité des NEOCs pour les nAChRs soit plus faible, des effets létaux et sous-létaux (croissance, reproduction et comportement) ont été observés chez les oiseaux et poissons (Thany, 2009; Tennekes et Sánchez-Bayo, 2011; Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2014).

La présence grandissante des NEOCs dans l'environnement aquatique, due à leur forte utilisation et à leur potentiel de lessivage élevé, est ainsi associée à des risques non négligeables pour les organismes présents dans le milieu (Morrissey et al., 2015). Les organismes aquatiques qui utilisent la plaine inondable du LSP et qui se reproduisent et/ou complètent leurs premières étapes de croissance durant la période printanière, sont particulièrement à risque d'une exposition à de fortes concentrations de ces contaminants (de la Chenelière et al., 2014, Giroux, 2018). C'est le cas notamment de la perchaude (*Perca flavescens*) qui utilise au printemps la végétation aquatique et

terrestre présente dans la plaine inondable du LSP comme habitat de reproduction (de la Chenelière et al., 2014). Les œufs et les larves qui éclosent dans les semaines suivantes dans les terres inondées sont alors directement en contact avec des NEOCs présents dans leur environnement (de la Chenelière et al., 2014; Table de concertation régionale du lac Saint-Pierre, 2017). Cette exposition continue dans les zones peu profondes du LSP par le contact des masses d'eau où des NEOCs ont été détectés (Giroux, 2018). On ignore cependant leurs effets sur la survie et le développement des larves. Les préoccupations sont ainsi très grandes en ce qui concerne les effets des NEOCs durant les premiers stades de vie de la perchaude qui, dans le LSP, est aux prises avec une problématique de recrutement (Magnan et al., 2017). Celle-ci a mené par le passé à l'instauration d'un moratoire sur la pêche commerciale et sportive à la perchaude en 2012, renouvelé en 2017 (Magnan et al. 2016).

Dans la plaine inondable du LSP, les larves de perchaude risquent également de subir les effets néfastes (mortalité, anomalies développementales, dommages cellulaires) du RUV (Whitehead et al., 2000; Bancroft et al., 2008). Dans cette zone peu profonde, les risques d'exposition sont particulièrement élevés puisque le RUV peut pénétrer dans presque la totalité de la colonne d'eau, dépendamment de la profondeur et des propriétés optiques de la masse d'eau (Frenette et al., 2003; Bertolo, données non publiées). En moyenne, le RUV pénètre entre 40 à 80 cm de la colonne d'eau (profondeur moyenne de la colonne d'eau : 2,7 m) (Frenette et al., 2003). Les effets biologiques du RUV sont nombreux et peuvent avoir des répercussions à long terme lorsque les individus sont exposés à d'importantes doses durant leurs premiers stades de développement (Whitehead et al., 2000; Bancroft et al. 2008). La présence du RUV affecterait non seulement la survie des larves, mais pourrait également augmenter ou diminuer les effets toxiques des NEOCs.

Afin de déterminer si la présence simultanée des NEOCs et du RUV affecte la survie des larves de perchaude, trois expériences en conditions semi-naturelles (EXP.A : TMX\*UV, EXP.B : IMI\*UV, EXP.C : TMX\*IMI\*UV) ont été réalisées avec l'IMI et le TMX communément utilisés dans les cultures de maïs et de soya très présentes dans le

bassin versant du LSP. Cette étude, qui s'est déroulée sur deux années, a été réalisée dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences de l'environnement de l'Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR). Elle a débuté en 2015 sous la direction d'Andrea Bertolo (UQTR) et sous la codirection de Monique Boily (Université du Québec à Montréal). Ce document présente, dans un premier temps, les connaissances actuelles à propos des effets des NEOCs et du RUV naturel sur la survie et les réponses biochimiques des larves de perchaude ainsi que sur les approches expérimentales et méthodologiques développées durant ce projet de recherche. Les résultats obtenus lors des trois expériences sont par la suite présentés sous la forme d'un article qui sera soumis à *Science of the Total Environment*. Globalement, les résultats obtenus au cours de cette étude contribueront à une meilleure compréhension des facteurs pouvant nuire au recrutement et au rétablissement de la population de perchaudes du LSP.

## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

Ce premier chapitre présente les concepts clés et les éléments théoriques rattachés au présent projet de recherche. Il dresse une synthèse de l'état des connaissances sur les effets des NEOCs sur les organismes aquatiques et leurs interactions potentielles avec le RUV, dans le but de soutenir et de permettre une meilleure compréhension des objectifs et hypothèses avancés.

#### 1.1 Le déclin de la perchaude au lac Saint-Pierre

Le LSP est un élargissement du fleuve Saint-Laurent qui s'étend sur près de 30 km entre les villes de Sorel-Tracy et de Trois-Rivières (Québec, Canada) (La Violette et al., 2003). Ce lac fluvial peu profond (profondeur moyenne : 2,7 m) est caractérisé par une vaste plaine inondable d'eau douce qui, suite aux crues printanières de récurrence 0-2 ans, augmente la superficie totale du lac de 14 000 ha (La Violette et al., 2003). Ces crues printanières, qui sont d'une durée de 5 à 9 semaines, sont essentielles au maintien de milieux humides et d'habitats de reproduction et d'alimentation pour plus d'une centaine d'espèces animales (La Violette et al., 2003; Mingelbier et al. 2005; Brodeur et al. 2006). Ce site, de par son abondance de milieux humides (The RAMSAR Convention Secretariat, 2014, <https://rsis Ramsar.org/fr/ris/949>), sa biodiversité et son importance comme halte migratoire pour la sauvagine, est reconnu par l'UNESCO comme réserve mondiale de la biodiversité (UNESCO, 2012, <http://www.biospherelac-st-pierre.qc.ca/content/index.html>).

L'intégrité de cet écosystème est aujourd'hui profondément menacée par le développement des villes, des industries et plus particulièrement par le changement et l'intensification des activités agricoles (de la Chenelière et al., 2014; Dauphin et Jobin,

2016; Goyette et al., 2016). Dans les dernières décennies, on estime que près de 75 % des milieux naturels et du territoire agricole qui était consacré aux cultures pérennes (fourrage et pâturage) sont maintenant des cultures annuelles (maïs et soya) (Richard et al., 2011; Dauphin et Jobin, 2016). La plaine d'inondation dans la zone de récurrence 0-2 ans ainsi transformée est aujourd'hui considérée comme moins propice à la faune (de la Chenelière et al., 2014). De plus, les tributaires du LSP, c'est-à-dire les rivières Richelieu, Yamaska, Saint-François et Nicolet, dont le bassin versant est composé d'une proportion élevée de culture de maïs et de soya, contribuent à la détérioration de l'état de santé globale du LSP en y déversant une quantité élevée de phosphore, d'azote, de solides en suspension et de pesticides (Hudon et Carignan, 2008; Hudon et al., 2011; Giroux, 2015; Giroux et al., 2016; Simoneau, 2017; Giroux, 2018). La rivière Yamaska, tributaire important du LSP, est considérée comme étant la rivière la plus polluée du Québec et du Canada (Simoneau, 2017). Dans ce cours d'eau en particulier, d'importantes concentrations de pesticides, entre autres, de NEOCs, y ont été détectées en 2014, entre mai et août, à des concentrations situées au-delà du CVAC (TMX = 3 ng/L<sup>-1</sup> à 160 ng/L<sup>-1</sup>, CLO = 4 ng/L<sup>-1</sup> à 73 ng/L<sup>-1</sup>) (Giroux, 2018).

L'apport de contaminants et de sédiments, combiné à la perte d'habitats causée par l'intensification et l'empiètement des activités agricoles dans la plaine d'inondable du LSP, ont des impacts potentiels sur de nombreuses espèces de poissons. Plusieurs espèces qui utilisent les herbiers aquatiques et la plaine inondable du LSP comme habitat montrent un déclin (exemple : grand brochet *Esox lucius*, crapet de roche *Ambloplites rupestris*, crapet-soleil *Lepomis gibbosus* et méné à tache noire *Notropis hudsonius*) (de la Chenelière et al., 2014). Une attention particulière est portée à la population de perchaudes qui est dans une situation préoccupante depuis maintenant une vingtaine d'années (Mailhot et al., 2015; Magnan et al., 2017). Prisée par la pêche sportive et commerciale, la perchaude a vu son abondance diminuée de façon importante au milieu des années 1990 (Guenette et al., 1994). La pêche intensive, couplée au déclin du recrutement de l'espèce, avait alors été ciblée comme causes principales du déclin de l'espèce. Des mesures de gestions ont été mises en place, tel le moratoire sur la pêche sportive et commerciale en 2012. Toutefois, le stock de perchaude a atteint un point



critique en 2012, indiquant alors que la situation était beaucoup plus complexe et que de nouvelles pistes de solutions devaient être mises en place rapidement (Magnan et al., 2008; Thibault, 2008; Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent, 2014; Magnan et al., 2017). Plusieurs facteurs limitants ont été considérés tels que l'introduction d'espèces compétitrices (gobie à taches noires *Neogobius melanostomus*, tanche *Tinca tinca*) (Masson et al., 2013), la perte de connectivité entre les habitats (Larouche, 2015) et la régularisation des niveaux d'eau par les barrages (de la Chenelière et al., 2014). De plus, plusieurs chercheurs et spécialistes se sont interrogés quant aux impacts réels des activités agricoles dans la plaine inondable en lien avec le non-rétablissement de cette espèce. Selon de la Chenelière et al. (2014), la conversion des usages agricoles dans la zone inondable aurait eu un impact sur la perchaude qui utilise les habitats inondés pour des étapes cruciales de son cycle vital, soit la reproduction et la période d'alevinage. La qualité des principaux sites d'alevinage de la perchaude a grandement diminué, notamment au sud où les cultures de maïs et de soya sont omniprésentes. La superficie des herbiers aquatiques présents dans la plaine inondable ainsi que dans l'ensemble du LSP a montré une réduction et a été remplacée, par endroits, par des tapis de cyanobactéries benthiques (Hudon et al., 2012, Magnan et al., 2017). Les herbiers aquatiques sont des habitats primordiaux pour la perchaude qui utilise la végétation présente dans la zone inondée comme support pour accrocher ses pontes sous forme de ruban (de la Chenelière et al., 2014). Les larves, qui éclosent dans les semaines suivantes, peuvent par la suite demeurer un certain temps dans ces types de milieux afin de s'alimenter des organismes zooplanctoniques qui y sont abondants (de la Chenelière et al., 2014; Paradis et al. 2014) et par conséquent, être exposés aux masses d'eau des tributaires qui contiennent un mélange de plusieurs herbicides et pesticides (Giroux, 2018).

Une perturbation des sites de reproduction et d'alevinage de la perchaude dans le LSP peut avoir des répercussions importantes sur cette espèce (Magnan et al., 2017). L'abondance des jeunes perchaudes (1 et 2 ans) se fait maintenant beaucoup plus faible, qu'au début des années 2000. C'est le cas notamment de la portion sud-ouest du LSP, près de l'embouchure des rivières Richelieu, Yamaska et Saint-François,

où comparativement au début des années 2000, très peu ou aucune jeune perchaude n'y a été capturée en 2011 (Mailhot et al., 2015). Les individus à la fin de leur première année de vie sont également de petite taille, atteignant sa plus basse valeur historique en 2011 (2003-2012 = moyenne de 110 mm) comparativement à la décennie précédente (1995-2002 = moyenne de 120 mm) (Mailhot et al., 2015). L'effet direct des contaminants industriels et agricoles sur les jeunes perchaudes n'est pas connu, mais certaines études récentes suggèrent que la condition générale et l'état de santé des individus pourraient être fortement affectés par leur présence (Giraud et al., 2016; Landry et al., 2017).

Ainsi, il est entendu que des actions prioritaires visant le rétablissement de cette espèce doivent cibler directement les premiers stades de développement. Effectivement, la *Table de concertation régionale du lac Saint-Pierre* (mars 2017) a recommandé l'aménagement d'habitat de qualité pour la perchaude et des modifications aux pratiques agricoles en plaine inondable. En parallèle à ce plan d'action, il a été recommandé d'évaluer quels étaient les impacts de la présence de contaminants, en particulier des néonicotinoïdes, omniprésentes dans le bassin versant du LSP.

## 1.2 Néonicotinoïdes

Les NEOCs font partie d'une classe d'insecticides dont l'utilisation n'a cessé d'augmenter au cours des dernières années et qui occupe aujourd'hui plus de 25 % du marché mondial (Jeschke et al., 2011; Bass et al., 2015). Les formes d'application les plus courantes de ce type d'insecticide sont impliquées dans les traitements appliqués au sol et dans l'enrobage des semences (Jeschke et al., 2011). Lorsqu'ils sont appliqués dans l'enrobage des semences, les NEOCs sont absorbés de façon systémique dans tous les tissus de la plante, ce qui permet alors à la plante d'être protégée contre les insectes ravageurs. Cet avantage, combiné à leur faible coût et leur efficacité à faible dose expliquent pourquoi les NEOCs ont remplacé aussi rapidement les insecticides de types carbamates et organophosphorés dans le marché mondial (Jeschke et al., 2011; Goulson, 2013).

L'utilisation grandissante des NEOCs est également visible en Amérique du Nord où l'on estime que près de 80 % des semences vendues sont enrobées par ce type d'insecticide (Jeschke et Nauen, 2008). Au Canada, les cultures qui utilisent les semences enrobées sont les cultures de maïs, soya, blé, canola et orge (Main et al., 2014; Schaafsma et al., 2016). Au Québec, on estime que la quasi-totalité des semences de maïs (99 %) et la majorité des semences de soya (60-80 %) sont enrobées de NEOCs (Schaafsma et al., 2016). La quantité exacte appliquée sur les terres agricoles québécoises n'est toutefois pas connue. Les semences, lorsqu'elles sont traitées à l'extérieur du Québec, ne sont pas réglementées par la Loi sur les pesticides (Giroux, 2015). Malgré l'absence d'un registre des quantités utilisées au Québec, on présume que la quantité de semences enrobées de NEOCs utilisées annuellement est importante, puisque les cultures biologiques de maïs en Amérique du Nord représentent qu'une très faible part du marché (0,2 %) (Simon-Delso et al., 2015).

Les NEOCs communément utilisés dans l'enrobage des semences de maïs et de soya sont l'IMI, le TMX et le CLO (Hladik et al., 2014). En concordance avec l'importance des cultures de maïs et de blé (MAPAQ, 2018, <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Productions/Production/Pages/Grains.aspx>), ces NEOCs représentaient en 2012 plus de 85 % des ventes mondiales totales de NEOCs (Bass et al., 2015). L'IMI (Bayer CropScience) a été le premier NEOC introduit sur le marché en 1991, suivi au début des années 2000 par le TMX (Syngenta) et le CLO (Bayer CropScience), qui est un sous-produit du TMX (Jeschke et al., 2011; Bass et al., 2015). Dans cette classe d'insecticides, on retrouve aussi le thiaclopride, l'acétamipride, le nitenpyrame et le dinotefuran (Bass et al., 2015). L'IMI, qui est disponible depuis plus longtemps sur le marché, est jusqu'à ce jour le NEOC qui a été le plus étudié (Anderson et al., 2015).

### **1.2.1 Caractéristiques physico-chimiques**

Suite à la plantation de semences enrobées de NEOCs, il est estimé qu'au maximum 20 % de l'ingrédient actif est absorbé par la plante (Gupta et al., 2002).

Le reste, alors biodisponible dans l'environnement, a le potentiel de s'accumuler dans les terres agricoles et d'être rapidement lessivé dans les cours d'eau. La persistance des NEOCs dans les sols est globalement plus élevée dans les sols froids, secs, acides et riches en matières organiques (Goulson et al., 2013; Morrissey et al., 2015.). Ainsi, en Ontario, là où des activités agricoles et des conditions similaires à celles observées au Québec sont présentes, la demi-vie des NEOCs dans les sols est estimée à 6 mois (Schaafsma et al., 2016). Leur potentiel d'accumulation ainsi que leur persistance dans les sols représentent un risque continu pour les cours d'eau. En Ontario et au Québec, les NEOCs les plus communément utilisés tels que l'IMI, le TMX et le CLO ont été détectés à de fortes concentrations jusqu'à 4-6 semaines après la plantation dans les cours d'eau dont le bassin versant est composé de terres agricoles (LSP : TMX = 10 ng/L<sup>-1</sup> à 240 ng/L<sup>-1</sup>, CLO = 11 ng/L<sup>-1</sup> à 71 ng/L<sup>-1</sup>) (Schaafsma et al., 2015; Giroux, 2018). Étant très soluble (4100 mg/L pour le TMX et 610 mg/L pour l'IMI, 20 °C). Le risque que des concentrations importantes de NEOCs soient lessivées est effectivement continu (Morrissey et al., 2015. Tableau 2.1 – Chapitre II). Dépendamment des conditions présentes, il est estimé qu'au maximum 80 % de l'ingrédient actif appliqué dans l'enrobage des semences sera transporté dans les cours d'eau (Gupta et al., 2002; Thuyet et al., 2011; Kurwadkar et al., 2013).

Dans la formulation commerciale, la persistance des NEOCs ainsi que leur potentiel de lessivage sont augmentés. Dans le but d'améliorer la conservation du produit sur le marché ainsi que l'absorption et la répartition de l'ingrédient actif dans la plante, des substances sont ajoutées à l'ingrédient actif (Gupta et al., 2002; Jeschke et al., 2011; Bonmatin et al., 2015). Avec leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi modifiées par la formulation commerciale, il est alors difficile de déterminer précisément la façon dont les NEOCs se dégradent dans l'environnement et comment le niveau de toxicité des NEOCs pour les organismes est modifié (Sarkar et al., 1999; Costa et al., 2009; Tišler et al., 2009).

### 1.2.2 Dégradation dans le milieu aquatique

En milieu aquatique, la température ainsi que la présence et l'intensité de lumière sont les principaux facteurs qui influencent la dégradation des NEOCs. Selon Zheng et al. (2004), la photodégradation est la voie de dégradation la plus importante à considérer. L'IMI et le TMX vont se dégrader rapidement dans l'eau en présence de lumière naturelle (demi-vie eau pour IMI = 8,8 jours (Jinguji et al., 2013); demi-vie eau pour TMX = 18,7 h (Peña et al., 2011)), mais demeurent relativement stables à l'obscurité (demi-vie eau pour IMI = > 1 an et demi-vie eau pour TMX = 11,5 jours, pH 9, Tableau 2.1 – Chapitre II dans Morrissey et al., 2015). La vitesse de photodégradation augmente avec la température (Zheng et Liu, 1999; Liu et al., 2006) et varie aussi selon les longueurs d'onde et le type de luminosité (Peña et al., 2011, Gupta et al., 2006; Zheng et al., 2004). Les UVC (100-280 nm) et UVB (280-315 nm), qui sont de courtes longueurs d'onde avec une énergie relative plus importante que les UVA (315-400 nm), vont augmenter la vitesse de la photodégradation (Whitehead et al., 2000; Zheng et al., 2004). Il est à noter qu'en conditions naturelles, le RUV reçu à la surface de l'eau est principalement constitué d'UVA suivi d'UVB, le UVC étant absorbé presque entièrement dans la couche d'ozone (Whitehead et al., 2000). Le TMX, pour qui la bande d'absorption maximale débute à 250-255 nm et s'étend jusqu'à 290 nm (Peña et al., 2011), est ainsi ciblé par la lumière naturelle des UVB contrairement à l'IMI dont l'absorption maximale est localisée dans l'UVC entre 211 et 268 nm (Liu et al., 2006). Les recherches effectuées par Gupta et al. (2006) et Peña et al. (2011) ont permis de conclure que la source lumineuse ainsi que la longueur d'onde reçue sont des facteurs plus importants à considérer que l'intensité lumineuse dans le processus de photodégradation des NEOCs. Effectivement, la dégradation du TMX est beaucoup plus lente en présence de lumière naturelle (demi-vie eau : 18,7 h; Peña et al., 2011) que lorsque la source est artificielle (demi-vie eau : 10 min; de Urzedo et al., 2007). Ces résultats soulignent l'importance de mieux intégrer les conditions environnementales réelles dans l'évaluation du processus de dégradation des NEOCs.

### 1.2.3 Formation de sous-produits

Très peu d'études ont incluent la détection des principaux sous-produits des NEOCs (Simon-Delso et al., 2015; Anderson et al., 2015). Ceci représente une problématique importante puisque certains sous-produits peuvent être d'une toxicité égale ou supérieure à la molécule mère (Simon-Delso et al., 2015). Entre 2010 et 2012, Giroux (2014) a effectué le suivi de plusieurs sous-produits de l'IMI (imidaclopride-urée, -oléfine, -guanidine) dans les cours d'eau de plusieurs régions agricoles québécoises. Le ruisseau Déversant-du-Lac qui est un cours d'eau appartenant au bassin versant de la Rivière Yamaska, l'un des tributaires majeurs du LSP, était inclus dans cette campagne d'échantillonnage. Dans ce cours d'eau, l'imidaclopride-urée a été détecté à une fréquence et à une concentration plus élevée que la molécule mère. Cette observate concorde avec les résultats de Liu et al. (2006) qui ont rapporté que la forme urée était le principal sous-produit présent dans l'eau après un processus de photodégradation. Ce sous-produit n'a pas de risque toxique important qui lui est associé envers les invertébrés et les vertébrés (Simon-Delso et al., 2015).

Dans le cas du TMX, le principal sous-produit identifié est le CLO qui est, tel que mentionné précédemment, un insecticide commercial associé à une toxicité importante (Hladik et al., 2014; Main et al., 2014). Il est toutefois difficile de déterminer si sa présence dans le milieu aquatique est due à la dégradation du TMX en sous-produit ou à l'utilisation du CLO comme insecticide dans les terres agricoles de maïs et de soya avoisinantes (Hladik et al., 2014; Main et al., 2014).

### 1.2.4 Détection dans le milieu aquatique

Les trois NEOCs communément utilisées, c'est-à-dire l'IMI, le TMX et le CLO, sont fréquemment détectées dans des cours d'eau en Amérique du Nord (Main et al., 2014; Hladik et al., 2014). Les études réalisées au Canada, portant principalement sur l'IMI, démontrent même une augmentation dans la fréquence de détection de ce type d'insecticide (Giroux et Sarrasin, 2011). Cette tendance est aussi visible pour le TMX et le CLO dans le bassin versant du LSP (Giroux, 2018). Avec leur utilisation mondiale

grandissante, combinée à leur potentiel de lessivage élevé, il n'est pas surprenant de détecter une augmentation de leur présence dans le milieu aquatique. Dans le LSP, les concentrations observées durant une campagne d'échantillonnage réalisée en 2015 étaient situées entre 10 ng/L<sup>-1</sup> et 240 ng/L<sup>-1</sup> pour le TMX, et entre 11 ng/L<sup>-1</sup> et 71 ng/L<sup>-1</sup> pour le CLO (Giroux, 2018). En Ontario, où des activités agricoles similaires sont pratiquées, les concentrations de l'eau dans les terres agricoles étaient d'un dix fois plus élevées (TMX = 1120 ng/L<sup>-1</sup> et CLO = 2280 ng/L<sup>-1</sup>) (Schaafsma et al., 2015). Dans tous les cas, les concentrations étaient plus importantes au printemps, ce qui coïncide avec la fonte des neiges, les pluies printanières et les travaux de semences (fin avril – début mai) (Hladik et al., 2014). Les cultures où le sol est partiellement dénudé pour une partie de l'année, comme le maïs, ne permettent pas de retenir et de retarder l'entrée des pesticides dans les cours d'eau situés à proximité (Giroux, 2014). Le lessivage des terres agricoles au printemps constitue donc une voie d'entrée importante de NEOCs dans le milieu aquatique, et est détectable parfois jusqu'à plusieurs semaines après l'application du pesticide (Schaafsma et al., 2015; Giroux et al., 2016; Simoneau, 2017).

Au Québec, les valeurs présentement utilisées pour déterminer si les concentrations de NEOCs retrouvées dans le milieu aquatique sont nocives pour les organismes sont basées des critères utilisés ailleurs dans le monde, soit celui des Pays-Bas pour l'IMI (8,3 ng/L<sup>-1</sup>), celui de l'Union européenne pour le TMX (140 ng/L<sup>-1</sup>) et celui de la Finlande pour le CLO (200 ng/L<sup>-1</sup>) (Giroux, 2014). Toutefois, étant donné que les études portant sur la toxicité des NEOCs ont été réalisées principalement sur l'IMI, Mineau et Palmer (2003) suggèrent d'utiliser la concentration établie pour l'IMI puisque les deux autres NEOCs ont un mode d'action similaire. Ainsi, cette valeur qui est utilisée comme critère de vie aquatique chronique (CVAC) correspond à la « concentration maximale d'un produit à laquelle les organismes aquatiques peuvent être exposés pendant toute leur vie sans subir d'effets néfastes » (Giroux, 2002). Dans le LSP, les concentrations détectées, qui sont au-delà du CVAC (Giroux, 2018) représentent donc un risque important pour les organismes aquatiques (Giroux, 2002). Il a été estimé que la situation pouvait devenir particulièrement préoccupante lorsque les concentrations dépassaient le critère établi pour plus de quatre jours consécutifs

d'exposition (EPA, 1991 cité dans Giroux, 2002). L'interprétation du CVAC doit être nuancée puisque celui-ci ne tient pas compte de la présence simultanée de plusieurs NEOCs, de la formation des sous-produits de dégradation et des conditions du milieu différentes de celles qui prévalaient où le critère a été établi (Giroux, 2014).

### 1.2.5 Mécanisme d'action

Les NEOCs, tout comme les insecticides de types carbamates et organophosphorés, sont neurotoxiques, c'est-à-dire que leur mécanisme d'action cible la transmission de l'influx nerveux (Sánchez-Bayo, 2011). Les carbamates et les organophosphorés perturbent le système cholinergique des insectes en inhibant l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) (Sánchez-Bayo, 2011). Les NEOCs, en tant qu'agonistes de l'acétylcholine (ACh), se fixent aux nAChRs, stimulant ainsi un potentiel d'action le long de l'influx nerveux.

L'influx nerveux, ou potentiel d'action, est un signal électrochimique qui se propage le long du neurone par une suite de débalancement d'ions (sodium ( $\text{Na}^+$ )/potassium ( $\text{K}^+$ )) de part et d'autre de la membrane cellulaire grâce à l'action d'un système de pompes et canaux (Figure 1.1). Au repos, la différence de potentiel de membrane causée par le transport actif de l'ion  $\text{K}^+$  à l'extérieur de la cellule assure le mouvement des ions chargés positivement vers l'intérieur (-). À la suite d'un stimulus extérieur (ex. neurotransmetteur), le potentiel d'action est alors déclenché, ce qui a comme effet d'ouvrir les canaux du  $\text{Na}^+$  et donc d'augmenter l'entrée rapide d'ions chargés positivement ( $\text{Na}^+$ ) dans la cellule. Cela diminue ainsi la différence de charge entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (phase de dépolarisation). Par la suite, lorsque la concentration maximale d'ions  $\text{Na}^+$  est atteinte, des ions  $\text{K}^+$  sortent plus lentement de la cellule par transport actif, ce qui ramène au potentiel de repos (phase de repolarisation). La fermeture des canaux  $\text{K}^+$  est lente ce qui cause un léger dépassement de la valeur du potentiel de repos initiale (phase d'hyperpolarisation). La sortie des ions de la cellule ainsi que son maintien jusqu'au prochain potentiel d'action est régularisé par les pompes  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  dont l'utilisation représente un coût énergétique (ATP) (Moyes et Schulte, 2008).

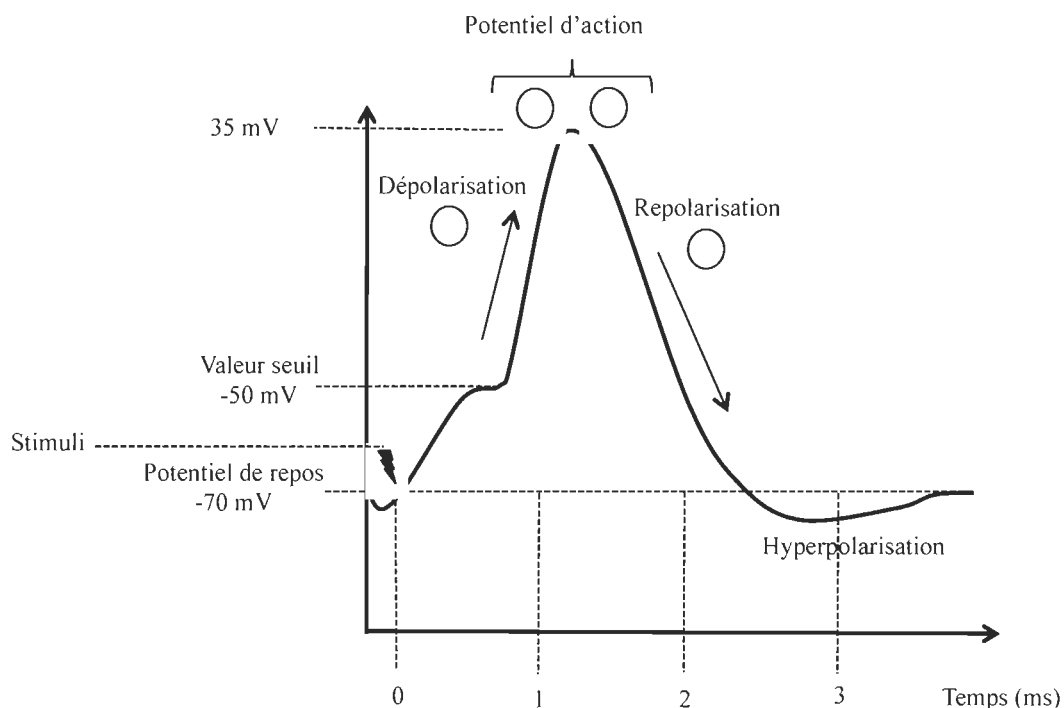


En conditions neuronales normales, l'influx nerveux se propage le long du neurone par une suite de potentiels d'actions et a recours à un neurotransmetteur tel que l'ACh pour traverser la fente synaptique (Figure 1.2). L'ACh se lie par la suite à un récepteur (muscarinique, mixte ou nicotinique) localisé à la surface du neurone post-synaptique, assurant ainsi la continuité de l'influx nerveux au neurone voisin. Cette liaison entre le neurotransmetteur (ACh) et le récepteur est ensuite hydrolysée par l'AChE, libérant le récepteur et coupant la transmission synaptique en cours (Moyes et Schulte, 2008).

Les NEOCs, qui sont des agonistes des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs), perturbent le fonctionnement neuronal normal en se liant, tout comme l'ACh, aux récepteurs post-synaptiques (Jeschke et al., 2011; 2013). La liaison entre le composé NEOC et le récepteur nAChRs ne peut alors être hydrolysée par l'AChE qui est spécifique à l'ACh. Le maintien de la propagation de l'influx nerveux (c.-à-d. une série de potentiels d'action déclenchés par la présence de NEOC) cause alors une hyper-excitation de la membrane post-synaptique (Bordereau, 2011). Celle-ci devient alors plus perméable aux ions  $\text{Na}^+$ , entraînant une dépolarisation continue (Bordereau, 2011) qui résulte en convulsions, paralysies et entraîne la mort de l'insecte intoxiqué (voir revue par Pisa et al., 2014). La liaison des NEOCs aux nAChRs est considérée comme irréversible et cumulative, signifiant que même une intoxication à faible dose pourrait avoir des effets toxiques importants si l'exposition se prolonge (Thany, 2009; Tennekes et Sánchez-Bayo, 2011; Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2014).

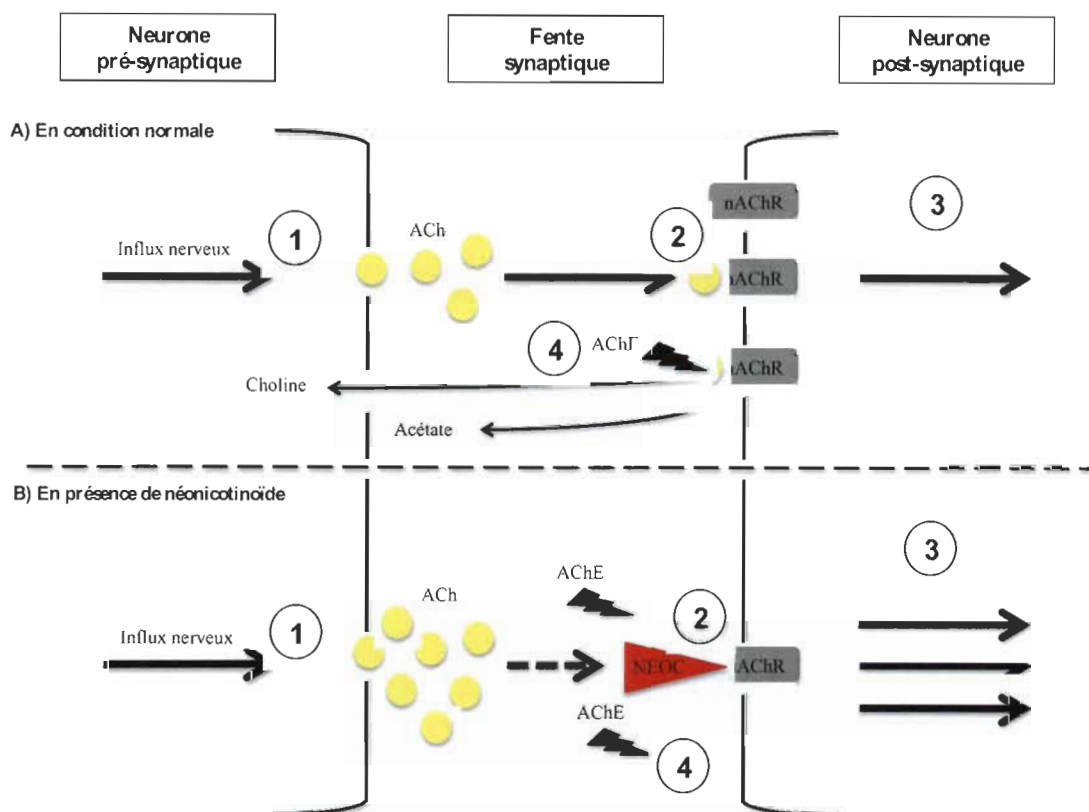
Le facteur le plus important contribuant à l'utilisation grandissante des NEOCs sur le marché mondial, plutôt que celui des insecticides de types carbamates et organophosphorés, est dû à leur sélectivité aux récepteurs nAChRs présents dans le système nerveux des insectes (Tomizawa et Casida, 2003; Jeschke et al., 2011; Simon-Delso et al., 2015). Leur spécificité assurerait ainsi une présumée sécurité d'utilisation pour les vertébrés (Simon-Delso et al., 2015). Bien que le potentiel toxique des NEOCs pour les vertébrés soit considéré comme étant faible, le système nerveux des insectes partage des points communs avec celui des vertébrés, soit les récepteurs nAChRs. Il est donc possible que le système cholinergique des vertébrés, tout comme

celui des invertébrés, soit affecté par une exposition aux NEOCs (Kimura-Kuroda et al., 2012).



**Figure 1.1** **Résumé d'un potentiel d'action permettant la propagation de l'influx nerveux le long d'un neurone.**

A) Phase de dépolarisation : suivant un stimulus, la valeur seuil du potentiel membranaire est atteinte. Les canaux  $\text{Na}^+$  s'ouvrent. L'ouverture de ces canaux, ce qui permet l'entrée rapide d'ions chargés positivement à l'intérieur de la cellule. B) Lorsque le potentiel membranaire atteint un seuil positif, les canaux  $\text{Na}^+$  se ferment. C) Phase de repolarisation : ouverture des canaux potassium ( $\text{K}^+$ ) et sortie des ions chargés positivement permet à la cellule de retourner au potentiel de repos et ainsi, être disponible pour le prochain déclenchement de potentiel d'action. Inspiré de Moyes et Schulte (2008).



**Figure 1.2** **Résumé des principales étapes de la transmission de l'influx nerveux au-delà de la fente synaptique.**

1- L'influx nerveux se propage le long du neurone par une suite de potentiels d'actions. Le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) permet la propagation du signal au-delà de la fente synaptique. A) En condition normale; 2- Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) présents à la surface du neurone post-synaptique captent le neurotransmetteur ACh. 3- La liaison entre nAChRs et ACh permet la propagation du signal nerveux au-delà de la fente synaptique. 4- La liaison est hydrolysée par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE). La choline est alors recapturée par l'élément pré-synaptique pour synthétiser de nouvelles molécules d'ACh. B) En présence de néonicotinoïde; 2- Le NEOC agit comme agoniste et se lie aux récepteurs nAChRs. 3- et 4- La liaison est considérée comme étant irréversible et permanente. L'influx nerveux est transmis de façon continue causant une hyper-excitation de la cellule, résultant en une paralysie, un épuisement cellulaire entraînant la mort de l'insecte intoxiqué. Inspiré de Bordereau (2011).

### 1.2.6 Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase

Une des techniques pouvant être utilisées pour mesurer le potentiel de perturbation du système cholinergique par les insecticides de types neurotoxiques est la mesure de l'activité de l'AChE (Chambers et al., 2002). La quantification de l'activité de cette enzyme, élément clé dans la régulation de la transmission synaptique, est communément utilisée comme biomarqueur pour mesurer les effets d'une exposition aux insecticides carbamates et organophosphorés, autant chez les invertébrés que vertébrés (Chambers et al., 2002). Ces insecticides inhibent l'activité AChE (Chambers et al., 2002) alors qu'une augmentation est observée chez les organismes exposés aux NEOCs (Figure 1.2) (Morakchi et al., 2005; Kimura-Kuroda et al., 2012; Boily et al., 2013). Chez l'abeille (*Apis mellifera*) (Boily et al., 2013) et la daphnie (*Daphnia magna*) (Jemec et al., 2007; Qi et al., 2018), on observe que l'activité de l'AChE augmente en présence de NEOCs. Chez les vertébrés, les résultats obtenus par Kimura-Kuroda et al. (2012) démontrent le potentiel de perturbation du métabolisme de l'ACh par les NEOCs. Une perturbation du métabolisme de l'ACh, mesurée par l'activité de l'AChE, peut avoir des répercussions importantes sur les vertébrés puisque cette enzyme est présente dans de nombreux tissus (système nerveux, cerveau, muscle) et est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques (Grisaru et al., 1999; Behra et al., 2002; Chuiko et al., 2000). Les impacts pourraient être d'autant plus importants pour les jeunes individus pour lesquels la quantité d'AChE est considérée plus importante en raison de son implication dans le développement neuronal et musculaire (Behra et al., 2002). Le développement d'un biomarqueur chez les vertébrés, telle que la mesure de l'activité de l'AChE, permettra de valider cette hypothèse.

### 1.2.7 Toxicité chez les organismes non ciblés

En réponse aux nombreuses études démontrant les effets néfastes des NEOCs sur des organismes non ciblés (Morrissey et al., 2015; Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2015), les pressions sont présentement très fortes partout dans le monde pour augmenter l'encadrement et restreindre l'usage des NEOCs au Québec (Radio-Canada, 2017; <https://ici.radio-canada.ca/nouvelle/1056828/pesticides-neonicotinoides->

tueurs-abeilles-biodiversite-menace-recherche; Radio-Canada, 2018, <https://ici.radio-canada.ca/nouvelle/1084649/quebec-encadrer-usage-pesticides-tueurs-abeilles-neonicotinoides>). En Ontario, des mesures ont déjà été mises en place afin de réduire de 80 % l'usage des semences traitées avec des NEOCs dans les terres agricoles (Gouvernement de l'Ontario, 2017, <https://www.ontario.ca/fr/page/la-sante-des-pollinisateurs>) et dans l'Union Européenne, les trois NEOCs les plus communs (IMI, TMX, CLO) y sont interdits (European Commission, 2018). Les abeilles, qui entrent en contact avec les NEOCs par l'ingestion quotidienne de pollen, sont particulièrement affectées et leur déclin mondial est à la base des demandes croissantes de réduire et de bannir leur utilisation (Pisa et al., 2014, van der Sluijs et al., 2014; Cresswell, 2011). Toutefois, les mesures mises en place concernent principalement les pollinisateurs et ne fait pas mention des organismes aquatiques ou des vertébrés.

La présence des NEOCs dans l'environnement entraine des effets indésirables non seulement chez les invertébrés, mais aussi chez les vertébrés (Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2015; Gibbons et al., 2015). Les vertébrés sont catégorisés comme organismes moins sensibles, car les concentrations détectées dans l'environnement sont inférieures aux concentrations létales établies en laboratoire (Whiteside et al., 2008; Anderson et al., 2015). C'est le cas notamment des poissons pour lesquels les concentrations létales indiquées dans la littérature sont de l'ordre de milligramme ou gramme par litre (Whiteside et al., 2008; Tišler et al., 2009). Toutefois, comme souligné par plusieurs auteurs, une concentration de l'ordre d'un microgramme par litre, mesuré en milieu aquatique (Hladik et al., 2014), entraine des effets sous-létaux chez les organismes, indiquant un réel potentiel toxique (Gibbons et al., 2015; Pisa et al., 2014; Vieira et al., 2017).

Tout comme chez les invertébrés, les NEOCs peuvent affecter de façon similaire le comportement, le succès reproducteur et la condition générale des vertébrés exposés (voir la revue de littérature de Gibbons et al. (2015)). Dans une étude effectuée sur la loche (*Misgurnus anguillicaudatus*) exposée à l'IMI, Xia et al. (2016) ont observé des signes d'hyperactivité (sauts, torsions et perte d'équilibre) préalablement à la mort des

individus. Crosby et al. (2015) ont observé chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) exposé à l'IMI une réduction des activités de nage, des signes d'agressivité, ainsi qu'un retard dans la réponse aux stimuli. Tel que souligné par Barbee et Stout (2009), ces variations dans le comportement sont similaires à ceux qui ont aussi été observés chez les abeilles en contact avec les NEOCs. Chez les vertébrés, que ce soit chez le rat (Kapoor et al., 2011) ou chez des oiseaux granivores nourris avec de graines enrobées de NEOCs (Lopez-Antia et al., 2015), il a été observé que le succès reproducteur était fortement réduit suivant une ingestion quotidienne d'IMI. La condition générale des individus était également moindre en termes de perte de poids et de réduction de l'alimentation. Le taux de survie des jeunes issus des individus exposés étaient aussi diminués (Lopez-Antia et al., 2015). Une exposition aux NEOCs durant les premiers stades ontogéniques peut retarder le développement des embryons (Gobeli et al., 2017; Velisek et Stara, 2018) et avoir des répercussions sur le comportement à long terme (Crosby et al., 2015).

Certains stades de vie pourraient être plus sensibles à la toxicité des NEOCs. Malheureusement, il n'est pas possible d'approfondir davantage le sujet, car peu d'auteurs se sont penchés sur cette question au niveau des vertébrés. Chez les invertébrés, la toxicité de l'IMI, plus élevée chez les larves d'écrevisses (*Orconectes propinquus*), suggère que le stade larvaire pourrait être plus sensible que le stade adulte (Key et al., 2007).

### 1.2.8 Potentiel de bioaccumulation

Les NEOCs sont des insecticides systémiques avec une grande solubilité dans l'eau et un faible coefficient de partition octanol-eau (log P) (Bonmatin et al., 2015). Ces caractéristiques, communes aux nouveaux insecticides disponibles sur le marché, signifient qu'ils se répartiront facilement dans toutes les parties de la plante au cours de sa croissance, la protégeant ainsi contre les insectes ravageurs (Bonmatin et al., 2015). Leur faible log P indique également que ces insecticides n'ont pas le potentiel de se bioaccumuler dans les lipides des organismes qui ingérèrent les graines enrobées ou les plantes traitées. Effectivement, après 24 h, plus de 90 % de la quantité d'IMI ingérée par

les rats était rejetée dans l'urine de ces animaux (Tomizawa et Casida, 2005) et aucune accumulation dans les tissus n'avait été mesurée (Bednarska et al., 2013). Toutefois, comme Ford et Casida (2006) l'ont souligné dans leur étude effectuée sur la souris (*Mus musculus*), les formes de TMX rejetées par l'organisme étaient en grande partie (44 %) métabolisées en sous-produits. Ceci signifiait que le foie, qui est grandement impliqué dans les mécanismes de détoxification, pouvait être soumis à un stress oxydatif important.

### **1.3 Rayonnement ultraviolet**

#### **1.3.1 Effets néfastes du rayonnement ultraviolet**

Le rayonnement ultraviolet reçu à la surface de la Terre représente un facteur de risque important pour les organismes vivants, autant aquatiques que terrestres. Le RUV, particulièrement les UVB (280–320 nm), est associé à de nombreux effets négatifs tels qu'un faible taux de survie, un retard de croissance, des anomalies développementales et des dommages au niveau cellulaire (Whitehead et al., 2000; Bancroft et al., 2008). Les UVA (320-400nm) peuvent être tout aussi néfastes pour les organismes vivants, car même s'ils possèdent une énergie plus faible comparativement aux UVB, ils sont reçus en proportion plus grande à la surface de la Terre (Williamson et al., 1997; Whitehead et al., 2000). En effet, le taux de mortalité peut être tout aussi important chez les larves exposées aux UVA que chez celles exposées aux UVA et UVB simultanément (Boily et al., 2011).

Avec l'inquiétude grandissante de l'augmentation du RUV à la surface de la Terre due à l'appauvrissement de la couche d'ozone, de nombreuses recherches et revues de littérature ont été effectuées sur les organismes aquatiques et terrestres. Les principales conséquences d'une exposition au RUV sont reliées à la survie et à la croissance (Bancroft et al., 2008), principalement à cause des photodommages causés à l'ADN. Un des principaux photodommages causés par les UVB est l'accumulation de dimères cyclobutaniques de pyrimidines (anglais : *cyclobutan pyrimidine dimer*, CPD) qui,

lorsque non éliminés, entraînent des dommages permanents au niveau de l'ADN pouvant résulter en mutations, malformations et entraîner la mort de l'organisme. Ce type de dommage à l'ADN est réparé en absence de lumière par un groupe d'enzymes nommées photolyases, préalablement activées par les UVA et la lumière visible (Vetter et al., 1999; Vincent et Neale, 2000). Ainsi, les photodommages de type CPD peuvent être éventuellement éliminés au cours du cycle journalier si les organismes ont été exposés aux UVA et à la lumière visible (Wiegand et al., 2004; Vetter et al., 1999). Dans le cas où les mécanismes de photoréparation seraient insuffisants pour contrebalancer les dommages causés par les UVB, l'accumulation de CPD aurait alors des effets nocifs permanents au niveau de l'ADN (Vincent et Neale, 2000). Les risques seraient d'autant plus importants durant les premiers stades de développement, tel que souligné par Bancroft et al. (2008). Les études énumérant les conséquences sur la croissance d'une exposition au RUV chez les embryons ou les larves de vertébrés aquatiques sont nombreuses (Provencher, 2014; Pouzand et Tyrell, 1999; Blaustein et Kiesecker, 2002; Mahmoud et al., 2009). Durant les premiers stades de développement, les dommages seraient alors irréversibles étant donné que les mécanismes de photoréparation (photolyase) et photoprotection (mélanine), ainsi que leur capacité de s'éloigner des zones à risques seraient alors limités pour ces jeunes organismes (Epel et al., 1999; Vincent et Neal, 2000).

### **1.3.2 Atténuation du rayonnement ultraviolet en milieu lacustre**

La majorité des publications traitant du rayonnement ultraviolet font état d'études effectuées en laboratoire avec des lumières artificielles ne représentant pas toujours les conditions naturelles auxquelles les organismes aquatiques sont exposés. Plus précisément, une exposition à la lumière artificielle n'est pas représentative des longueurs d'onde reçues à la surface de l'eau (UVA, UVB et lumière visible). De plus, dans le cas d'une exposition au rayonnement UVB seulement, cela élimine la possibilité des organismes de mettre en place des mécanismes de photoréparation pendant la nuit (activés pendant le jour par les UVA et la lumière visible). Aussi, il est important de considérer que le ratio UVA / UVB reçu en milieu naturel peut varier en fonction de la



couleur de l'eau. En milieu aquatique, la quantité et le type de RUV qui pénètre dans la colonne d'eau sont dépendants des caractéristiques de la matière organique présente. L'atténuation de RUV dans la colonne d'eau est directement reliée à la présence de la matière organique dissoute colorée (anglais : *chromophoric dissolved organic matter*; cDOM). L'absorption de la cDOM étant maximale à 280 nm, les UVB (280-320 nm) pénétreront donc moins profondément dans la colonne d'eau que les UVA en présence de ces composés. Dans un milieu où la concentration de la cDOM serait élevée, il est estimé que les UVB ne dépasseraient pas les 20 premiers centimètres de la colonne d'eau (Whitehead et al., 2000).

Au LSP, à cause des masses d'eau ayant différentes propriétés optiques, l'atténuation du RUV dans l'eau est très variable et, dépendamment de la profondeur et de la concentration en cDOM, les UV peuvent pénétrer jusqu'à 40 à 80 cm de la colonne d'eau (profondeur moyenne de la colonne d'eau : 2,7 m). La pénétration du RUV dans la colonne d'eau varie toutefois grandement entre les trois masses d'eau identifiées dans le LSP (nord, chenal de navigation, sud), qui se différencient par leurs sources et leurs caractéristiques physico-chimiques (Frenette et al., 2003). Dans la masse d'eau du sud, le RUV pénétrerait plus profondément dans la colonne d'eau comparativement aux deux autres masses d'eau puisque la cDOM mesurée y est plus faible. La pénétration du RUV dans la colonne d'eau peut aussi varier tout au long de la période estivale, dépendamment de l'établissement de la végétation, qui est estimé être complet après le mois de juin (Frenette et al., 2003).

#### **1.4 Stress oxydatif**

Les biomarqueurs sont des outils permettant d'évaluer les effets néfastes de stressseurs environnementaux (RUV) et anthropiques (NEOCs) auxquels les organismes vivants sont exposés dans leur milieu (Menéndez-Helman et al., 2014). Le degré de stress chez un organisme peut être quantifié par l'utilisation de biomarqueurs qui mesurent directement ou indirectement la manifestation du stress oxydatif (Livingstone, 2001). Plus précisément, le stress oxydatif est mesuré lors d'un déséquilibre de l'état normal

des systèmes biologiques (système REDOX), c'est-à-dire qu'il est causé par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'incapacité de l'organisme à les éliminer par une réponse anti-oxydante non enzymatique (vitamines C et E et caroténoïdes) ou enzymatique (superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT)). Jusqu'à un certain point, la réponse antioxydante peut compenser cette production élevée d'EROs, mais lorsque celle-ci dépasse les capacités de l'organisme, des dommages importants sont observés au niveau cellulaire, notamment au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (Livingstone, 2001; Livingstone, 2003; Lushchak, 2011).

Dans le cas des lipides, les EROs ciblent principalement les acides gras polyinsaturés qui ont une double liaison carbone-carbone (*Polyunsaturated Fatty Acids*, *PUFAs*). Les PUFAs sont des composantes majeures des membranes cellulaires et des dommages à ce niveau causent une perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane plasmique (Ayala et al., 2014). Un des produits caractéristiques résultant de la peroxydation des lipides est la malondialdéhyde (MDA). La formation de MDA est mesurée en ajoutant de l'acide thiobarbiturique qui, en réagissant avec la MDA à haute température et dans un milieu acide, forme un produit de couleur rosé pouvant être quantifié par spectrophotométrie. La méthode de dosage des substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) est un test communément utilisé pour évaluer la peroxydation des lipides des organismes aquatiques (Lushchak, 2011; Ayala et al., 2014; Liu et al., 2006).

La présence de contaminants comme les NEOCs dans le milieu aquatique est associée à une augmentation du stress oxydatif. L'exposition aux NEOCs (Ge et al., 2015; Topal et al., 2017; Vieira et al., 2017) et au RUV (Mekkawy et al., 2010; Carrasco-Malio et al., 2014) résulte en une augmentation de la peroxydation des lipides. Plusieurs facteurs influencent la peroxydation des lipides tels que le stade de développement (Mekkawy et al., 2010), la durée de l'exposition (Carrasco-Malio et al., 2014; Velisek et Stara, 2018), la condition générale des organismes (Vieira et al., 2017) et la quantité et le types de lipides disponibles dans les tissus analysés (Vinagre et al.,

2012; Vieira et al., 2017). Dans l'objectif d'obtenir un portrait global de la réponse des organismes face à des stressseurs (pesticides, RUV), les études ayant recours à des biomarqueurs liés au stress oxydatif rapportent également, en parallèle, l'activité des enzymes antioxydantes (Boily et al., 2011; Ge et al., 2015; Topal et al., 2017; Vieira et al., 2017).

## 1.5 Objectifs et hypothèses

L'objectif de cette étude était de déterminer quels sont les effets sur la survie, l'activité de l'AChE et la peroxydation des lipides des larves de perchaude exposées simultanément au RUV naturel (sans UV, UVA ou UVAB) et aux NEOCs TMX et IMI en formulation commerciale. En se basant sur la littérature, nos hypothèses sont que :

- a) la présence du RUV, en particulier du rayonnement UVB, diminuera le taux de survie;
- b) la présence de NEOCs à des concentrations situées au-delà du CVAC diminuera le taux de survie;
- c) la présence simultanée du RUV et des NEOCs diminuera de façon synergique le taux de survie;
- d) la présence des NEOCs augmentera l'activité de l'AChE dans les tissus;
- e) la présence du RUV augmentera la peroxydation des lipides dans les tissus;
- f) la présence des NEOCs augmentera la peroxydation des lipides dans les tissus;
- g) la présence simultanée du RUV et des NEOCs augmentera de façon synergique la peroxydation des lipides dans les tissus.

Nous souhaitons également déterminer s'il existe une interaction (négative ou synergique) entre les NEOCs et le RUV.

## **CHAPITRE II**

### **APPROCHES EXPÉRIMENTALES ET MÉTHODOLOGIQUES**

L'objectif de ce projet de maîtrise était de mesurer les effets interactifs des insecticides de type NEOC et du RUV sur la survie et les réponses biochimiques des larves de perchaude. Ce projet s'insérait dans un programme de recherche de plus grande envergure qui avait débuté en 2013 en collaboration avec le MFFP et qui avait pour objectif de mieux comprendre comment la contamination de l'eau par les pesticides affecte la population de perchaudes du LSP, actuellement en situation préoccupante. En collaboration avec C. Landry et M. Gauthier, étudiants à la maîtrise sous la direction de M. Boily, des biomarqueurs ont été développés comme outils diagnostiques.

Trois expériences en conditions semi-naturelles ont été réalisées avec deux NEOCs communément détectés dans les cours d'eau bordant les terres agricoles, soit l'IMI et le TMX (Hladik et al., 2014; Schaafsma et al., 2015; Giroux, 2018) (Tableau 2.1).

**Tableau 2.1**

Expériences réalisées en 2015 et 2016 avec des larves de perchaude exposées à des formulations commerciales de thiaméthoxame (TMX) et de d'imidaclopride (IMI) ainsi qu'au RUV naturel

	Expérience A	Expérience B	Expérience C
Néonicotinoïde	TMX	IMI	TMX et IMI
Année	2015	2016	2016
Date	9 - 15 mai	4 - 10 mai	2 - 6 juin
Durée (jours)	7	7	4
Provenance des pontes	Lac Saint-Pierre	Lac Saint-Pierre	Lac à la Perchaude
Nombre de larves par réplicat	80	120	100
Nombre de réplicats	5	6	5
Marqueurs biochimiques	Non	Oui	Oui

## 2.1 Collecte, éclosion et transfert des larves de perchaude

La période de reproduction de la perchaude se déroule au printemps (avril-mai), et peut s'étendre jusqu'en juillet, tout dépendamment du moment où la température de l'eau atteint 6,7-12 °C (Mingelbier et al., 2005). Les sites de reproduction utilisés par cette espèce sont localisés dans des zones d'herbiers en eau peu profonde (0,3 à 1 m) (Mingelbier et al., 2005; Scott et Crossman, 1973). Les pontes de perchaude sont facilement reconnaissables par leur forme tubulaire et torsadée (Scott et Crossman, 1973).

Au début du mois de mai 2015 et 2016, respectivement 8 et 10 pontes ont été échantillonnées au LSP avec une épuisette en bordure des terres agricoles à Berthierville (46°08'29'' N, 73°16'37'' O, Québec, Canada). Un total de 4 pontes de perchaude ont aussi été échantillonnées en juin 2016 au lac à la Perchaude à Shawinigan (46°38'01'' N, 72°50'14'' O, Québec, Canada). Étant plus profond, ce lac se réchauffe plus lentement ce qui décale, par rapport au LSP, la période de reproduction de cette espèce (comm. pers.; A. Bertolo). Ce lac a donc été ajouté à l'étude dans l'objectif de prolonger et de maximiser le nombre d'expériences possibles.

Les pontes de perchaude ont été transportées dans des glacières et ont été transférées dans les bassins d'élevage du laboratoire humide à l'UQTR. Les pontes ont été oxygénées et maintenues sous une photopériode de 8 h de clarté et de 16 h de noirceur dans un système à circulation fermé à très faible courant. La température de l'eau déchloraminée dans les bassins d'élevage a été ajustée à la température de l'eau mesurée lors de la récolte des pontes ( $16\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ). Les œufs morts et infectés par les champignons ont été rapidement retirés. L'éclosion des larves a eu lieu dans les 24 à 72 heures suivant le transfert à l'UQTR.

## 2.2 Conditions expérimentales

Les larves récemment écloses âgées d'approximativement 24 h ont été transférées dans des incubateurs (contenant en Pyrex® de 350 ml, 5 cm hauteur x 11 cm diamètre)

dans un montage extérieur. Un délai de 24 h a été respecté avant le début des expériences pour permettre aux larves de s'adapter à leur nouvel environnement. Afin de minimiser les fluctuations rapides de température, chacun des incubateurs a été placé en bain-marie dans des glacières en styromousse® (désigné comme bloc dans le montage expérimental). Le jour, l'eau de ces glacières circulait à travers un système de refroidissement pour réduire l'augmentation rapide de température en milieu de journée et la nuit, des couvercles étaient déposés sur la glacière pour réduire les pertes de chaleur. En présence de forte pluie, les couvercles ont également été utilisés afin d'éviter le débordement des incubateurs. La température de l'eau dans chacune des glacières a été suivie avec des enregistreurs de température de type HOBO® (Pendant loggers, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, États-Unis) et était similaire à un cycle naturel (données non publiées, A. Bertolo).

Les larves, qui étaient âgées de 48 h au début des expérimentations, ont été nourries de nauplii d'artémie (2015) ou de rotifères (2016) une fois par jour. Pour éviter l'accumulation de déjections toxiques, approximativement 1/3 de l'eau (100 ml sur 350 ml) de chaque incubateur a été renouvelé avec une nouvelle solution d'eau déchloraminée et de NEOCs préparée la journée même. Des échantillons d'eau ont aussi été prélevés lors de ces changements dans le but de valider la concentration de NEOCs présente dans le milieu. Ceux-ci ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse.

### **2.3 Protocole d'exposition au rayonnement ultraviolet**

Le protocole d'exposition au RUV naturel a été adapté de Boily et al. (2011). Trois filtres UV ont été utilisés, soit le J-Roll® utilisé pour bloquer à la fois les UVA et les UVB (filtre sans UV), le Mylar-d® utilisé pour bloquer les UVB seulement (filtre UVA), et en tant que contrôle, le Whirlpak® qui laisse passer aussi bien les RUV que la lumière visible (filtre UVAB). Une toile moustiquaire en fibre de verre noire (Fiberglass screening 30'' x 84'' long, New York Wire) a été ajoutée au-dessus des filtres UV afin d'atténuer de 30 % l'exposition globale des larves au RUV et ainsi en diminuer la mortalité moyenne dans tous les traitements (Boily, 2010).

## 2.4 Protocole d'exposition aux néonicotinoïdes

Dans le but de reproduire les risques d'exposition en conditions naturelles, les formulations commerciales de TMX (Syngenta®) et d'IMI (Bayers®) ont été utilisées. Dans les expériences A et B, les concentrations des NEOCs ( $0 \text{ ng/L}^{-1}$ ,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  et  $23 \text{ ng/L}^{-1}$ ) ont été choisies de façon à reproduire le dépassement du CVAC ( $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$ ). Celles-ci ont été croisées avec trois niveaux de RUV naturel (sans UV, UVA, UVA et UVB). En parallèle, une quatrième concentration de NEOC ( $132,8 \text{ ng/L}^{-1}$ ) en absence de RUV a aussi été testée afin d'augmenter le gradient d'exposition des larves de perchaude aux NEOCS et ainsi, mieux comprendre l'effet du TMX et de l'IMI en absence de photodégradation. Cette quatrième concentration correspond au critère de qualité de l'eau utilisée par l'Union européenne ( $140 \text{ ng/L}^{-1}$ ) (Giroux, 2014). Dans le cas de l'expérience C, quatre combinaisons de concentrations de TMX et/ou d'IMI ont été testées dans le but de reproduire la présence simultanée de NEOCs dans le milieu aquatique au printemps. Avec les trois niveaux de rayonnement UV naturel, les combinaisons de NEOCs étaient: aucun NEOCs,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  de TMX,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  d'IMI et simultanément,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  de TMX et d'IMI.

### 2.4.1 Expérience A : thiaméthoxame x UV

Les larves de perchaude provenant du LSP ont été exposées à trois concentrations de TMX ( $0 \text{ ng/L}^{-1}$ ,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  et  $23 \text{ ng/L}^{-1}$ ) croisées avec trois niveaux de RUV naturel (sans UV, UVA, UVAB) dans 5 blocs complètement randomisés. Une quatrième concentration de TMX ( $132,8 \text{ ng/L}^{-1}$ ) en absence de rayonnement UV a aussi été testée afin d'augmenter le gradient d'exposition des larves de perchaude aux NEOCS et ainsi, mieux comprendre l'effet seul du TMX. Les 10 traitements ont été respectivement reproduits 5 fois. Les larves ont été exposées au rayonnement de 8h à 16 h durant 7 jours. Les changements d'eau ont été effectués en milieu de journée entre 11 h et 13 h.



#### 2.4.2 Expérience B : imidaclopride x UV

Les larves de perchaude provenant du LSP ont été exposées à trois concentrations d'IMI ( $0 \text{ ng/L}^{-1}$ ;  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$ ;  $23 \text{ ng/L}^{-1}$ ) croisées avec trois niveaux de RUV naturel (sans UV, UVA, UVAB) dans 6 blocs complètement randomisés. Tout comme pour l'expérience A, une quatrième concentration d'IMI ( $132,8 \text{ ng/L}^{-1}$ ) en absence de RUV a été testée afin d'augmenter le gradient d'exposition et de mieux comprendre l'effet de l'IMI en absence de RUV. Les 10 traitements ont été répliqués 6 fois (6 blocs expérimentaux). Dans cette expérience, le nombre de larves ainsi que le nombre de réplicats ont été augmentés afin de maximiser la quantité de tissus de larves pouvant être récoltées à la dernière journée de l'expérience pour la mesure de marqueurs biochimiques. Aussi, contrairement à la première expérience, les larves ont été exposées au RUV sur une plage horaire de 9 h à 17 h plutôt que 8 h à 16 h. La raison de cette modification est que les changements d'eau avec les nouvelles solutions de NEOCs devaient être effectués en début de journée entre 9 h et 11 h comparativement à l'expérience précédente où ceux-ci étaient effectués en milieu de journée. Il a été observé suite à l'expérience A, que ces changements effectués en milieu de journée, lorsque la température de l'eau et l'indice UV pouvaient être à son maximum. La plage horaire d'exposition a donc dû être changée, tout en considérant suffisamment de temps en début de journée pour permettre pour la préparation des solutions.

#### 2.4.3 Expérience C : thiaméthoxame x imidaclopride x UV

Les larves de perchaude provenant du lac à la Perchaude (Shawinigan, Québec, Canada) ont été exposées à quatre combinaisons de concentration de TMX et/ou d'IMI de façon à reproduire la présence simultanée de NEOCs dans le milieu aquatique au printemps. Les combinaisons de NEOCs étaient :  $0 \text{ ng/L}^{-1}$ ,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  de TMX,  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  d'IMI et  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  de TMX +  $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$  d'IMI. Ceux-ci ont été croisés avec trois niveaux de rayonnement UV naturel (sans UV, UVA, UVAB) dans des blocs complètement randomisés. Les 12 traitements ont été reproduits 5 fois. Les larves ont été exposées au rayonnement UV de 9 h à 17 h durant 4 jours et comme l'expérience B, les changements d'eau ont été effectués en début de journée. Cette expérience, qui était

effectuée avec des larves, provenant d'ailleurs qu'au LSP, a été réalisée au mois de juin plutôt qu'en mai. Ce décalage de près de 4 semaines a permis de maximiser le nombre d'expériences pouvant être réalisées avec des larves de perchaude.

## 2.5 Survie et collecte des tissus

Avant le début des expériences et pour chaque jour d'expérimentation, les larves mortes ont été comptabilisées et retirées des incubateurs. Au dernier jour de l'expérience, les larves vivantes ont été euthanasiées à l'eugénol, récoltées et conservées au congélateur à -80 °C jusqu'à l'analyse ultérieure des marqueurs biochimiques. Dans le cas de l'expérience A, les larves de perchaude ont été placées individuellement sur du papier d'aluminium. Cette méthode de conservation s'est avérée très laborieuse et a causé la déshydratation des larves, rendant les analyses des tissus impossibles. La méthode de conservation a donc été modifiée pour les expériences suivantes. Ainsi, pour les expériences B et C, les larves ont plutôt été regroupées dans une vial de type Eppendorf® où le maximum d'eau était retiré avec une seringue. Préalablement au transfert dans le congélateur à -80 °C, le poids des larves était noté.

## 2.6 Analyses biochimiques

L'analyse des marqueurs biochimiques a été réalisée seulement pour les expériences B et C, étant donné la méthode de conservation et le nombre insuffisant de larves vivantes à la fin de l'expérience A. Pour réaliser les analyses biochimiques, il était nécessaire d'avoir une quantité minimale de 0,5 g de tissu.

Les tissus ont été homogénéisés avec un *Polytron Kinematica PT 1600E Benchtop Homogenizer* (Kinematica AG, Bohemia, NY, USA) dans un tampon *Low Salt Triton* (LST) (10mM NaCl, 1 %m/v triton X-100, 15 mM NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, pH 7,3) en respectant la concentration de tissus avoisinant 0,167 g/ml. L'homogénat a été centrifugé à 6000 x g à 4 °C durant 20 minutes. À partir de ce même surnageant, les mesures de l'activité de

l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), de la peroxydation de lipides (TBARS) et des protéines ont été réalisées successivement.

La méthode développée par Ellman et al. (1961) a été adaptée pour mesurer l'activité de l'AChE en microplaque (96-puits, microplaque de quartz, Hellma Canada Ltd., Markham, ON, Canada). La réaction a été suivie au spectrophotomètre (i-control 1.9 Microplate Reader Software, Tecan, Morrisville, NC, USA) durant 30 minutes à 412 nm. La différence d'absorbance a été mesurée en soustrayant la valeur obtenue après 10 minutes de celle obtenue à 30 minutes. L'activité de l'AChE a ensuite été rapportée par gramme ou mg de protéines.

La méthode de dosage des substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) a été adaptée de Camejo et al. (1998) et Hedrei Helmer et al. (2014) en utilisant toutefois le tampon LST (10mM NaCl, 1 % m/v triton X-100, 15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3). Les résultats ont été rapportés par gramme de tissus.

Le dosage des protéines dans les homogénats de larves de perchaude a été déterminé en utilisant le kit BCA de Thermo Fisher Pierce (ThermoScientific™ Pierce™ BCA protein Assay, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des trois expériences ont été regroupés dans l'article "Interactive effects of neonicotinoids and natural ultraviolet radiation on yellow perch (*Perca flavescens*) larvae" soumis à *Science of the Total Environment*.

Interactive effects of neonicotinoids and natural ultraviolet radiation on yellow perch  
(*Perca flavescens*) larvae

Paquet-Walsh A.<sup>1</sup>, A. Bertolo<sup>1\*</sup>, Landry C.<sup>2</sup>, Deschamps L.<sup>1</sup> and M. Boily <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Département des sciences de l'environnement, Université du Québec à Trois-Rivières,  
3351 Boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières QC G9A 5H7

<sup>2</sup> Groupe de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN) et Département des  
sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville,  
Montréal QC H3C 3P8

\*Corresponding author: [Andrea.Bertolo@uqtr.ca](mailto:Andrea.Bertolo@uqtr.ca)

## Abstract

Neonicotinoids (NEOCs) are insecticides widely used worldwide in the culture of maize and soya. Whereas they target specifically terrestrial insects by acting as antagonists of the neurotransmitter acetylcholine in their nervous system, their effects on the cholinergic system of vertebrates is still unclear. Moreover, there is an increasing concern about their effects on the aquatic biota because of their high leaching potential. In the agricultural watershed of the Lake St. Pierre (LSP) (St. Lawrence River System, Quebec, Canada), for example, NEOCs concentrations considered toxic for the aquatic biota ( $> 8.3 \text{ ng/L-l}$ ) have been frequently detected. These conditions may affect the yellow perch population in LSP, which collapsed in the mi-1990's, and is now experiencing poor recruitment. Moreover, because their larvae are found in shallow waters ( $< 80\text{cm}$ ) nearby the agricultural lands, they are also exposed to ultra-violet radiation (UVR), with unknown potential interactions with NEOCs. The objective of this study was to test the synergistic effects of two commonly used NEOCs (imidacloprid and thiamethoxam) with natural UVR on yellow perch larvae by using both survival analysis and biomarkers to better quantify both lethal and sublethal effects. Three common garden experiments were conducted with thiamethoxam and/or imidacloprid and natural UVR following a factorial design. Our results showed an interaction between UVR and both NEOCs in terms of mortality of larvae. At the sublethal level, imidacloprid was associated, as expected, to an increased acetylcholinesterase activity, thus indicating a cholinergic perturbation, but also to an unexpected reduced lipid peroxidation. A reduction in the overall lipid accumulation is suspected to be behind this puzzling result. These results will contribute not only to better understand the factors hindering the recovery of the yellow perch population in LSP, but also to open new research avenues related to the effects of NEOCs on proteins and lipid accumulation.

Keywords: acetylcholinesterase, biomarker, fish larvae, imidacloprid, lipid peroxidation, neonicotinoid, sublethal-effects, survival analysis, thioamethoxam, UV radiation

## Introduction

Neonicotinoids (NEOCs) are insecticides commonly applied in the coating of maize and soya seeds to control crop pests (Jeschke et al., 2011; Schaafsma et al., 2016). Their extensive use in agriculture coupled with a high leaching potential represents a high risk for non-targeted organisms such as pollinators (Cresswell, 2011) and aquatic biota (Pisa et al., 2014). NEOCs such as imidacloprid (IMI) and thiamethoxam (TMX) are in fact frequently detected in surface waters (Hladik et al., 2014; Main et al., 2014; Schaafsma et al., 2015; Giroux, 2018) at concentrations that could be considered toxic for the aquatic life. Both sublethal (growth, biodiversity and behavior) and lethal effects have been observed in aquatic invertebrates exposed in controlled conditions to environmental relevant concentrations of NEOCs, suggesting that they represent a threat also for non-target organisms (Gibbons et al., 2015; Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2015; Morrissey et al., 2015).

NEOCs interfere with the insects and invertebrates nervous system by acting as antagonist of the neurotransmitter acetylcholine who has a key role in the nervous transmission (Jeschke et al., 2011; 2013). The high degree of affinity and almost irreversible binding of NEOCs to nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) is rapidly lethal to the intoxicated insect (Thany, 2009; Tennekes et Sánchez-Bayo, 2011; Pisa et al., 2014; van der Sluijs et al., 2015). In comparison to invertebrates, toxicity and impacts of NEOCs on the cholinergic system of vertebrates are poorly understood. NEOCs toxicity is usually considered to be lower in vertebrates because the latter have lower proportion of the nAChRs compared to invertebrates (Tomizawa et Casida, 2003; Jeschke et al., 2011; Simon-Delso et al., 2015). However, a study by Kimura-Kuroda and collaborators (2012) using acetylcholinesterase (AChE) activity as a biomarker showed that NEOCs have a potential to affect also the cholinergic system of vertebrates. Cholinesterase biomarkers are an excellent way to assess the cholinergic perturbation potential of toxicants since AChE has a key role in the regulation of nervous transmission by hydrolyzing the link between the neurotransmitter acetylcholine and nAChRs (Chambers et al., 2002). Therefore, we expect that the exposition to NEOCs will increase the activity of AChE not only in invertebrates (Boily et al., 2013),

but also in vertebrates (Kimura-Kuroda et al., 2012), given the potential binding between nAChRs and NEOCs in both cases.

Most studies focus on the effects of NEOCs in controlled laboratory conditions, thus neglecting the multiple factors that might enhance the toxicity of NEOCs in the natural environment. This could be of particular concern in the presence of factors which are already important stressors for aquatic organisms, such as ultraviolet radiation (UVR). This environmental factor could have both direct and indirect effects on NEOCs toxicity, since it might not only affect the toxicity of NEOCs by a photo-degradation process, but also increase sensibility to NEOCs because of its direct negative effects on exposed individuals (Beketov et al., 2011). The effects of UVR have been extensively studied in laboratory conditions and have demonstrated some positive effects on animal cells at low doses, such in the case of UVA, but in most cases these wavelengths have significant adverse effects, particularly in the case of UVB (Bancroft et al., 2008; Vincent et Neale, 2000). Albeit UVA have a lower relative energy than UVB, they may be as detrimental as UVB at high doses because they are present at the water surface in a higher proportion and can penetrate deeper into the water column (Whitehead et al., 2000). In aquatic vertebrates embryos and larvae, UVR can affect growth and increase malformations and mortality (Pouzand et Tyrell, 1999; Blaustein et Kiesecker, 2002; Mahmoud et al., 2009; Provencher, 2014). Young stages could be particularly vulnerable since their mechanisms of photoprotection (e.g. melanin in chromatophores) can be limited given their incomplete development and they show a positive phototropic behavior which increases the risk of UVR exposure (Vincent et Neal, 2000).

Similarly to what observed with contaminants, exposition to UVR has been associated with a high production of reactive oxygen species (ROS) in animal cells. The incapacity of the organisms to neutralize ROS by antioxidant mechanisms can lead to an important oxidative stress, resulting in damages at the cellular level (Livingstone, 2001; 2003; Lushchak, 2011). In the case of lipids, ROS attack polyunsaturated fatty acids causing lipid peroxidation. One of the characteristic products formed during lipid peroxidation is the malondialdehyde (MDA) that can be measured following reaction



with thiobarbituric acid. The total lipid peroxidation, measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a biomarker commonly used to evaluate the oxidative status of fish in their environment (Liu et al., 2006; Ayala et al., 2014; Lushchak, 2011). Therefore, we should expect an increase in lipid peroxidation with both UVR and contaminants (e.g. NEOCs) exposition.

Contamination by NEOCs is a rising concern worldwide in particular where land use has been greatly altered by the intensification of maize and soya cultures (Main et al., 2014; Schaafsma et al., 2016), such as in the case of the southern watershed of Lake St. Pierre (LSP, Québec, Canada) (Giroux, 2018). The integrity of this unique shallow fluvial ecosystem, both a Ramsar (The RAMSAR Convention Secretariat, 2014), and biodiversity UNESCO site (UNESCO, 2012), is today deeply affected by inputs of sediments, phosphorus and contaminants, combined with habitat losses caused by changes in agricultural activities (Hudon et Carignan, 2008; Hudon et al., 2011; de la Chenelière et al., 2014; Dauphin et Jobin, 2016; Goyette et al., 2016). Among the detected contaminants, there is a major concern for the presence of NEOCs which have been often detected in the LSP at concentrations above the chronic aquatic life criterion (CVAC) established in Quebec at 8.3 ng/L-1 (TMX = 3 ng/L<sup>-1</sup> à 160 ng/L<sup>-1</sup>, CLO = 4 ng/L<sup>-1</sup> à 73 ng/L<sup>-1</sup>) (Giroux, 2018). This could affect the recovery of the yellow perch population who has been in a precarious situation since the mid 1990's (Mailhot et al., 2015; Magnan et al., 2014). In LSP, yellow perch spawns in April-May in shallow watersand in marshes close to agricultural lands (often very close to the water surface; A. Bertolo, pers. obs). The larvae are found offshore 2-3 weeks later at depths between 10 and 80 cm and are thus potentially exposed to UVR (P. Brodeur, unpub. results). Eggs hatching occurs during the spring freshet, when significant pesticides peaks, including NEOCs, have been measured (Giroux, 2018), exposing yellow perch larvae to both NEOCs and UVR.

The objectives of this study were to test, in semi-natural conditions, the potential synergistic effects of two commonly used NEOCs (IMI and TMX) in commercial formulation with natural UVR on yellow perch larvae. We coupled survival and

biomarkers analysis (AChE and TBARS test) to better understand the risk of simultaneous exposure to both NEOCs and UVR.

## **Materials and methods**

### ***Yellow perch larvae harvesting***

In order to obtain freshly hatched yellow perch larvae to be used in the experiments, we collected eggs strands from two different sites. Egg strands were collected on the flooded littoral vegetation from a small boat with a hand net on the wetlands of LSP. For the first two experiments, we collected eight strands in May 2015 and ten in May 2016, whereas four were collected by snorkeling at À la Perchaude lake (ALP) (46° 38' 01" N, 72° 50' 14" W, Quebec, Canada) for the third experiment (June 2016) (Table 1).

Yellow perch egg strands were then transported in coolers to the wetlab at the Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR). The egg strands were pooled and placed into oxygenated basins with a closed circulation system with very low current under a light:dark photoperiod of 8h:16h. The temperature of the dechlorinated water in the basins was adjusted with respect to the temperature of the lakes where the egg masses were collected ( $18 \pm 2$  °C). Both fungi-infected and dead eggs were removed daily. Larvae hatched within 24 to 72 hours after the transfer to the wetlab.

### ***Experimental conditions***

Newly hatched larvae of approximately 24 hours old were transferred to the outdoor incubators (350 ml Pyrex®, 5 cm height x 11 cm diameter) on the UQTR campus. A delay of 24 hours was set before the start of the experiments to allow the larvae to adapt to their new environment. In order to minimize short-term temperature fluctuations, the incubators were placed by groups of ten in a water bath in Styrofoam® coolers (referred to as blocks in the experimental setup). Whereas coolers were explicitly

not thermostated, day-night variations in water temperature were modulated to simulate a cycle similar to what observed in the spawning grounds (i.e. min 14-16 degrees during the night and 18-20 degrees max during the day; A. Bertolo, unpublish. data). Therefore, during the day (3-4 hours between 11 a.m. and 3 p.m.), the water in the coolers circulated through a cooling system to reduce the rapid increase of temperature in the middle of the day whereas at night, lids were placed on the coolers to reduce heat loss. In the presence of heavy rain, the lids were also placed to prevent overflow of the incubators. The temperature of the water in each of the coolers was monitored with HOBO® temperature data loggers (Pendant loggers, Onset Computer Corporation, Bourne, MA, Etats-Unis).

The larvae, aged of 48 hours at the beginning of the experiments, were fed once per day ad libitum with brine shrimps (*Artemia* sp.) nauplii in 2015 and with rotifers (*Brachionus plicatilis*) in 2016. To reduce the risk of accumulation of wastes and reduce temporal variation in the level of NEOCs concentration, approximately 1/3 of the water (100 ml by 350 ml) of each incubator was renewed each day with a fresh solution of dechlorinated water (control groups) and NEOCs (exposed groups).

### ***Experimental design***

Three experiments were conducted with commercial formulations of TMX and IMI in order to reproduce the risks of exposure under natural conditions (Table 1). The initial concentration of both TMX (Actara® 240SC, Synagri S.E.C, St-Hyacinthe, QC, Canada) and IMI (Admire® 240F, Synagri S.E.C, St-Hyacinthe, QC, Canada) was 240 g L<sup>-1</sup>. The protocol for exposure to natural UVR has been adapted from Boily and collaborators (2011). Three UV filters have been used: J-Roll® to block both UVA and UVB, Mylar-d® to block UVB only and Whirlpak® as control (i.e. transparent to most visible light and UVR) (see Fig. in Boily et al. 2011). Hereafter, they were referred to No UV, UVA and UVAB, respectively. A black fiberglass mesh screen (Fiberglass screening 30"x84" long, New York Wire, Mexico, USA) was added over all the UV filters to mitigate the overall sunlight exposure by 30% and thus reduce the average

mortality in all treatments (Boily et al., 2011). The intensity of UVR (UVA and UVB pooled) at the water surface was recorded during all the duration of the experiments using a UVR sensor (Apogee® Ultraviolet Sensor Model SU-100).

### Experiments A and B

Yellow perch larvae from LSP were exposed to three concentrations of TMX (Exp-A, May 2015) or IMI (Exp-B, May 2016) crossed with three levels of natural UVR (No UV, UVA, UVAB) in a completely randomized block design. The concentrations of NEOCs (0, 8.33 and 23.32 ng L<sup>-1</sup>) were chosen to encompass the CVAC (Giroux, 2018). A fourth concentration of NEOCs (6x higher than the previous one; 132.8 ng L<sup>-1</sup>) was also tested under J-Roll® filters (i.e. in the absence of UVR) in order to increase the NEOCs gradient and thus better assess the effects of TMX and IMI alone. This fourth level corresponds approximately to the threshold for water quality used by the European Union (140 ng L<sup>-1</sup>) (Giroux, 2014). The treatments were replicated five- and six-fold, respectively, according to the number of eggs available. Both experiments were set for a duration of seven days. The larvae were exposed to UVR from 8:00 am to 4:00 pm for Exp-A and from 9:00 to 5:00 for Exp-B. In Exp-A, the renewals of water was done between 11:00 and 13:00, whereas for the following experiments the renewal was done between 9:00 and 11:00.

### Experiment C

Yellow perch larvae from ALP (Exp-C, June 2016) were exposed to different combinations of TMX, IMI and UVR in a 2x2x3 factorial design to reproduce the conditions of simultaneous presence of different NEOCs and UVR in the aquatic environment. Two levels of TMX (0 and 8.33 ng L<sup>-1</sup>) were crossed with two levels of IMI (0 and 8.33 ng L<sup>-1</sup>) and three levels of natural UVR (no UV, UVA, UVAB) in an uncomplete randomized block design. The 12 treatments were replicated five-fold. The larvae were exposed to the UVR from 9:00 to 17:00 during four days.

### ***Larval survival and tissue collection***

Prior to the beginning of the experiments and for each day of experimentation, dead larvae were counted and removed from the incubators. On the last day of the experiment, all the larvae still alive were counted and euthanized with a clove oil solution (250 mg/L). All the larvae from a same incubator were pooled in a 1.5 ml Eppendorf® and transferred at -80 °C until further analysis of the peroxidation of lipids (TBARS) and AChE activity. The latter measures were done only for Exp-B and Exp-C, since the number of larvae alive at the end of Exp-A was insufficient in some treatments due to high mortality.

### ***Biochemical analyses***

Tissues (0.05 g) were homogenized with Kinematica Polytron PT 1600E Benchtop Homogenizer (Kinematica AG, Bohemia, NY, USA) in a PBS buffer (0.3 ml) with a Triton Low Salt content (LST) (10 mM NaCl, 1% w/v triton X-100, 15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3). The tissues were centrifuged at 6000 × g for 20 min at 4 °C. The supernatant was used in triplicata for measurements of AChE activity, lipid peroxidation and protein contents.

The method of Ellman et al. (1961) who uses acetylthiocholine as the substrate, was adapted as presented in Boily et al. (2013) to measure AChE activity in non-sterile 96-wells microplate (Hellma Canada Ltd., Markham, ON, Canada). The reactive medium for each sample was obtained by mixing 10 µl of the supernatant previously obtained, 957 µl Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.6) and 33 µl DTNB-Tris-HCl (2.5 mM Tris-HCl, pH 7.6). In blank replicates, supernatant was replaced by the same volume of LST. For each replicate, a total of 180 µl of the reactive medium was deposited in a well and a medium, which constituted of a volume of 20 µl acetylthiocholine-DTNB-Tris-HCl (10 mM, pH 7.6) was added to initiate the reaction. AChE activity was then monitored on a spectrophotometer (Infinite M1000 Quadruple Monochromator Microplate Reader, Tecan Group Ltd, Durham, NC, USA) for 30 min at 412 nm.

The activity was measured by subtracting absorbance value obtained at 10 min from the one obtained at 30 min ( $\Delta$ mDO). AChE activity, after the blank reaction was subtracted, was then evaluated per gram of tissues ( $\Delta$ mDO/min/g tissues) and per milligram of proteins ( $\Delta$ mDO/min/mg proteins). Protein assay in tissues was determined using Thermo Fisher Pierce BCA kit (ThermoScientific™ Pierce™ BCA Assay Protein, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada).

The peroxidation of lipids was quantified by thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) based on Ohkawa and collaborators (1979) and Landry and collaborators (2017) using 1,1,3,3,- tetramethoxypropane solution (TTMP) (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) for the standard curve (0.12 to 3.65 nmol TTMP/ml H<sub>2</sub>O nano). The TBARS content was measured from the supernatant previously homogenized with LST by following the steps described in Hedrei Helmer and collaborators (2014) except that the sodium deoxycholate was at a concentration of 10% (w/v). Fluorescence reading was done at an excitation of 530 and 650 nm using a spectrophotometer (described above) for a total volume of 200  $\mu$ l supernatant/well (96 wells-quartz microplate). The emission obtained at 650 nm was subtracted from the emission obtained at 530 in the objective of correcting for the turbidity of the LST. The results were then reported per nmol/g of tissue.

### ***Statistical analysis***

### ***Survival analysis***

A mixed effects proportional hazard Cox model was used to analyze the survival of yellow perch larvae exposed to different experimental treatments. Survival data were modelled by using the *coxph()* function in the “survival” [R] package (R Core Team, 2015; Therneau, 2014; Therneau et al., 2017). This approach allowed the inclusion of both dead and censored individuals (i.e. those still alive at the end of the experiment). This model was also chosen because it is semi-parametric and the fact that no assumptions about the distribution of the baseline hazard function (Klein and Moeschberger, 2003) was necessary. The assumption of proportional hazard was

validated by using both the *cox.zph()* function in the “survival” [R] package and graphical diagnostics included in the survival package (see details in Fox and Weisberg, 2011). In case of violation of the proportional hazard assumption (i.e. when the hazards vary with time between/among the groups), data were stratified by sub-groups by using the *strata()* function in the “survival” [R] package. A different baseline hazard was assumed in this case for the variables violating the proportional hazard assumption, and no direct effect was estimated for these variables. However, it is possible to incorporate interactions with other variables, by estimating their coefficients for each level of stratifying variable (Fox and Weisberg, 2011; Therneau et al., 2017).

The nested nature of our experimental design was taken into account by adding to the Cox model a random effect corresponding to the experimental blocks. Moreover, TMX (Exp-A) and IMI (Exp-B) concentration were modeled either as numerical or categorical in order to take into account potential non-linearity between the predictor and the response variable. In Exp-C the presence or absence of TMX and IMI in the treatment was coded as 1 (presence) or 0 (absence) since only one level of contaminants was used.

Different models were built with the all the possible combinations of the available independent variables (i.e. experimental treatments) in both additive and interactive form. Their fit was compared by using the Akaike Information Criterion corrected for small samples (AICc) (Burnham and Anderson, 2002). The model with the better fit was retained for the analyses.

### ***Biomarkers***

Mixed linear models with different combinations of the available independent variables (i.e. experimental treatments) in both additive and interactive form were built to model biomarkers data. Mixed models were built with the *lme()* function in the “lme4” [R] package (Bates et al., 2015) and, if necessary, corrected for heterogeneous variance among treatments with the *varIdent()* function included in the “nlme” [R] package

(see details in Zuur et al., 2009; Pinheiro et al., 2016). In these models, the nested nature of our experimental design was taken into account by adding in the model a random effect corresponding to the experimental blocks. IMI (Exp-B) concentrations were modeled either as numerical or categorical in order to take into account potential non-linearity between the predictor and the response variable. In Exp-C the presence or absence of TMX and IMI in the treatment was coded as 1 (presence) or 0 (absence).

The relative fit of the models was compared by using AICc and ranked by calculating  $\Delta\text{AICc}$  (i.e. the difference between the AICc of a given model and the AICc of the best model) (Burnham and Anderson, 2002). The relative importance of the different exposition treatment (UV filters, concentration and type of NEOCs) for each of the biomarker (protein content, AChE activity and lipid peroxidation) was determined by multimodel inference. Models with  $\Delta\text{AICc} > 10$  were not included in the multimodel inference approach since they are considered to have low plausibility (Burnham and Anderson, 2002). Akaike weights ( $w_i$ ) were calculated based on  $\Delta\text{AICc}$  values (Mazerolle, 2016) and used to assess both the relative importance of the different models, but also of different explanatory variables. We first determined a 95% confidence set of models by summing up the  $w_i$  of all the models, ranked from the largest to the smallest  $w_i$ , until the cumulative  $w_i$  of the subset sum was equal to 0.95 (Burnham and Anderson, 2002). Model averaging was then calculated based on this 95% confidence set of models by using *mod.avg()* function included in “MuMin” [R] package the average coefficient (conditional) and their relative importance individually and in interaction with each other (Bartoń, 2016). While recognizing the uncertainty of the models tested, this approach allowed us to include more than one plausible hypothesis to explain the response variable, thus not limiting the inference only to the best model (Burnham and Anderson, 2002).



## Results

### *Environmental conditions during the experiments*

Very small differences in temperature trajectories were observed among the blocks. The temperature of the water in each of the experimental block fluctuated daily corresponding relatively well to observed natural cycles (Fig. S1), excepted for their amplitude, which in some cases was larger than that observed in the field.

The incident ultraviolet radiation dose received differed among the three experiments both in terms of daily temporal pattern and total dose (Fig. 1). During Exp-A, UVR daily dose was relatively low during the first four days because of cloud cover, and it almost doubled during the last three days. During both Exp-B and C, the cumulative incident UVR curve showed a steeper curve than Exp-A, with a constant and relatively high daily dose received compared to Exp-A. Overall, the cumulative UVR dose measured for these two experiences was higher than what measured for Exp-A, despite the fact that Exp-B lasted only four days (Fig. 1).

### *Survival analysis*

#### Experiment A

Survival curves showed a clear effect of UVR on yellow perch larvae beginning at day five (Fig. 2), concurrent to the sudden increase in UVR dose received (Fig. 1). Both UVA and UVAB treatments showed in fact a sharp increase in mortality compared to the no-UV treatment at that moment. Probably in relationship with this strong effect, the UVR variable had to be excluded as a predictor from the model because of a violation of the assumption of the proportionality of hazards. In order to properly cope with this issue, UVR levels were used as stratifying variable in the model. Despite UVR were not explicitly included in the model as an independent variable, the stratified Cox model allowed us to properly analyze the effects of NEOCs together with their interactions with UVR. The best model retained contained both TMX and TMX\*UVR

interaction. All the independent variables retained were significantly related to larvae survival but their contribution to determining the hazard ratio was relatively small ( $< 10\%$ ) (Table 2). The hazard ratio indicates that the presence of TMX alone is associated with a better survival (7%) (Fig. 2), an effect also seen with the highest concentration tested (Fig. S2), but have a negative effect when simultaneously present with UVA (-6%) or UVAB (-8%) (Fig. 2). This interaction between TMX and UVAB was even more apparent in the raw survival data with a steep increase in mortality appeared at day four, rather than at day five (Fig. S2).

### Experiment B

The best model to explain larvae survival in the presence of both IMI and UVR contained only UVR, with both factors respecting the assumption of the proportionality of hazards. However, none of the UVA or UVAB coefficients was significantly implicated in determining the hazard ratio (Table 2). Therefore, we have no evidence in this experiment that either UVR or IMI affected larvae survival (Table 2). The overall survival of larvae in this experiment was of 80% after a seven-days exposition (Fig. 2).

### Experiment C

The best model to explain larvae survival in Exp-C contained both NEOCs (IMI and TMX) and their interaction with UVR (Table 2; Fig. 2). As for Exp-A, the UVR variable was excluded as a predictor from this survival analysis model because of a violation of the assumption of proportional hazard and the survival analysis for this experiment was done by stratifying for the UVR treatments. This was eventually due to the bell-shaped curve of UVR dose received, with minimum values observed on the first and last day. In the absence of UVR, TMX was associated, unexpectedly, with a better survival (62%) but this latter was significantly lower when TMX was co-occurring with either UVA (-398%) or UVAB (-429%) (Table 2). Despite a somewhat large associated error, the hazard ratio indicates that, the interaction between UVR and TMX had a strong significant negative effect on survival (Table 2). The contribution of TMX as a covariate

on the hazard ratio was important. In contrast, the presence of IMI alone was associated with a non-significant trend of decrease of survival (-93%). However, when IMI was combined to UVA (80%) and UVAB (70%), the hazard ratio illustrate that the interaction had a significant positive effect on survival compared to IMI alone (Table 2; Fig. 2). In summary, the interaction with UVR changed the direction of the effect of both NEOCs on survival, with TMX switching from positive to negative, and IMI from slightly negative to positive.

### ***Biomarkers***

#### **Experience B**

We found no significant differences in the protein concentration in tissues among the treatments (Fig. 1). Model comparison showed in fact that the best model to explain the variation in this variable contained only the intercept (Table 3). However, the sum of the Akaike weights ( $w_i$ ) showed that all the models including UVR and/or IMI should also be included in the 95% confidence set of models for predicting protein concentration, suggesting that their effect, albeit weak, could not be ruled out (Table S1). Therefore, whereas AChE activity could be safely reported here by mg of proteins ( $\Delta\text{mDO}/\text{min}/\text{mg}$  proteins), we will also express it by g of tissue ( $\Delta\text{mDO}/\text{min}/\text{g}$  tissue). AChE activity per mg of protein was best explained by the presence of IMI (Table S1). The positive relationship between AChE activity per mg of protein and IMI concentration was confirmed graphically when the highest concentration of IMI tested (132.8 ng/L-1) in no-UV conditions was taken into account (Fig. 2). The sum of the Akaike weights showed that the additive model including both UVR and IMI (UVR + IMI), albeit less important, should also be included in the 95% confidence set of models. Therefore, even if the importance of UV filters is much lower in comparison to IMI, the negative effect of UV filters on AChE activity per mg of protein could not be excluded (Table 3).

The analysis conducted on AChE activity expressed by g of tissue confirmed the role of both IMI and UV, but pointed towards a lower effect of these factors. Multi-model inference suggests that UVR (both UVA and UVAB) had a positive effect on AChE

activity expressed per g of tissues in opposition to IMI who had an overall negative effect (Table 3). However, no clear relationship between AChE activity and IMI concentration was observed in this case (Fig. 4) and the best model to explain the variation in this variable contained only the intercept (Table S1 and 4).

The peroxidation of lipids decreased significantly with the concentration of IMI (Table 3) and was at his lowest for groups of individuals exposed simultaneously to the concentration of 23 ng/L-1 of IMI and to either UVA or UVAB (Fig. 5). From the sum of the Akaike weights, we can see that models with both UVR filters and IMI should be included in the 95% confidence set of models, confirming that their simultaneous presence needs to be considered in predicting variation in lipid peroxidation (Table S1).

#### Experience C

Model comparison showed that the best model to explain the variation in protein concentration contained IMI and had a considerable Akaike weight (Table S2). Other two models (IMI + TMX and intercept only) were included in the 95% confidence set of models, but had a  $\Delta AICc > 2$  and a relatively lower Akaike weight, suggesting a lower plausibility relatively to the IMI model. On average, protein concentration in tissues was significantly higher in IMI treatments compared to the others, with TMX having a similar, albeit considerably weaker, positive effect (Fig. 3 and Table 4). No models including UVR was present in the 95% confidence set of models for predicting protein concentration, suggesting that it had no comparable effect in predicting this variable in comparison to the presence of NEOCs. Given the IMI effect on proteins, we present the AChE activity expressed as both per mg protein and per g of tissue.

Model comparison showed that both IMI and TMX had non negligible effects on AChE activity expressed per mg of protein. These variables appeared in five over six models included in the 95% confidence set of models to explain the variation in biomarker (Table S2). All these models were nearly equivalent in terms of  $\Delta AICc$ , with

the intercept-only model (the simplest one) having a  $\Delta AICc$  of only 0.52 (Table S2). Based on the parcimony principle (Burnham and Anderson 2001), this gives weak support to all the other models, which are more complex. However, multi-model inference suggests that both IMI and TMX had a relatively high importance, based on their non negligible Akaike weights. These variables showed a negative relationship with AChE activity (Fig. 3; Table 4). This might partially related to their effects on the concentration of proteins in tissues (Fig. 3; Table 4).

Albeit relatively less important, the interaction between IMI and UVR (both UVA and UVAB) should also be taken into account for this variable, and suggests that in the presence of UVR the effect of IMI on AChE activity is positive (Fig. 4 and Table 4).

Multi-model comparison suggest a simpler pattern for AChE activity when results are reported per g of tissue. The 95% confidence set of models for this variable included in fact only a model with UVR and a model with only the intercept (Table S2), with the latter receiving less support than the former, given a  $\Delta AICc > 5$ . Multi-model inference confirms the relatively large positive effect of UVR (both UVA and UVAB) on AChE activity expressed per g of tissue.

The 95% confidence interval of models for lipid peroxidation suggested that IMI might be potential driver of this variable (Table S2). However, multi-model inference only showed a weak and non significant positive effect of these variables on lipid peroxidation (Fig. 5 and Table 4).

## Discussion

Our results show both independent and synergistic effects of natural UVR and commercial formulations of two commonly used NEOCs on yellow perch larvae at concentrations lower than what is often found in the aquatic environment. In fact, whereas some unexpected positive effects of NEOCs were also observed in the absence of UVR, our main finding is that NEOCs can have both lethal and sublethal effects on

recently hatched yellow perch larvae depending on the incident UVR received and the NEOC type to which they were exposed. More precisely, i) TMX interacted with UVR determining a significant increase in larval mortality, ii) IMI was associated to a reduced lipid peroxidation independently of UVR, to iii) a cholinergic perturbation, visible by a dose-dependent increase of AChE activity only in the absence of UVR and iv) an increase in protein concentration.

Our study clearly confirmed that UVR has the potential to dramatically affect yellow perch larvae survival. In Exp-A, we observed in fact a sharp increase in mortality with UVA, which was even more important when UVA were combined to UVB. Similar results were obtained by Boily and collaborators (2011) who found that mortality of yellow perch larvae was relatively high after exposition to UVA and increased even more in presence of both UVA and UVB. Unexpectedly, this pattern was not observed in Exp-B and Exp-C, despite the fact that the cumulative UVR dose was much more important in these experiments. Whereas the cumulative UVR dose in Exp-B was almost the double than in Exp-A, survival remained elevated in all the treatments. Similarly, in Exp-C, larvae survival was only slightly affected by UVR. Thus, when considering only treatments without NEOCs, it was not possible to see a dose-response in relation to mortality when comparing the effects of UVR on survival among our three experiments. Such response, called reciprocity, is found in general in organisms lacking photoreparation mechanisms, for which the effects of the dose received are independent of the rate at which the dose itself is received (Grad et al., 2001). Since photoreparation mechanisms require some time to be effective against photodamages, organisms using this strategy are not always able to cope with UVR sudden peaks (sunburns), albeit they are in general better equipped to deal with moderate UVR exposure in the long term by reducing the accumulation of photodamages (Grad et al., 2001). Despite the fact that our study was not designed to test explicitly the reciprocity hypothesis, the comparison of the results of our three experiments suggests a non-reciprocity pattern, meaning that the temporal pattern of UVR dose received (e.g. low and constant vs. strong but of short duration) is more important in explaining survival than only the cumulative dose received (Browman et al., 2003).

In our experiments, UVR showed interactive effects with NEOCs, by modulating the effects of these contaminants on larval survival. More precisely, whereas the toxicity of IMI was reduced by both UVA and UVAB treatments (Exp. B), UVR increased the toxicity of TMX (Exp. A and C). This suggests that depending on the environmental conditions (e.g. shallow waters exposed to UVR vs. shaded or deep waters), UVR exposure might greatly change the issue of the exposition of yellow perch larvae to NEOCs. Whereas our results on IMI suggest a potential detoxification by UVR, our results on TMX corroborate the idea that some NEOCs by-products might be of equal or greater toxicity to the parent molecule (i.e. degradation of TMX into CLO; Simon-Delso et al., 2015; Cavallaro et al., 2016). Unfortunately, there is only limited knowledge of the direct effects of UVR on NEOCs molecular structure and associated toxicity to properly interpret the mechanisms behind these results.

Unexpectedly, both our experiments involving TMX showed also some positive effects of this insecticide on yellow perch survival in the absence of UVR. Whereas we do not have a clear clue to explain finding, one potential mechanism behind this results might be a phenomenon called hormesis, where a toxic substance shows non-linear lethal of sub-lethal effects, with negative effects at moderate and high doses, but positive effects at very low ones (Calabrese and Baldwin, 2001). However, the observed pattern is not in accordance with a potential hormetic effect since the positive effects on survival were seen both at the lowest and the highest concentrations of TMX. Another tentative explanation might be related to the adjuvants added in the commercial formulation of the active ingredient. Whereas their presence is usually associated with an increase of toxicity (Mann et al., 2009; Mesnage and Antoniou 2018) and could affect the toxicity to non-target organisms (Sarkar et al., 1999; Costa et al., 2009; Tišler et al., 2009), the chemical structure of such additives is actually rarely specified and it is not impossible that some adjuvants might eventually have some positive effects in the short term (Mesnages et al., 2014; Jemec et al., 2007; Puglis and Boone, 2011). Despite the size effect of these positive effects of TMX alone is somewhat small compared to the negative effects when TMX is in interaction with UVR, these results suggest that there is

need for a proper experimental test aiming at disentangling, for example, the effects of the commercial vs. the pure formulation of TMX (see Mesnage and Antoniou, 2018).

Biomarkers gave additional information to assess NEOCs toxicity in addition to lethal effects. In Exp-B, for example, the presence of IMI was associated with a cholinergic perturbation and to a decrease in lipid peroxidation when in association with UVR despite the fact that survival curves did not differ among the different treatments. Moreover, we found an unexpected high protein content in tissues in association with IMI in Exp-C, which could eventually be due to a stress response. Unfortunately, we could not assess the sublethal effects of TMX for the full range of concentrations used in Exp-A since the amount of tissue collected in this experiment was too low to analyze biomarkers.

The increase or decrease of protein content in an organism's tissues following exposure to a contaminant has been reported by several authors. They have in fact reported that contamination by pesticides can alter protein concentration because of its effects on metabolism (Gisbert et al., 2008; Ullah et al., 2016). When exposed to IMI, protein content significantly decreased in *Daphnia magna* after a chronic 21 days exposure (Jemec et al., 2007). In the study by Landry and collaborators (2017) conducted on adult yellow perch from the St. Lawrence River (Quebec, Canada), the highest protein concentrations observed were associated with yellow perch from a highly contaminated site downstream of the Montreal (Quebec, Canada) water treatment plant. Characterization of proteins would have helped us determine the mechanisms behind the observed tendency of protein to decrease (Exp-B) or increase (Exp-C) and also to better understand the differences in AChE activity between results expressed per unit protein or unit tissue. Besides it, this result underlines the importance of properly validate protein concentration and the need to also normalize by g of tissues before interpretation, as this was the case of AChE activity.

As expected, AChE activity increased in presence of IMI, thus confirming that NEOCs have a potential to affect the cholinergic system of vertebrates. This result was similar



to what observed in the cerebellar neurons of neonatal rats (Kimura-Kuroda et al., 2012). However, in other experiments conducted on fish, no differences in AChE activity were detected in brain or muscle tissues (Topal et al., 2017; Vieira et al., 2018). Unfortunately, this procedure could not be applied here due to the small size of yellow perch larvae (< 1 cm). The observed increase in AChE could have been the result to the response of different tissues since AChE is widely present in both the central and peripheral nervous system but also in the muscle, namely in these early stages (Behra et al., 2002; Grisaru et al., 1999). AChE is in fact very important in young fish (Behra et al., 2002) where both neuroendocrine and neurobehavioral reactions could result from an elevated AChE activity. Loaches (*Misgurnus anguillicaudatus*) exposed to IMI showed signs of hyperactivity and, when exposed to high dose, of total impairment of movement control until death (Xia et al., 2016).

AChE activity is currently used as a biomarker to evaluate the effects of neurotoxic insecticides targeting AChE activity such as organophosphorus and carbamate (Chambers et al., 2002). However, we have only one example in the literature linking the activity of this enzyme and UVR exposition. Namely, Souza and collaborators (2007) observed that UVR (artificial UVA and UVB) can cause an inhibition of AChE activity in some copepod species. In contrast to what expected with NEOCs, this effect would explain why IMI effects were clearly visible in no-UVR treatments and absent when larvae were exposed to both UVA and UVAB. This possible antagonist interaction clearly deserves more attention in the future.

The exposure to both NEOCs or UVR have been associated to an increase in oxidative stress and oxidative damage. Lipid peroxidation, as a result of ROS attacking polyunsaturated fatty acids, was expected to be significantly higher based on published results focusing on tissues and plasma of both fishes (Duzguner and Erdogan, 2012; Ge et al., 2015; Vieira et al., 2018) and rats (Toor et al., 2013) exposed to NEOCs. In our experiment, lipid peroxidation did not increase in presence of TMX or IMI, but rather significantly decreased when combined to UVR. Normalization of lipid peroxidation (TBARS) by concentration of triglycerides or polyunsaturated fatty acids

instead of tissue would have been more informative as an indicative of oxidative damage (Jentzsch et al., 1996; Mourente et al., 2000). Analyzing the activity of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione S-transferase activity (GST) and superoxide dismutase (SOD) could have also helped us understand how the antioxidant system was responding, before resulting in lipid peroxidation. These enzymes are all implicated in limiting the oxidative damage caused by an increase oxidative stress (Slaninova et al., 2009). Studies have shown that CAT and GST increase in fishes following a NEOC exposition (Topal et al., 2017) and that SOD respond to the presence of UVR, particularly UVB (Boily et al., 2011). Future studies should also take into account the quantification of lipophilic antioxidant such as tocopherol and carotenes (Landry et al., 2017). Unfortunately, it has not been possible to make such normalization due to the small quantity of tissue available for the analysis.

The majority of studies on the toxicity of NEOCs have been conducted with IMI, a first generation NEOC (Anderson et al., 2015). However, in the field IMI is always detected with second-generation TMX and clothianidin (CLO) (Main et al., 2014; Hladik et al., 2014). Few studies have evaluated their simultaneous effects on aquatic biota. Also, it still remains unclear how IMI and TMX toxicity interact with UVR both at a lethal and sublethal levels. Even if they have a similar action mechanism, IMI and TMX differ in their chemical structure, binding affinities and their metabolites (Nauen et al., 2003; Ford and Casida, 2006; Simon-Delso et al., 2015) and our results support this point. In the case of TMX, the main by-product identified is CLO, who is also a commercially available as NEOC insecticide. Whereas acute toxicity test have ranked the toxicity of IMI higher than TMX, under a chronic exposition, TMX and CLO are considered a more important threat to organisms. Knowing that TMX degrades into a metabolite with insecticidal potential, this potentially enhance its toxicity and must this be taken into account (Nauen et al., 2003; Whiteside et al., 2008; Simon-Delso et al., 2015; Cavallaro et al., 2016; Prosser et al., 2016).

Literature is scarce on the process and speed of NEOCs degradation, particularly under natural environmental conditions. In the aquatic environment, temperature, pH, and the

presence and intensity of light are all factors that could influence the degradation of NEOCs (see review by Bonmatin et al., 2015). In water, TMX will degrade more rapidly than IMI in the presence of natural light (TMX half-life = 18,7 h; Peña et al., 2011; IMI half-life = 8,8 jours; Jinguji et al., 2013). However, it is difficult to predict how precisely NEOCs would evolve since they are in commercial formulation (Gupta et al., 2002; Jeschke et al., 2011; Bonmatin et al., 2015). Their physicochemical characteristics are thus potentially changed by the substances added to the active ingredient to improve the conservation of the product on the market as well as the uptake and distribution of the active ingredient in the plant (Gupta et al., 2002, Mesnage and Antoniou 2018). Moreover, by increasing the insecticide persistence in the environment, commercial formulations could therefore increase the overall exposure of non-target organisms (Sarkar et al., 1999; Costa et al., 2009; Tišler et al., 2009) such a yellow perch larvae. In general, there is a gap in risk assessment related to the potential toxicity of adjuvants and a more careful attention is needed to determine their full range of potential effects on biota in addition to that of pesticides themselves (Mesnage and Antoniou 2018).

## **Conclusions**

At our knowledge, our study is the first to assess the effects of NEOCs exposition on vertebrate under natural UVR. Our results showed that AChE activity is a sensible biomarker to quantify the cholinergic perturbation by NEOCs in fish larvae, but also that different NEOCs induce different responses. We also found evidence that the mortality induced by IMI and TMX is modulated by UVR exposition, suggesting either a photodegradation process or a specific response of larvae exposed to both stressors. Environmental guideline values are presently mostly based on IMI, and do not take into account the potential interaction with other NEOCs or environmental factors as UVR, as well the formation of metabolites or their toxicity when used in commercial formulation. The complexity of our results suggest that all these factors should be considered in environmental monitoring guidelines in order to better assess their impacts in real environmental situations.



## Litterature cited

- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P. 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Env.* 505: 409-422.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-31.
- Bancroft, B.A., Baker, N.J., Searle, C.L., Garcia, T.S., Blaustein, A.R. 2008. Larval amphibians seek warm temperatures and do not avoid harmful UVB radiation. *Behav. Ecol.* 19: 879-886.
- Bartoń, K., 2016. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.6, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67: 1-48.
- Behra, M., Cousin, X., Bertran, C., Vonesch, J.-L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strahle, U. 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 5: 111-118.
- Beketov, M.A., Speranza, A., Liess, M., 2011. Ultraviolet radiation increases sensitivity to pesticides: Synergistic effects on population growth rate of *Daphnia magna* at low concentrations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87: 231-237.
- Blaustein, A. R. et J. M. Kiesecker, 2002. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations, *Ecol. Lett.*, 5: 597-608.
- Boily, V., Bertolo, A., Magnan, P., Martinoli, M.-G., Thérien, H.-M. 2011. The effects of UVR irradiance and spectral composition on yellow perch (*Perca flavescens*) larvae survival. *Aquat. Sci.* 73: 345-354.
- Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P., Chagnon, M. 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Env. Sci. Pollut. Res.* 20: 5603-5614.
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C. et al. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 35-67.

- Browman, H.I., St-Pierre, J.F., Kuhn, P., 2003. Dose and dose-rate dependency in the mortality response of *Calanus finmarchicus* embryos exposed to ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 247: 297-302.
- Burnham, K. P. and Anderson, D. R. 2002. Model selection and multi-model inference, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 488 p.
- Calabrese, E. J., and Baldwin, L. A. 2001. Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. *Critical reviews in toxicology*, 31: 353-424.
- Cavallaro, M.C., Morrissey, C.A., Headley, J. V., Peru, K.M., Liber, K., 2016. Comparative chronic toxicity of imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam to *Chironomus dilutus* and estimation of toxic equivalency factors. *Environ. Toxicol. Chem.* 36: 372-382.
- Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W., Straus, D.L. 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8: 165-176.
- Costa, C., Silvari, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J.J., Trovato, A., De Pasquale, R. 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res.* 672: 40-44.
- Cresswell, J.E. 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*. 20: 149-157.
- Dauphin, D., Jobin, B. 2016. Changements de l'occupation du sol dans la plaine inondable du lac Saint-Pierre entre les années 1950 et 1997. *Le Nat. Can.* 140: 42-52.
- De la Chenelière, V., Brodeur, P., Mingelbier, M. 2014. Restauration des habitats du lac Saint-Pierre: un prérequis au rétablissement de la perchaude. *Le Nat. Can.* 128: 50-62.
- Duzguner, V., Erdogan, S., 2012. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver and central nervous system of rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 58-64.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.

- Ford, K.A., Casida, J.E. 2006. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res. Toxicol.* 19: 1549-1556.
- Fox, J. and Weisberg, S., 2011. Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data in R, An Appendix to An R Companion to Applied Regression, 2nd ed., 20 p.
- Giroux, I. 2014. Présence de pesticides dans l'eau au Québec- Zones de vergers et de pommes de terre, 2010 à 2012, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 55 p. et 5 annexes.
- Giroux, I. 2018. État de situation sur la présence de pesticides au lac Saint-Pierre, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction de l'information sur les milieux aquatiques, 36 p.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histol. Histopathol.* 23: 1525-1539.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J. 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63: 1856-1862.
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 103-118.
- Goyette, J., Bennett, E.M., Howarth, R.W., Maranger, R. 2016. Changes in anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs to the St. Lawrence sub-basin over 110 years and impacts on riverine export. *Glob. Biogeochem. Cycles.* 1000-1014.
- Grad, G., Williamson, C. E., & Karapelou, D. M. (2001). Zooplankton survival and reproduction responses to damaging UV radiation: a test of reciprocity and photoenzymatic repair. *Limnology and Oceanography*, 46: 584-591.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264: 672-686.
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Agnihotri, N.P.K. 2002. Leaching behaviour of imidacloprid formulations in soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68: 502-508.

- Hedrei Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., 2014. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 8010-8021.
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., Kuivila, K.M. 2014. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environ. Pollut.* 193: 189-196.
- Hudon, C., Carignan, R. 2008. Cumulative impacts of hydrology and human activities on water quality in the St. Lawrence River (Lake Saint-Pierre, Quebec, Canada). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65: 1165-1180.
- Hudon, C., Cattaneo, A., Tourville Poirier, A.-M., Brodeur, P., Dumont, P., Mailhot, Y., Amyot, J.-P., Despatie, S.-P., Lafontaine, Y. 2011. Oligotrophication from wetland eputation alters the riverine trophic network and carrying capacity for fish. *Aquat. Sci.* 74: 495-511.
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., Trebše, P. 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 68: 1408-1418.
- Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 251-256.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59: 2897-2908.
- Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M. E., 2013. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angew Chem Int Ed. Engl.* 52: 9464-9485.
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., Kawano, H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One.* 7.
- Klein, J. P. and Moeschberger M. L., 2003. *Survival Analysis: Techniques for Censored and Truncated Data.* 2nd ed, Springer-Verlag, New York. 536 p.
- Landry, C., Houde, M., Brodeur, P., Spear, P., Boily, M. 2017. Lipophilic antioxidants and lipid peroxidation in yellow perch subjected to various anthropogenic influences along the St. Lawrence River (QC, Canada). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139: 316-325.



- Liu et al. 2006. Sorption and Degradation of Imidacloprid in Soil and Water. *J. Environ. Sci. Health. Part B*, 41: 623-634.
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.
- Livingstone, D.R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet.* 427-430.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101: 13-30.
- Mahmoud, U.M., Mekkawy, I.A.A., Sayed, A.E.D.H. 2009. Ultraviolet radiation-A (366 nm) induced morphological and histological malformations during embryogenesis of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 95: 117-128.
- Mailhot, Y., Dumont, P., Paradis, Y., Brodeur, P., Vachon, N., Mingelbier, M., Lecomte, F., Magnan, P. 2015. Yellow Perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River (Québec, Canada): population dynamics and management in a river with contrasting pressures. Dans: Couture, P. et G.G. Pyle (éd.). *Biology of perch*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Main, A.R., Headley, J. V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., Morrissey, C.A. 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. *PLoS One*. 9.
- Magnan, P., Brodeur, P., Vachon, N., Mailhot, Y., Dumont, P., Paradis, Y., 2014. État du stock de perchaude du lac Saint-Pierre en 2011 et bilan du plan de gestion de 2008. Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivières et ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec.
- Mann, R. M., Hyne, R. V., Choung, C. B., Wilson, S. P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environ. Pollut.* 2903-2927.
- Mazerolle, M. J., 2016. AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). R package version 2.0-4, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=AICcmodavg>
- Mesnage, R., Antoniou, M. N., 2018. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Front. Public Health*. 5: 361.

- Mesnages, N., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Seralini, G., 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Res. Int.* 2014: 179691.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J.H., Sánchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K. 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environ. Int.* 74: 291-303.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2000. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid/vitamin E (PUFA/tocopherol ratio on antioxidant defense mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Osteichthyes, Sparidae). *Fish Physiol. Biochem.* 23: 337-351.
- Nauen, R., Ebbinghaus-kintscher, U., Salgado, V.L., Kaussmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pest Biochem Physiol.* 76: 55-69.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2016. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-126, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van Der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 68-102.
- Pouzand, C., Tyrrell, R. M. 1999. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 70: 380-390.
- Prosser, R.S., de Solla, S.R., Holman, E.A.M., Osborne, R., Robinson, S.A., Bartlett, A.J., Maisonneuve, F.J., Gillis, P.L., 2016. Sensitivity of the early-life stages of freshwater mollusks to neonicotinoid and butenolide insecticides. *Environ. Pollut.* 218: 428-435.
- Provencher, C., Bertolo, A., Magnan, P., Martinoli, M. 2014. Modulation of specific apoptotic DNA fragmentation after short term exposure to natural UVR in fish larvae. *Open J. Apoptosis* 3: 1-13.

- Puglis, H., Boone, M., 2011. Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog Tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 145-155.
- R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>
- Sarkar M. A., Biswas P. K., Roy S., Kole R. K., Chowdhury A., 1999. Effect of pH and type of formulation on the persistence of imidacloprid in water. *Bull Environ Contam Toxicol.* 63: 604-609.
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J., Xue, Y., 2015. Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *PLoS One.* 10.
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Xue, Y., Smith, J., Baute, T., 2016. Field-scale examination of neonicotinoid insecticide persistence in soil as a result of seed treatment use in commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* 35: 295-302.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, et al. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 5-34.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., 2009. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30: 2-12.
- Souza, M.S., Modenutti, B.E., Balseiro, E.G., 2007. Antioxidant defenses in planktonic crustaceans exposed to different underwater light irradiances in Andean lakes. *Water. Air. Soil Pollut.* 183: 49-57.
- Tennekes, H.A., Sánchez-bayo, F. 2011. Time-Dependent Toxicity of Neonicotinoids and Other Toxicants: Implications for a New Approach to Risk Assessment. *Environ. Anal. Toxicol.* 1-8.
- Thany, S.H. 2009. Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* 30: 1045-1052.
- The RAMSAR Convention Secretariat 2014. Ramsar Sites Information Service. Retrieved October 29, 2018, from: <https://rsis.ramsar.org/fr/ris/949>.

- Therneau, T., 2014. survival: A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.37-7, URL: <https://rsis.ramsar.org/fr/ris/949>
- Therneau, T., Crowson, C. and Atkinson, E., 2017. Using Time Dependent Covariates and Time Dependent Coefficients in the Cox Model.
- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., Trebše, P., 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76: 907-914.
- Tomizawa, M., Casida, J.E. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 339-364.
- Toor, H.K., Sangha, G.K., Khera, K.S., 2013. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 105: 1-4.
- Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A.C., Comaklı, S., Acil, G., Kokturk, M., Atamanalp, M. 2017. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.* 175: 186-191.
- Ullah, S., Hasan, Z., Dhama, K., 2016. Toxic effects of endosulfanon on behaviour, protein contents and antioxidant enzyme system in gills, brain, liver and muscle tissues of rohu, Labeo Rohita. *Int. J. Pharmacol.* 12: 1-10.
- UNESCO 2012. Retrieved October 29, 2018, from: <http://www.biospherelac-st-pierre.qc.ca/>
- Vieira, C.E.D., Pérez, M.R., Acayaba, R.D.A., Raimundo, C.C.M., dos Reis Martinez, C.B. 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 195: 125-134.
- Vincent, W.F., Neale, P. J., 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: *The Effect of UV Radiation in the Marine Environment* (de Mora, S. Demers et M. Vernet, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 149-176.
- Whitehead, R.F., S. J. de Mora et S. Demers, 2000. Enhanced UV radiation – a new problem for the marine environment. In: *The Effect of UV Radiation in the Marine Environment* (de Mora, S. Demers et M. Vernet, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1-34.

- Whiteside, M., Mineau, P., Morrison, C., Knopper, L.D. 2008. Comparison of a score-based approach with risk-based ranking of in-use agricultural pesticides in Canada to aquatic receptors. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 215-36.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., Walker, N. J., Saveliev, A. A. and Smith, G. M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology using R, Chapter 4: Dealing with Heterogeneity, Springer-Verlag, New York. pp.71-100.

**Table 1.** Summary of the three experiments conducted on yellow perch larvae with commercial formulation of thiamethoxam (TMX) and/or imidacloprid (IMI) and natural UV radiation.

Experiment	A	B	C
Neonicotinoid	TMX	IMI	TMX and/or IMI
Year	2015	2016	2016
Month	May	May	June
Duration (days)	7	7	4
Number of larvae by incubator	80	120	100
Number of replicates	5	5	6
Biomarkers	No	Yes	Yes

**Table 2.** Summary of the survival analysis done with Cox model for the three experiments conducted on yellow perch larvae with commercial formulation of thiamethoxam (TMX) and/or imidacloprid (IMI) and natural UV radiation. For each experiment, Hazard ratios are showed with their associated confidence interval (95%) and significance level for the best model selected.

Experiment	Treatment	Hazard ratio	Confidence interval (95%)	p value
A	TMX	0.93	(0.89 - 0.98)	0.01
	TMX*UVA	1.06	(1.01 - 1.12)	0.01
	TMX*UVAB	1.08	(1.01 - 1.14)	0.02
B	UVA	0.85	(0.63 - 1.15)	0.29
	UVAB	1.16	(0.81 - 1.67)	0.42
C	IMI	1.93	(0.54 - 6.97)	0.31
	TMX	0.38	(0.15 - 0.95)	0.04
	TMX*UVA	4.98	(1.19 - 20.89)	0.03
	TMX*UVAB	5.29	(1.16 - 24.12)	0.03
	IMI*UVA	0.20	(0.08 - 0.49)	< 0.001
	IMI*UVAB	0.30	(0.18 - 0.52)	< 0.001

**Table 3.** Summary of average estimates of exposition treatments (UV filter and concentration of imidacloprid (IMI)) and their importance for each biomarkers extracted from yellow perch larvae tissues exposed to natural UV radiation and IMI during Exp-B. Average estimates and importance of exposition treatments were calculated from mixte-models included in the 95% cumulative Akaike weight (wi) criteria.

Biomarker	Treatment	Estimate	Standard error	Importance	p value
Proteins (mg/g of tissue)	(Intercept)	41.80	2.89	-	< 0.001
	UVA	0.13	3.97	0.41	0.98
	UVAB	4.57	3.43		0.20
	Imi1*	-5.18	3.60	0.40	0.16
	Imi2*	-3.06	3.77		0.43
AChE activity ( $\Delta$ mDO/mg of protein)	(Intercept)	8.59	0.69	-	< 0.001
	IMI	73.28	38.20	0.67	0.06
	UVA	-0.07	0.98	0.09	0.95
	UVAB	-0.38	0.99		0.71
AChE activity ( $\Delta$ mDO/g of tissue)	(Intercept)	362.56	29.51	-	< 0.001
	UVA	61.99	39.01	0.33	0.12
	UVAB	32.45	37.17		0.40
	IMI	-732.59	1671.59	0.26	0.67
Lipid peroxidation (nmol/g of tissue)	(Intercept)	2.60	0.30	-	< 0.001
	IMI	-35.86	12.79	0.97	< 0.01
	UVA	-0.31	0.37	0.19	0.40
	UVAB	-0.10	0.36		0.79

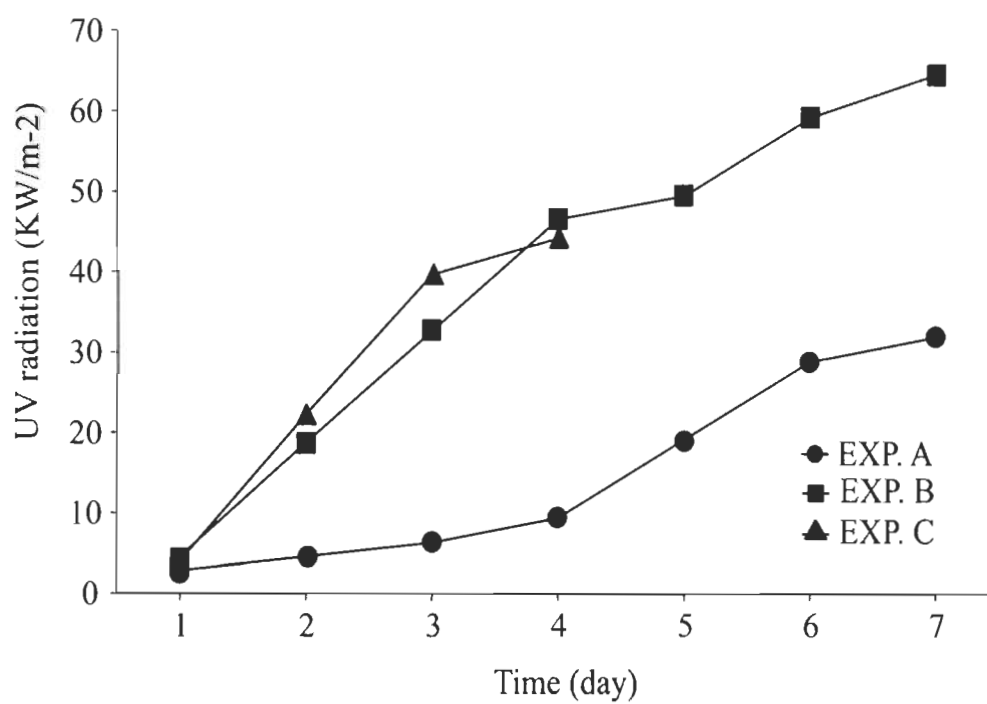
IMI\*: variable with 3 levels (0; Imi1: 8.3 ng/L-1; Imi2: 23 ng/L-1)

IMI: variable expressed as categorical variable with 3 levels (0; 8.3 ng/L-1; 23 ng/L-1)

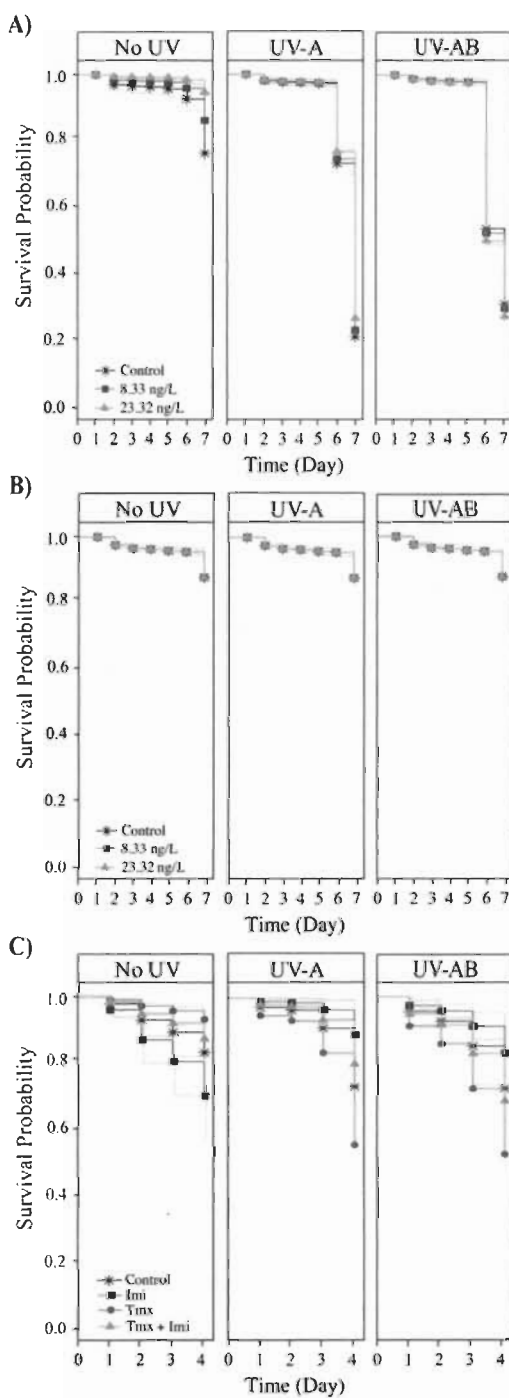


**Table 4.** Summary of average estimates of exposition treatments (UV filter and presence of imidacloprid (IMI) and thiamethoxam (TMX)) and their importance for each biomarkers extracted from yellow perch larvae tissues exposed to natural UV radiation and IMI during Exp-C. Average estimates and importance of exposition treatments were calculated from mixte-models included in the 95% cumulative Akaike weight ( $w_i$ ) criteria.

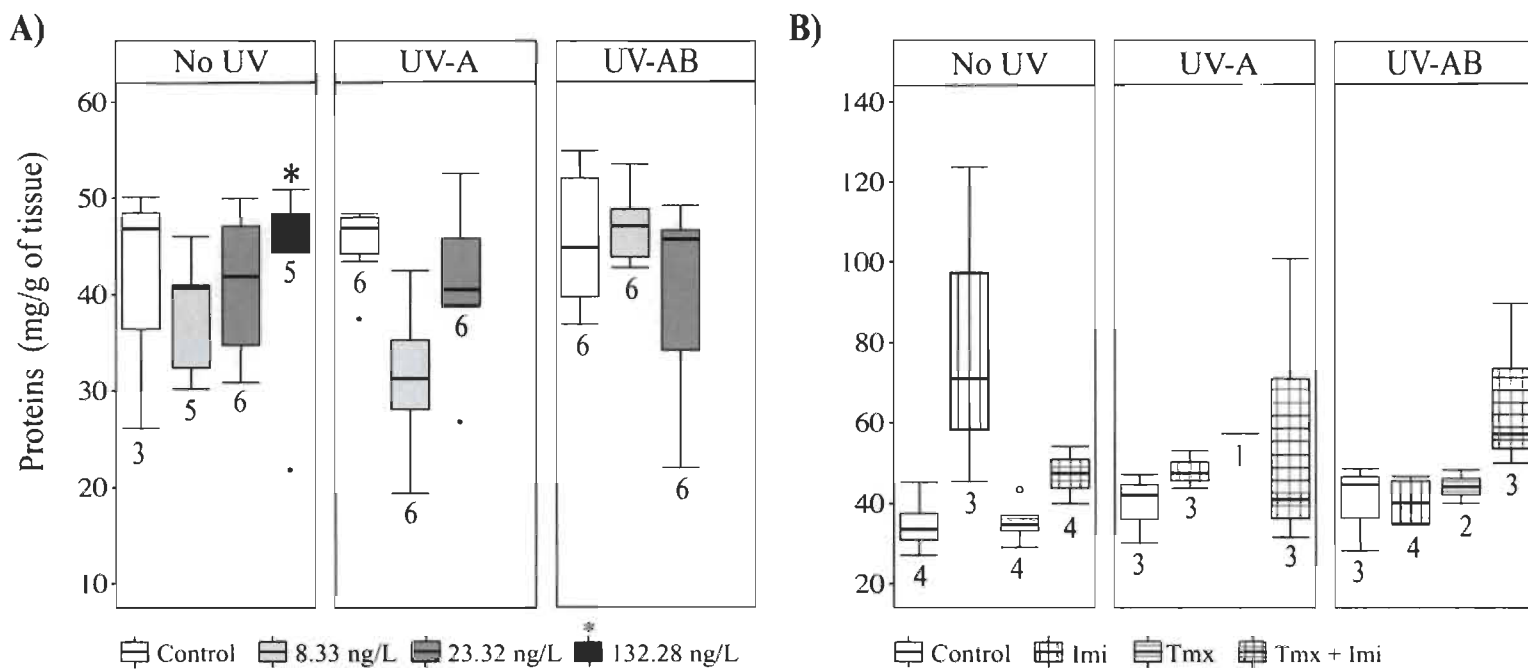
Biomarker	Treatment	Estimate	Standard error	Importance	p value
Proteins (mg/g of tissue)	(Intercept)	40.29	5.45	-	< 0.001
	IMI	15.95	6.24	0.88	0.01
	TMX	2.17	7.13	0.24	0.77
AChE activity ( $\Delta$ mDO/mg of protein)	(Intercept)	8.99	1.00	-	< 0.001
	IMI	-2.88	2.09	0.70	0.17
	TMX	-1.52	0.78	0.58	0.06
	UVA	-2.06	0.84	0.19	0.02
	UVAB	-0.49	0.66		0.48
	UVA*IMI	7.11	1.68	0.17	< 0.001
	UVAB *IMI	4.51	1.54		0.01
	IMI*TMX	1.70	1.70	0.1	0.34
AChE activity ( $\Delta$ mDO/g of tissue)	(Intercept)	292.91	18.68	-	< 0.001
	UVA	80.75	25.25	0.91	< 0.001
	UVAB	64.31	20.37		< 0.001
Lipid peroxidation (nmol/g of tissue)	(Intercept)	2.60	0.12	-	< 0.001
	IMI	0.22	0.16	0.41	0.21
	TMX	0.02	0.17	0.22	0.92



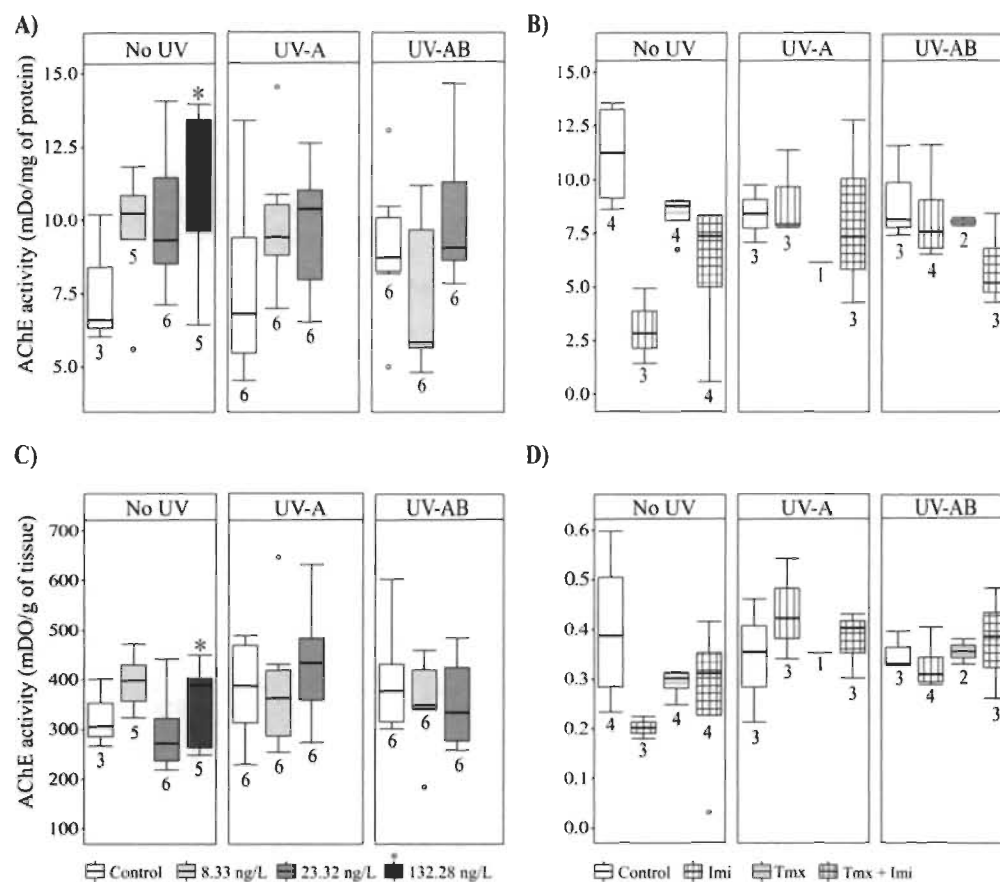
**Fig. 1.** Natural UV radiation doses received during each experiment.



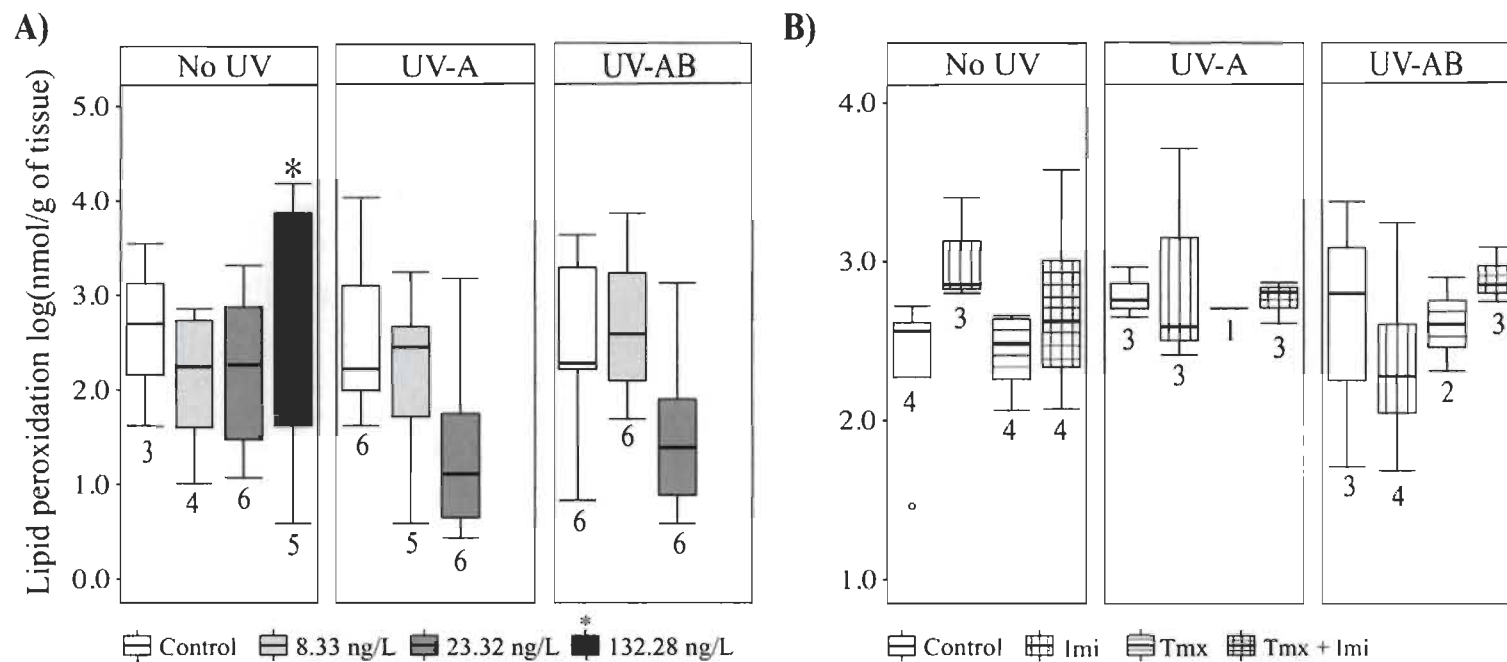
**Fig. 2.** Survival probability curves (full line) of yellow perch larvae exposed to natural UV radiation and commercial formulations of A) thiamethoxam (Exp-A), B) imidacloprid (Exp-B) and C) thiamethoxam and/or imidacloprid (Exp.C) obtained by Cox model analysis. Confidence intervals (95%) for each treatment are illustrated by dotted lines.



**Fig. 3.** Protein concentration in tissues (mg/g of tissue) of yellow perch larvae exposed to natural UV radiation and commercial formulations of A) imidacloprid (Exp-B) and B) thiamethoxame and/or imidacloprid (Exp.C). Boxes representing each treatment extend from 25th to 75th percentile; lines illustrate the median and whiskers show the largest to smallest observed values. The asterisk indicates the extra treatment with the highest concentration (excluded from statistical analysis).



**Fig. 4.** AChE activity expressed both by mg of protein (panels A and B) or by g of tissues (panels C and D) in yellow perch larvae exposed to both natural UV radiation and commercial formulations of imidacloprid (Exp-B) (panels A and C) and thiamethoxame and/or imidacloprid (Exp.C) (panels B and D). Boxes representing each treatment extend from 25th to 75th percentile; lines illustrate the median and whiskers show the largest to smallest observed values. The asterisk indicates the extra treatment with the highest concentration (excluded from statistical analysis). A) AChE activity by mg of protein for Exp-B.



**Fig. 5.** Lipid peroxidation in tissues (log(nmol/g tissue)) in yellow perch larvae exposed to natural UV radiation and commercial formulations of A) imidacloprid (Exp-B) and B) thiamethoxame and/or imidacloprid (Exp.C). Boxes representing each treatment extend from 25th to 75th percentile; lines illustrate the median and whiskers show the largest to smallest observed values. The asterisk indicates the extra treatment with the highest concentration (excluded from statistical analysis).

## Supplementary material

**Table S1.** Summary of Akaike's second-order information criterion (AICc) for mixed-models selection relating the exposition variables (UV filter and concentration of imidacloprid (IMI)) effects on each biomarkers extracted from yellow perch larvae tissues during Exp-B. Bold indicates models included in the 95% cumulative Akaike weight (wi) criterium which were used to calculate the relative importance of the exposition variables and averaged estimates for their coefficients. Only models under  $\Delta AICc < 10$  are presented.

Response variable	Model	Number of parameters	AICc	$\Delta AICc$	Akaike weight (wi)
Proteins (mg/g of tissue)	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>362.89</b>	<b>0.00</b>	<b>0.37</b>
	<b>UV</b>	<b>5</b>	<b>363.81</b>	<b>0.92</b>	<b>0.23</b>
	<b>IMI</b>	<b>5</b>	<b>363.92</b>	<b>1.03</b>	<b>0.22</b>
	<b>UV + IMI</b>	<b>7</b>	<b>365.18</b>	<b>2.29</b>	<b>0.12</b>
	UV * IMI	11	366.66	3.77	0.06
AChE activity ( $\Delta mDO$ /mg of protein)	<b>IMI</b>	<b>4</b>	<b>244.40</b>	<b>0.00</b>	<b>0.61</b>
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>245.79</b>	<b>1.40</b>	<b>0.30</b>
	<b>UV + IMI</b>	<b>6</b>	<b>249.28</b>	<b>4.88</b>	<b>0.05</b>
	UV	5	250.34	5.94	0.03
AChE activity ( $\Delta mDO$ /g of tissue)	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>611.92</b>	<b>0.00</b>	<b>0.50</b>
	<b>UV</b>	<b>5</b>	<b>613.38</b>	<b>1.45</b>	<b>0.24</b>
	<b>IMI</b>	<b>4</b>	<b>614.07</b>	<b>2.14</b>	<b>0.17</b>
	<b>UV + IMI</b>	<b>6</b>	<b>615.88</b>	<b>3.95</b>	<b>0.07</b>
	UV * IMI	8	618.98	7.05	0.02
Lipid peroxidation log(nmol/g of tissue)	<b>IMI</b>	<b>4</b>	<b>128.56</b>	<b>0.00</b>	<b>0.79</b>
	<b>UV + IMI</b>	<b>6</b>	<b>131.77</b>	<b>3.21</b>	<b>0.16</b>
	1	3	135.29	6.73	0.03
	UV * IMI	8	135.31	6.75	0.03

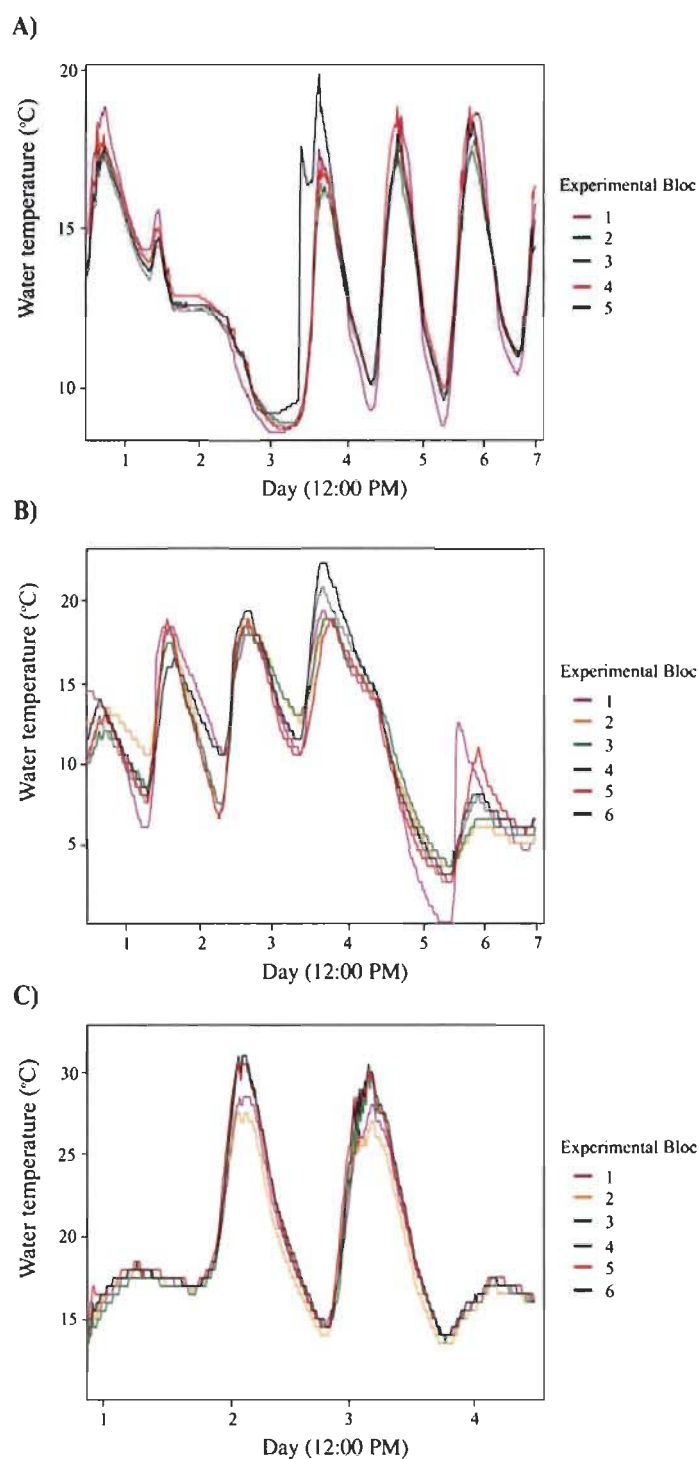
UV: categorical variable with 3 level (No UV used as reference level; UVA; UVA + UVB)

IMI: variable with 3 level (0; 8.3 ng/L-1; 23 ng/L-1).

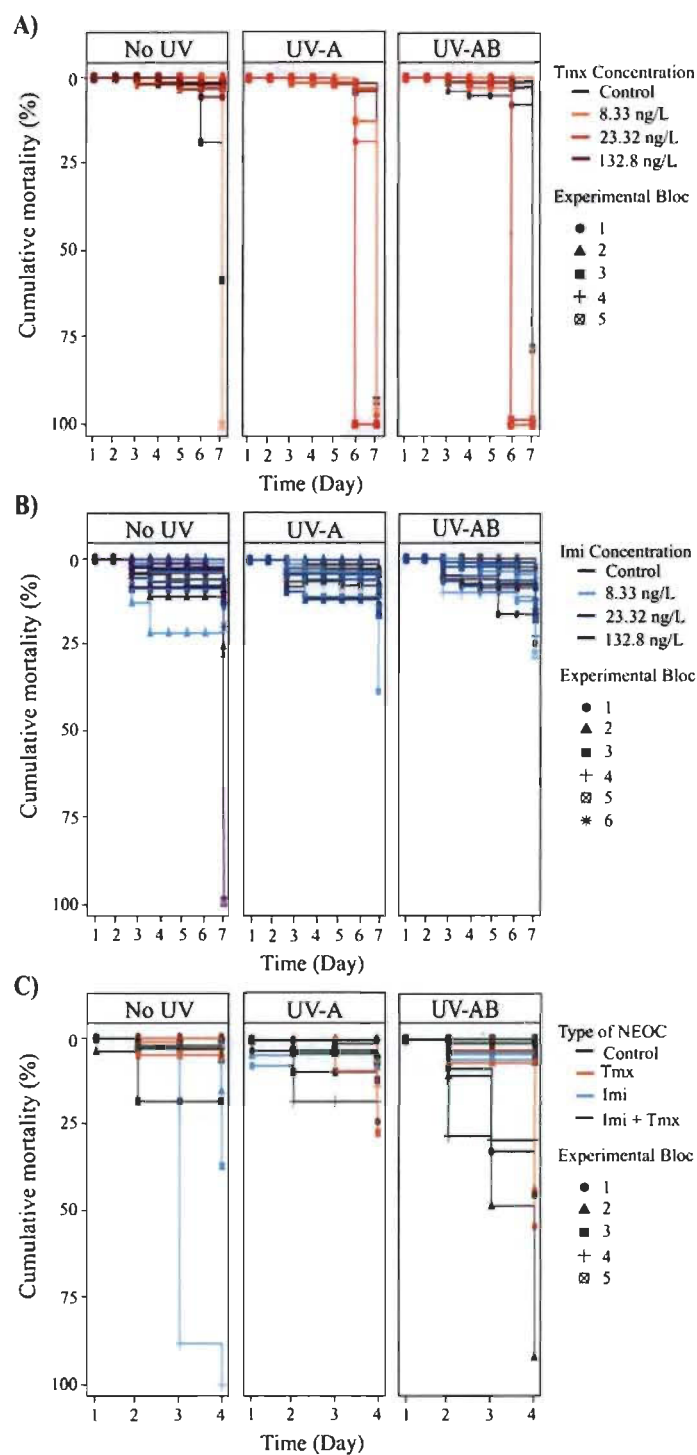
**Table S2.** Summary of Akaike's second-order information criterion (AICc) for mixte-models selection relating the exposition variables (UV filter and presence of imidacloprid (IMI) and thiamethoxam (TMX)) effects on each biomarkers extracted from yellow perch larvae tissues during Exp-C. Bold indicates models included in the 95% cumulative Akaike weight (wi) criterium which were used to calculate the relative importance of the exposition variables and averaged estimates for their coefficients. Only models under  $\Delta AICc < 10$  are presented.

Response variable	Model	Number of parameters	AICc	$\Delta AICc$	Akaike weight (wi)
Proteins (mg/g of tissue)	<b>IMI</b>	<b>5</b>	<b>330.35</b>	<b>0.00</b>	<b>0.67</b>
	<b>IMI + TMX</b>	<b>6</b>	<b>333.08</b>	<b>2.74</b>	<b>0.17</b>
	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>334.34</b>	<b>3.99</b>	<b>0.09</b>
	IMI * TMX	7	336.12	5.78	0.04
	TMX	5	336.72	6.38	0.03
	UV	6	339.69	9.35	0.01
AChE activity ( $\Delta mDO$ /mg of protein)	<b>IMI + TMX</b>	<b>8</b>	<b>188.31</b>	<b>0.00</b>	<b>0.25</b>
	<b>IMI</b>	<b>7</b>	<b>188.63</b>	<b>0.32</b>	<b>0.21</b>
	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>188.84</b>	<b>0.52</b>	<b>0.19</b>
	<b>IMI * UV +</b>	<b>12</b>	<b>189.58</b>	<b>1.27</b>	<b>0.13</b>
	<b>TMX</b>	<b>7</b>	<b>190.30</b>	<b>1.99</b>	<b>0.09</b>
	IMI * TMX	9	191.06	2.75	0.06
	IMI * TMX +	13	192.11	3.80	0.04
	UV	8	193.48	5.17	0.02
AChE activity ( $\Delta mDO$ /g tissue)	<b>UV</b>	<b>8</b>	<b>450.73</b>	<b>0.00</b>	<b>0.89</b>
	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>456.21</b>	<b>5.48</b>	<b>0.06</b>
	TMX	7	458.61	7.88	0.02
	IMI * UV +	12	459.22	8.49	0.01
	IMI	7	459.27	8.54	0.01
Lipid peroxidation log(nmol/g tissue)	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>57.85</b>	<b>0.00</b>	<b>0.41</b>
	<b>IMI</b>	<b>4</b>	<b>58.45</b>	<b>0.59</b>	<b>0.31</b>
	<b>TMX</b>	<b>4</b>	<b>60.33</b>	<b>2.48</b>	<b>0.12</b>
	<b>IMI + TMX</b>	<b>5</b>	<b>61.12</b>	<b>3.27</b>	<b>0.08</b>
	UV	5	61.69	3.83	0.06
	IMI * TMX	6	63.88	6.03	0.02





**Fig. S1.** Water temperature of experimental block for each day of the experiment exposing yellow perch larvae to natural UV radiation and commercial formulations of A) thiamethoxam (Exp-A), B) imidacloprid (Exp-B) and C) thiamethoxame and/or imidacloprid (Exp-C).



**Fig. S2.** Survival curves by incubator (full line) of yellow perch larvae exposed to natural UV radiation and commercial formulations of A) thiamethoxam (Exp-A), B) imidacloprid (Exp-B) and C) thiamethoxame and/or imidacloprid (Exp-C). Confidence intervals (95%) for each treatment are illustrated by dotted lines.

## CONCLUSION

L'intégrité de l'écosystème du LSP est particulièrement affectée par l'intensification et le changement des activités agricoles. Les cultures de maïs et de soya, qui utilisent des insecticides de type NEOCs, pourraient grandement contribuer à la problématique de recrutement de la population de perchaudes. Les concentrations testées lors de notre étude ont permis de démontrer le potentiel toxique de ce type d'insecticide en présence de RUV sur des vertébrés aquatiques et cela, malgré que les concentrations testées soient bien en dessous des concentrations de NEOCs testées en laboratoire ou détectées en milieu aquatique. Dans le cas de la troisième expérience où les larves de perchaude étaient exposées à une concentration égale au CVAC ( $8,3 \text{ ng/L}^{-1}$ ), la présence du RUV a augmenté la toxicité du TMX d'au moins 400 % et a diminué celle de l'IMI d'approximativement 70 %.

Dans cette étude, les résultats de survie ont permis de souligner l'importance de considérer l'interaction potentielle entre le contaminant et les facteurs environnementaux comme le UVR, car celui-ci pouvait modifier sa toxicité. Combiné aux NEOCs, la présence du UVR a augmenté la toxicité du TMX et a diminué celle de l'IMI. Ces résultats inattendus pourraient être expliqués par une interaction potentielle avec le UVR qui aurait changé la toxicité du NEOC en créant des produits de photodégradation d'une toxicité similaire, plus grande ou inférieure à la molécule mère. Le principal sous-produit de photodégradation identifié pour l'IMI est l'IMI-urée catégorisé comme étant non toxique comparativement au TMX, dont le principal sous-produit formé est le CLO, qui est un NEOC également disponible sur le marché. Ce changement de toxicité selon la présence ou absence d'UVR se doit d'être approfondi et considéré dans l'établissement des critères de protection de la vie aquatique. Il serait également important de clarifier si cet effet est dû à la présence des produits de photodégradation et/ou à une vulnérabilité accrue des larves aux NEOCs en présence du stress causé par le UVR. Le UVR, à lui seul, a un effet biologique important qui était visible par une mortalité importante chez les larves de perchaude exposées autant au rayonnement UVA

qu'au UVA et UVB simultanément. Des études plus approfondies sur la vitesse et le taux de formation des sous-produits de photodégradation des NEOCs permettraient grandement d'éclaircir ce questionnement.

L'utilisation de biomarqueurs en parallèle aux mesures du taux de survie a permis d'obtenir des informations supplémentaires sur la condition des organismes exposés aux NEOCs et au RUV. Une augmentation de l'activité de l'AChE indiquait que le système cholinergique des larves de perchaude pouvait être affecté par la présence des NEOCs dans leur milieu. Cette réponse était toutefois variable selon le type de NEOC testé et n'était pas visible lorsque les organismes étaient simultanément exposés au RUV. Dans leurs études sur la daphnie, Jemec et al. (2007) ont émis comme hypothèse que la mesure de l'activité de l'AChE était un bon biomarqueur pour évaluer le potentiel de perturbation du système cholinergique, mais seulement dans le cas d'une exposition de longue durée. Dans le cas des vertébrés, qui possèdent en proportion un plus grand nombre de récepteurs nAChRs et pour lesquels la spécificité des NEOCs est plus faible, ceci pourrait être un facteur qui ait pu influencer grandement les résultats. Dans tous les cas, la présence d'une perturbation du système cholinergique des NEOCs chez les vertébrés démontre que ceux-ci, comme de nombreux autres organismes non ciblés, sont affectés par leur présence dans leur environnement.

Le stress oxydatif causé par cette exposition chronique de plusieurs jours peut causer des dommages importants et permanents, particulièrement dans le cas des larves de perchaude qui sont en plein développement. Il était attendu que le taux de peroxydation des lipides soit élevé en présence de NEOCs et de RUV, particulièrement dans le cas d'une exposition simultanée aux deux sources de stress. Bien que nos résultats aillent à l'encontre de cette prédiction, ils suggèrent tout de même que la condition des larves serait néanmoins affectée puisque celui-ci serait plutôt associé à une diminution des réserves lipidiques, c'est-à-dire du matériel pouvant être oxydé disponible. Une exposition aux NEOC et RUV cause un stress oxydatif important, et exige la mise en place de réponses anti-oxydantes. Cette réponse pourrait donc représenter des coûts énergétiques importants qui seraient visibles par une diminution

globale des réserves lipidiques. La mesure en parallèle des lipides totaux permettrait de valider cette hypothèse. Par ailleurs, la mesure des enzymes anti-oxydantes ou des autres types de dommages oxydatifs particulièrement les protéines chez les larves de perchaude permettrait d'avoir un portrait plus global des dommages potentiels à long terme. Contre toute attente, des variations dans la concentration des protéines dans les tissus ont aussi été observées dans notre étude. Nous suggérons que des études futures vérifient l'hypothèse que l'augmentation de la concentration de protéines peut être associée à la mise en place d'un système de détoxification, alors qu'une diminution peut être expliquée par la présence de dommages oxydatifs ayant eu lieu sur les protéines.

À notre connaissance, notre étude est l'une des premières à évaluer les effets de l'exposition des NEOCs en formulation commerciale sur les vertébrés exposés simultanément au RUV naturel. Nos résultats suggèrent que négliger des importants facteurs environnementaux tels que la présence du RUV naturel, ainsi que les modalités de l'exposition à ce facteur de stress, pourrait fortement influencer les tests de toxicité des NEOC. Ces éléments se doivent d'être inclus dans les études voulant être représentatives des conditions du milieu naturel.

## BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P. 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Env.* 505: 409-422.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-31.
- Bancroft, B.A., Baker, N.J., Searle, C.L., Garcia, T.S., Blaustein, A.R. 2008. Larval amphibians seek warm temperatures and do not avoid harmful UVB radiation. *Behav. Ecol.* 19: 879-886.
- Barbee, G.C., Stout, M.J. 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest. Manag. Sci.* 65: 1250-1256.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R. 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121: 78-87.
- Behra, M., Cousin, X., Bertran, C., Vonesch, J.-L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strahle, U. 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 5: 111-118.
- Bednarska, A.J., Edwards, P., Sibly, R., Thorbek, P. 2013. A toxicokinetic model for thiamethoxam in rats: Implications for higher-tier risk assessment. *Ecotoxicology* 22: 548-557.
- Bertolo, A., Blanchet, F. G., Magnan, P., Brodeur, P., Mingelbier, M., Legendre, P. 2012. Inferring processes from spatial patterns: the role of directional and non-directional forces in shaping fish larvae distribution in a freshwater lake system. *PLoS One.* 7:11.
- Boily, V., Bertolo, A., Magnan, P., Martinoli, M.-G., Thérien, H.-M. 2011. The effects of UVR irradiance and spectral composition on yellow perch (*Perca flavescens*) larvae survival. *Aquat. Sci.* 73: 345-354.

- Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P., Chagnon, M. 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate : laboratory and field experiments. *Env. Sci. Pollut. Res.* 20: 5603-5614.
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C. et al. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 35-67.
- Bordereau, B. 2011. Récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides: caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université d'Angers, France, 190 p.
- Brodeur, P., Mingelbier, M., Morin, J. 2006. Impact de la régularisation du débit des Grands Lacs sur l'habitat de reproduction des poissons dans la plaine inondable du fleuve Saint-Laurent. *Le Nat. Can.* 130: 60-68.
- Camejo, G. Wallin, B., Enorjarvi, M. 1998. Analysis of oxidation and antioxidants using microtiter plates, *Methods Mol. Biol.*, 108: 377-386.
- Carrasco-Malio, A., Díaz, M., Mella, M., Montoya, M.J., Miranda, A., Landaeta, M.F. et al. 2014. Are the intertidal fish highly resistant to UV-B radiation? A study based on oxidative stress in *Girella laevis* (*Kyphosidae*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100: 93-98.
- Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W., Straus, D.L. 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8: 165-176.
- Chuiko, G.M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: Specific activities and *in vitro* inhibition by SSVP, an organophosphorus pesticide. *Comp. Biochem. Physiol.* 127: 233-242.
- Costa, C., Silvani, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J.J., Trovato, A., De Pasquale, R. 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 672: 40-44.
- Cresswell, J.E. 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology.* 20: 149-157.

- Crosby, E.B., Bailey, J.M., Oliveri, A.N., Levin, E.D. 2015. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 49: 81-90.
- Dauphin, D., Jobin, B. 2016. Changements de l'occupation du sol dans la plaine inondable du lac Saint-Pierre entre les années 1950 et 1997. *Le Nat. Can.* 140: 42-52.
- de la Chenelière, V., Brodeur, P., Mingelbier, M. 2014. Restauration des habitats du lac Saint-Pierre: un prérequis au rétablissement de la perchaude. *Le Nat. Can.* 128: 50-62.
- de Lafontaine, Y., Constant, G. 2002. Introduction et transfert d'espèces exotiques aquatiques dans le bassin hydrographique des Grands Lacs et du Saint-Laurent. Dans: Claudi, R., P. Nantel et E. Muckle-Jeffs (éds.). *Envahisseurs exotiques des eaux, milieux humides et forêts du Canada*. Ressources naturelles Canada, Ottawa, p. 73-92.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- EPA. 1991. Technical support document for water quality-based toxics control, Office of Water, U.S.E.P.A., Washington, DC 20460 Dans: Giroux, I., 2002. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec – Campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001 et évolution temporelle de 1992 à 2001, Québec, ministère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 45 p. et 5 annexes.
- Epel, D., Hemela, K., Patton, C. 1999. Development in the floating world: Defenses of eggs and embryos against damage from UV radiation. *Comp. Gen. Pharmacol.* 278: 271-278.
- Frenette, J.J., Arts, M.T., Morin, J. 2003. Spectral gradients of downwelling light in a fluvial lake (Lake Saint-Pierre, St-Lawrence River). *Aquat. Ecol.* 37: 77-85.
- Ford, K.A., Casida, J.E. 2006. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem Res. Toxicol.* 19: 1549-1556.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A., Wang, J. 2015. Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63: 1856-1862.



- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P. 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 103-118.
- Giraud, M., Bruneau, A., Gendron, A.D., Brodeur, P., Pilote, M., Marcogliese, D.J., Gagnon, C., Houde, M. 2016. Integrated spatial health assessment of yellow perch (*Perca flavescens*) populations from the St. Lawrence River (Quebec, Canada), part A: physiological parameters and pathogen assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 18073-18084.
- Giroux I., Sarrasin, B. 2011. Pesticides et nitrates dans l'eau souterraine près de cultures de pommes de terre - Échantillonnage dans quelques régions du Québec en 2008 et 2009, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 31 p. et 5 annexes.
- Giroux, I. 2014. Présence de pesticides dans l'eau au Québec- Zones de vergers et de pommes de terre, 2010 à 2012 , Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 55 p. et 5 annexes.
- Giroux, I. 2015. Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 47 p. et 5 annexes.
- Giroux, I., Hébert, S., Berryman, D. 2016. Qualité de l'eau du Saint-Laurent de 2000 à 2014 : paramètres classiques, pesticides et contaminants émergents. *Le Nat. Can.* 140: 26-34.
- Giroux, I. 2018. État de situation sur la présence de pesticides au lac Saint-Pierre, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction de l'information sur les milieux aquatiques, 36 p.
- Gobeli, A., Crossley, D., Johnson, J., Reyna, K. 2017. The effects of neonicotinoid exposure on embryonic development and organ mass in northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 195: 9-15.
- Goulson, D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50: 977-987.

- Goyette, J., Bennett, E.M., Howarth, R.W., Maranger, R. 2016. Changes in anthropogenic nitrogen and phosphorus inputs to the St. Lawrence sub-basin over 110 years and impacts on riverine export. *Glob. Biogeochem. Cycles*. 1000-1014.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., Soreq, H. 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264: 672-686.
- Groupe de travail Suivi de l'état du Saint-Laurent. 2014. Portrait global de l'état du Saint-Laurent 2014. Plan Saint-Laurent. Environnement Canada, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec, Parcs Canada, Pêches et Océans Canada et Stratégies Saint-Laurent, 53 p.
- Guénette, S., Mailhot, Y., McQuinn, I., Lamoureux, P., Fortin, R. 1994. Paramètres biologiques, exploitation commerciale et modélisation de la population de perchaude (*Perca flavescens*) du lac Saint-Pierre, ministère de l'environnement et de la faune, Direction régionale Mauricie-Bois-Francs et Université du Québec à Montréal, 110 p.
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Agnihotri, N.P.K. 2002. Leaching behaviour of imidacloprid formulations in soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68: 502-508.
- Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Gupta, R.K. 2006. Effect of ultraviolet and sunlight on persistence of thiamethoxam in soil. *Pestic. Res. J.* 18: 211-214.
- Heidrei Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M. 2014. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 8010-8021.
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., Kuivila, K.M. 2014. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environ. Pollut.* 193: 189-196.
- Hudon, C., Carignan, R. 2008. Cumulative impacts of hydrology and human activities on water quality in the St. Lawrence River (Lake Saint-Pierre, Quebec, Canada). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65: 1165-1180.
- Hudon, C., Cattaneo, A., Tourville Poirier, A.-M., Brodeur, P., Dumont, P., Mailhot, Y., Amyot, J.-P., Despatie, S.-P., Lafontaine, Y. 2011. Oligotrophication from wetland epuration alters the riverine trophic network and carrying capacity for fish. *Aquat. Sci.* 74: 495-511.

- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., Trebše, P. 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 68: 1408-1418.
- Jeschke, P., Nauen R. 2008. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci*. 64:1084-1098.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A. 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem*. 59: 2897-2908.
- Jeschke, P., Nauen, R., Beck, M. E., 2013. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angew Chem Int Ed. Engl*. 52: 9464-9485.
- Jinguji, H., Thuyet, D.Q., Uéda, T., Watanabe, H. 2013. Effect of imidacloprid and fipronil pesticide application on *Sympetrum infuscatum* (Libellulidae: Odonata) larvae and adults. *Paddy Water Environ*. 11: 277-284.
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Srivastava, L.P. 2011. Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food Chem. Toxicol*. 49: 3086-3089.
- Key, P., Chung, K., Siewicki, T., Fulton, M. 2007. Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 68: 272-277.
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., Kawano, H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One*. 7.
- Kurwadkar, S.T., Dewinne, D., Wheat, R., McGaha, D.G., Mitchell, F.L. 2013. Time dependent sorption behavior of dinotefuran, imidacloprid and thiamethoxam. *J. Environ. Sci. Health B*. 48: 237-42.
- Landry, C., Houde, M., Brodeur, P., Spear, P., Boily, M. 2017. Lipophilic antioxidants and lipid peroxidation in yellow perch subjected to various anthropogenic influences along the St. Lawrence River (QC, Canada). *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 139: 316-325. Cette référence n'est pas dans le texte.
- Larouche, T. 2015. Connectivité des larves de perchaude dans le fleuve Saint-Laurent, Mémoire de maîtrise, Maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec à Chicoutimi, 76 p.

- La Violette, N. 2004. Les lacs fluviaux du Saint-Laurent : Hydrologie et modifications humaines. *Le Nat. Can.*, 128: 98-104.
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42: 656-666.
- Livingstone, D.R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet.* 427-430.
- Liu et al. 2006. Sorption and Degradation of Imidacloprid in Soil and Water. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41: 623-634.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R. 2015. Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* 136: 97-107.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., Hermes, L. M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 208: 100-11.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101:13-30.
- Magnan, P., Brodeur, P., Vachon, N., Mailhot, Y., Dumont, P., Paradis, Y., 2014. État du stock de perchaude du lac Saint-Pierre en 2011 et bilan du plan de gestion de 2008. Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivières et ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec.
- Magnan, P., Mailhot, Y., Dumont, P. 2008. État du stock de perchaude du lac Saint- Pierre en 2007 et efficacité du plan de gestion de 2005 Tech. rep, Comité aviseur scientifique sur la gestion de la perchaude du lac Saint-Pierre, Université du Québec à Trois-Rivières et Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec.
- Mahmoud, U.M., Mekkawy, I.A.A., Sayed, A.E.D.H. 2009. Ultraviolet radiation-A (366 nm) induced morphological and histological malformations during embryogenesis of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 95: 117-128.

- Mailhot, Y., Dumont, P., Paradis, Y., Brodeur, P., Vachon, N., Mingelbier, M., Lecomte, F., Magnan, P. 2015. Yellow Perch (*Perca flavescens*) in the St. Lawrence River (Québec, Canada): population dynamics and management in a river with contrasting pressures. Dans: Couture, P. et G.G. Pyle (éd.). Biology of perch. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Main, A.R., Headley, J. V., Peru, K.M., Michel, N.L., Cessna, A.J., Morrissey, C.A. 2014. Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. PLoS One. 9.
- Masson, S., De Lafontaine, Y., Pelletier, A.-M., Verreault, G., Brodeur, P., Vachon, N., Massé, H. 2013. Dispersion récente de la tanche au Québec. Le Nat. Can. 137: 55-61.
- Mekkawy, I.A.A., Mahmoud, U.M., Osman, A.G., Sayed, A.E.-D.H. 2010. Effects of ultraviolet A on the activity of two metabolic enzymes, DNA damage and lipid peroxidation during early developmental stages of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Fish Physiol. Biochem. 36: 605-626.
- Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A. 2015. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 111: 236-241.
- Mingelbier, M., Brodeur, P., Morin, J. 2005. Recommandations concernant les poissons et leurs habitats dans le Saint-Laurent fluvial et évaluation des critères de régularisation du système lac Ontario – Saint-Laurent, ministère des Ressources naturelles et de la faune, Direction de la recherche sur la faune, 141 p.
- Mineau, P., Palmer, C. 2013. The Impact of the Nation's Most Widely Used Insecticides on Birds, American Bird Conservancy, 84 p. Dans: Giroux, I., 2002. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec – Campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001 et évolution temporelle de 1992 à 2001, Québec, ministère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 45 p. et 5 annexes
- Morakchi, S., Maïza, A., Farine, P., Aribi, N., Soltani, N. 2005, Effects of a neonicotinoid insecticide (acetamiprid) on acetylcholinesterase activity and cuticular hydrocarbons profil in German cockroaches. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 70: 843-84.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J.H., Sánchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K. 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. Environ. Int. 74: 291-303.

- Moyes, C. D. et P. M. Schulte 2008. Principles of animal physiology, Pearson International Edition, United States, 754 p.
- Paradis, Y., Bertolo, A., Mingelbier, M., Brodeur, P., Magnan, P. 2014. What controls distribution of larval and juvenile yellow perch? The role of habitat characteristics and spatial processes in a large, shallow lake. *J. Great Lakes Res.* 40: 172-178.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van Der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 68-102.
- Pouzand, C., Tyrrell, R. M. 1999. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 70: 380-390.
- Provencher, C., Bertolo, A., Magnan, P., Martinoli, M. 2014. Modulation of specific apoptotic DNA fragmentation after short term exposure to natural UVR in fish larvae. *Open J. Apoptosis* 3: 1-13.
- Qi, S., Wang, D., Zhu, L., Teng, M., Wang, C., Xue, X., Wu, L. 2018. Neonicotinoid insecticides imidacloprid, guadipyr, and cycloxaprid induce acute oxidative stress in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148: 352-358.
- Richard, G., Côté, D., Mingelbier, M., Jobin, B., Morin, J., Brodeur, P. 2011. Utilisation du sol dans la plaine inondable du lac Saint-Pierre (fleuve Saint-Laurent) durant les périodes 1950, 1964 et 1997 : interprétation de photos aériennes, numérisation et préparation d'une base de données géoréférencées, Québec. Rapport technique préparé pour le ministère des Ressources naturelles et de la Faune et Environnement Canada. Gouvernement du Québec, 42 p.
- Sánchez-Bayo, F., 2011. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 4: 1-11.
- Sarkar M. A., Biswas P. K., Roy S., Kole R. K., Chowdhury A., 1999. Effect of pH and type of formulation on the persistence of imidacloprid in water. *Bull Environ Contam Toxicol.* 63: 604-609.
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J., Xue, Y., 2015. Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *PLoS One.* 10.

- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Xue, Y., Smith, J., Baute, T., 2016. Field-scale examination of neonicotinoid insecticide persistence in soil as a result of seed treatment use in commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.* 35: 295-302.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, et al. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 5-34.
- Simoneau, M., 2017. Qualité de l'eau des tributaires du lac Saint-Pierre : évolution temporelle 1979-2014 et portrait récent 2012-2014. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l'état de l'environnement, 54 p. et 13 annexes.
- Table de concertation régionale du lac Saint-Pierre 2017. Cohabitation agriculture-faune en zone littorale au lac Saint-Pierre, Document accepté par la Table de concertation régionale du lac Saint-Pierre et en attente d'approbation du ministère du Développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques, Comité ZIP du lac Saint-Pierre, 37 p.
- Tennekes, H.A., Sánchez-bayo, F. 2011. Time-Dependent Toxicity of Neonicotinoids and Other Toxicants: Implications for a New Approach to Risk Assessment. *Environ. Anal. Toxicol.* 1-8.
- Thany, S.H. 2009. Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* 30: 1045-1052.
- Thibault, A. 2008. Bilan et recommandations : Priorité à la perchaude. Comité consultatif conjoint pour la gestion des stocks de poissons du lac Saint-Pierre (CCCGP), 46 p.
- Thuyet, D.Q., Watanabe, H., Motobayashi, T. 2011. Effect of formulations and treatment methods of nursery boxes applied with insecticide on the behavior of imidacloprid in rice paddy fields. *J. Pestic. Sci.* 36: 9-15.
- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., Trebše, P. 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76: 907-914.
- Tomizawa, M., Casida, J.E. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 339-364.

- Tomizawa, M., Casida, J.E. 2005. Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45: 247-268.
- Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A.C., Comaklı, S., Acil, G., Kokturk, M., Atamanalp, M. 2017. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 175: 186-191.
- van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.-M., Belzunces, L.P., 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr Opin Environ Sustain*, 5: 1-13.
- van der Sluijs, J.P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bijleveld van Lexmond, M., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C.A., et al. 2015. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ Sci Pollut R*. 22: 148-154.
- Velisek, J., Stara, A. 2018. Effect of thiacloprid on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 194: 481-487.
- Vetter, R. D., Kurtzman, A., Mori, T., 1999. Diel Cycles of DNA Damage and Repair in Eggs and Larvae of Northern Anchovy, *Engraulis mordax*, Exposed to Solar Ultraviolet Radiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 69: 27-33.
- Vieira, C.E.D., Pérez, M.R., Acayaba, R.D.A., Raimundo, C.C.M., dos Reis Martinez, C.B. 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 195: 125-134.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol. Indic.* 23: 274-279.
- Vincent, W.F., Neale, P. J., 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. Dans: *The Effect of UV Radiation in the Marine Environment* (de Mora, S. Demers et M. Vernet, éd.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 149-176.
- Whitehead, R.F., S. J. de Mora et S. Demers, 2000. Enhanced UV radiation - a new problem for the marine environment. Dans: *The Effect of UV Radiation in the Marine Environment* (de Mora, S. Demers et M. Vernet, éd.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1-34.



- Whiteside, M., Mineau, P., Morrison, C., Knopper, L.D. 2008. Comparison of a score-based approach with risk-based ranking of in-use agricultural pesticides in Canada to aquatic receptors. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 215-36.
- Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C., Pflugmacher, S. 2001. Toxicokinetics of Atrazine in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 199-205.
- Williamson, C.E., Metzgar, S. L., Lovera, P. A., Moeller, R. E. 1997. Solar ultraviolet radiation and the spawning habitat of yellow perch, *Perca flavescens*. *Ecological Applications*. 7: 1017-1023.
- Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., Chang, Z. 2016. Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45: 132-139.