

Quels sont les effets d'un insecticide néonicotinoïde, l'imidaclopride, sur les stades embryo-larvaires de l'esturgeon sterlet, *Acipenser ruthenus* ?

Organisme d'accueil : UMR EPOC équipe Ecotoxicologie Aquatique, et
INRAE Unité Ecosystèmes Aquatiques et Changements Globaux

Encadrant EPOC : Davail Blandine et Cachot Jérôme

Encadrant INRAE : Chèvre Patrick et Rochard Eric



Croc Nathanaël

Master 2 :
Toxicologie et
Ecotoxicologie –
Toxicologie humaine
et environnementale

Année 2023-2024



Engagement de non-plagiat

Je, soussigné(e), Nathanaël Croc

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Nom-Prénom : Croc Nathanaël

Cet engagement de non-plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

Liste Abréviation :

NEOs = Néonicotinoïdes

IMI = Imidaclopride

OSPAR = Convention d'Oslo-Paris

CITES = Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

IUCN = International Union for Conservation of Nature's

Bassin GGD = Bassin Gironde-Garonne-Dordogne

hpf =hour post fertilization

dpf = day post fertilization

dph = day post hatching,

S9 = Surnageant obtenu après centrifugation 9000g des homogénats de tissus

CAT = Catalase

GST = Glutathion-S-Transférase

GSH = Glutathion réduit

GSH-CDNB = complexe formé entre la GSH et le CDBN (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) induite par l'action de la GST

TBars = Acide thio barbiturique

MDA = Malondialdéhyde

ACP = Analyse en composantes principales

DL₅₀ = Dose létale avec 50% de mortalité des individus

Remerciement

Tout d'abord je tiens particulièrement à remercier mes tuteurs de stage Blandine Davail, Jérôme Cachot, Patrick Chèvre ainsi que Eric Rochard de m'avoir conseillé tout au long de ce stage. Merci à vous pour toutes vos lectures, corrections et idées que vous m'avez fournies afin de rédiger ce rapport.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble de l'équipe de la station de St-Seurin -sur-l'Isle, composée de Fabrice Vetillard, Alex Bois, Florent Lalanne et Fabien Polese. Merci à eux pour leurs aides lors de la mise en place du système d'expérimentation ainsi que pour les différentes manipulations réalisées sur site.

Pour terminer je souhaite également remercier Christelle Clérandeau pour les conseils et l'application des protocoles en lien avec biomarqueurs.

Table des matières

1. Introduction	p.1-4
2. Matériel et Méthode	
2.1 Système d'exposition à l'imidaclopride	p.5
2.2 Obtention et fécondation des œufs, mortalité et éclosion des embryons/larves	p.6
2.3 Analyses des données biométriques	p.6
2.3.1 Activité cardiaque	p.6
2.3.2 Taille, poids et anomalie physiologique	p.7
2.4 Analyse comportementale	p.7
2.5 Analyse des biomarqueurs	p.8
3. Résultats	
3.1 Taux de fécondité, mortalité et d'éclosion	p.9
3.2 Activité cardiaque	p.9-10
3.3 Taille, poids et anomalie	p.10-11
3.4 Analyse comportementale	p.11-12
3.5 Analyses des biomarqueurs	p.12-13
4. Discussion	
4.1 Taux de fécondité, mortalité et d'éclosion	p.14-15
4.2 Activité cardiaque	p.15
4.3 Croissance	p.15-16
4.4 Analyse comportementale	p.16-17
4.5 Analyses des biomarqueurs	p.17-18
5. Conclusion et perspective	p.18
6. Liste des Références Bibliographiques	
7. Références internet	
8. 4^{ème} de couverture	
9. Annexe	

1. Introduction

À l'heure actuelle, le monde est touché par un problème de plus en plus préoccupant qui est la pollution des différents compartiments de la biosphère, pouvant ainsi induire des effets sur les écosystèmes, sur la biodiversité qui compose ces derniers ainsi que sur la santé humaine (Sousa et al., 2018). Parmi les milieux touchés par la pollution, l'ensemble des écosystèmes aquatiques des eaux de surface, d'eau de mer ou d'eau douce sont concernés, mais aussi des eaux souterraines. Cette pollution aquatique résulte de diverses activités humaines induisant une large présence de polluants qu'ils soient organiques ou non. Les sources de cette pollution aquatique sont variées : déversement de produits chimiques dans les cours d'eau, rejets industriels et/ou miniers, rejets de stations d'épuration (médicaments ou autres) ou encore ruissellements des produits phytosanitaires de l'agriculture (Sousa et al., 2018). Ces différents polluants sont plus ou moins concentrés dans les eaux. Leur présence est détectée dans des gammes très variées de concentrations, allant du ng/L au µg/L voire même mg/L. Cela peut induire des effets plus ou moins marqués sur les organismes selon le temps d'exposition, y compris augmentant la mortalité, et conduisant donc à un risque pour les écosystèmes (Sousa et al., 2018). Un des exemples les plus probants des risques pour les milieux aquatiques est fourni par les produits phytosanitaires tels que les insecticides. Ces produits sont étudiés et créés pour lutter contre les insectes ravageurs. Parmi ces insecticides, on trouve les organophosphorés (ex : DDT), les carbamates (ex : Carbaryl) ou les néonicotinoïdes avec le thiaméthoxame ou encore l'imidaclopride (Casida & Durkin, 2013; Jeschke et al., 2011; Simon-Delso et al., 2015; Sparks & Lorsbach, 2017). Ces différentes classes d'insecticides luttent contre les ravageurs par des modes d'actions différents. Par exemple les organophosphorés sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Sparks & Lorsbach, 2017) alors que les néonicotinoïdes sont des agonistes des récepteurs nicotiniques (Casida & Durkin, 2013; Hashimoto et al., 2020; Matsuda et al., 2001). Dans les deux cas ces molécules auront un effet sur le fonctionnement musculaire entraînant une paralysie voire la mort de l'insecte ravageur (Batikian et al., 2019; Casida, 2018; Samojeden et al., 2022; Simon-Delso et al., 2015). Les néonicotinoïdes (NEOs) sont des insecticides systémiques qui diffusent dans toute la plante après traitement du sol, de la plante ou des graines (Morrissey et al., 2015; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014; X. Wang et al., 2018) pour protéger différents types de culture telles que pour le blé, de betterave ou encore pour les arbres fruitiers. Et donc ils permettent de lutter contre certains insectes ravageurs ou vecteurs de maladie (<https://substances.ineris.fr/substance/138261-41-3>; Jeschke & Nauen, 2008; Simon-Delso et al., 2015). La création des premiers NEOs date de la fin des années 80s- début 90, avec la création de l'imidaclopride, thiaclopride ou encore du thiaméthoxame. Ce type d'insecticide se base sur la structure de la molécule de nicotine combinée à des modifications de groupement afin d'obtenir une meilleure efficacité ainsi qu'une photostabilité (Tomizawa & Casida, 2005). Ainsi en 1991, a commencé la commercialisation des néonicotinoïdes avec, dans un premier temps, la vente d'imidaclopride par Bayer CropScience sous le nom de Gaucho®, suivie par d'autres NEOs tels que le thiaméthoxame en 1998 (Bass et al., 2015; Goulson, 2013; Simon-Delso et al., 2015; Strouhova et al., 2023; J. Wang et al., 2023). Depuis leur lancement, les NEOs sont devenus les insecticides les plus vendus et utilisés en agriculture avec une part d'environ 25% mondiale en 2010 correspondant à environ 20000 tonnes de substance active d'imidaclopride (Jeschke et al., 2011; Simon-

Delso et al., 2015; X. Wang et al., 2018) ou encore 23% du marché mondial en 2016 (Morrissey et al., 2015; Strouhova et al., 2023). Mais parmi les NEOs, le plus vendu mondialement est l'imidaclopride (Hashimoto et al., 2020; Pang et al., 2020; Strouhova et al., 2023). En France avant 2018, l'achat d'imidaclopride correspond à plusieurs centaines de tonnes de substance active (Annexe Fig.1) jusqu'à son interdiction d'utilisation en extérieur en Europe par la Commission européenne le 30 mai 2018 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0783&from=NL>). Toutefois une dérogation entre 2021 et 2022 sera accordée dans certains pays comme la France pour lutter contre les pucerons dans les cultures de betteraves à l'aide de l'imidaclopride (<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043099904>; <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000045098120>). Sachant qu'en 2013 une limitation de l'utilisation de certains NEOs dont l'imidaclopride a été apportée par la Régulation No. 485/2013 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0485>). L'un des intérêts à utiliser des NEOs est leur mode d'action plus sélectif sur leurs cibles, et donc un certain degré de « protection » envers les espèces non-cibles, type les vertébrés (Mamy et al., 2023; Morrissey et al., 2015; Simon-Delso et al., 2015; X. Wang et al., 2018). Cette sélectivité vient du fait que les NEOs, dont l'imidaclopride, sont des agonistes des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, induisant des effets neurotoxiques (Sánchez-Bayo & Hyne, 2014; Strouhova et al., 2023; Thunnissen et al., 2020; X. Wang et al., 2018). De plus, ces molécules possèdent une affinité plus marquée pour les récepteurs d'arthropodes en raison de leur structure et de la présence ou non de certaines sous-unités α et/ou β sur ces récepteurs. Comme c'est le cas de l'imidaclopride : les sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 7$ sont moins sensibles à l'imidaclopride que les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\beta 1$ (Matsuda et al., 2001; Simon-Delso et al., 2015; Tomizawa & Casida, 2005). Néanmoins cette sélectivité de l'imidaclopride pour les récepteurs d'arthropodes, n'exclut pas la possibilité d'effets toxiques chez des arthropodes non-cibles, voire des effets sublétaux chez les vertébrés tel que les oiseaux ou bien grenouilles (Gibbons et al., 2015; Mamy et al., 2023; Rico et al., 2018; Samojeden et al., 2022; X. Wang et al., 2018). Cette sélectivité peut être visible avec les différentes DL50 entre arthropodes et vertébrés montrant une toxicité plus faible chez les vertébrés (<https://substances.ineris.fr/substance/138261-41-3>; Mamy et al., 2023; Tomizawa & Casida, 2005). La problématique de l'imidaclopride, outre sa toxicité, est sa présence de façon ubiquiste dans les cours d'eau mondiaux, avec des concentrations très variables allant de 0,001 $\mu\text{g/L}$ jusqu'à 10 $\mu\text{g/L}$ (Casado et al., 2019; Sousa et al., 2018; Strouhova et al., 2023; J. Wang et al., 2023). Par exemple, il est possible de détecter de l'imidaclopride aux États-Unis, en Chine, Brésil, Espagne, Roumanie (Annexe Tab.1) ou bien encore en France (Annexe Fig.2, Fig.3, Fig.4 et Fig.5). Cela est causé par différents phénomènes permettant le transport de l'imidaclopride des plantes et des champs vers les sources d'eau, cela est principalement causé par le ruissellement des eaux lors des intempéries, le lessivage des sols et des eaux souterraines ou encore par l'érosion des sols contaminées (Batikian et al., 2019; Mamy et al., 2023; Morrissey et al., 2015; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014; Strouhova et al., 2023; Thunnissen et al., 2020; J. Wang et al., 2023). La contamination des eaux est aussi favorisée par les caractéristiques spécifiques de l'imidaclopride, comme avec son faible coefficient octanol-eau ($K_{ow} = 0,57$, qui prouve qu'il est hydrophile), sa grande solubilité dans l'eau (= 610 mg/L à 20°C), sa résistance à l'hydrolyse dans les eaux comprises entre pH 4 et pH 7 ($DT_{50} = > 365$ jours à pH 9), sa faible biodégradabilité ainsi que la faible affinité avec les sols ($K_{oc} = 2,19-2,90$). Toutes ces

caractéristiques vont favoriser et induire un risque pour les organismes aquatiques (<https://substances.ineris.fr/substance/138261-41-3>; Batikian et al., 2019; Morrissey et al., 2015; Sánchez-Bayo & Hyne, 2014). Comme mentionné précédemment l'imidaclopride est une substance pouvant induire des effets sublétaux sur les vertébrés tels que les oiseaux ou les grenouilles mais aussi sur les poissons. Ainsi aux doses environnementales (entre 0,001 µg/L et 10 µg/L), il est possible de noter des effets sublétaux chez des poissons adultes :

- Stress oxydant et peroxydation lipidique chez Prochilode rayé (*Prochilodus lineatus*) ou le tétra à queue-jaune (*Astyanax altiparanae*). (Almeida et al., 2021; Alvim & Martinez, 2019)
- Génotoxicité chez le cichlidé caméléon (*Australoheros facetus*). (Iturburu et al., 2017; Iturburu, Simoniello, et al., 2018)

Toutefois l'imidaclopride peut aussi avoir des effets sur les stades de vie plus précoces, embryons et larves, qui sont en théorie plus sensibles que les adultes (Cristina et al., 2019; Islam et al., 2019; Y. Wang et al., 2017). Ces effets sont plus ou moins marquées selon l'espèce considérée :

- Modifications comportementales chez des larves de vairon-à-grosse-tête (*Pimephales promelas*). (Jeninga et al., 2023)
- Modifications développementales chez le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*), la carpe commune (*Cyprinus carpio*) ou chez le médaka (*Oryzia latipes*). (Erhunmwunse et al., 2023; Islam et al., 2019; Vignet et al., 2019)
- Modifications d'expressions de gènes chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). (Zhang et al., 2021)
- Modifications des périodes et des succès d'éclosion.

L'imidaclopride étant ubiquiste et pouvant induire des effets sur les poissons adultes mais aussi sur les embryons et les larves, pourrait nuire et aggraver la situation précaire de certaines populations de poissons tels que les esturgeons. Les esturgeons sont des poissons migrateurs amphihalins vivant dans l'hémisphère nord (Lassalle et al., 2011). Quasiment toutes les espèces d'esturgeons sont anadromes (migrent du milieu marin vers les rivières pour frayer) sauf quelques potamodromes (vivent en eau douce et migrent en lacs ou rivières pour frayer), tels que l'esturgeon sibérien (*Acipenser baeri*), l'esturgeon jaune (*Acipenser fulvescens*) ou le sterlet (*Acipenser ruthenus*) (Billard & Lecointre, 2000; Lassalle et al., 2011; Peterson et al., 2006). Parmi les 25 espèces d'esturgeons (famille des *Acipenseridae*), 17 appartiennent au genre *Acipenser*, dont le seul esturgeon sterlet (*Acipenser ruthenus*) n'est pas menacé d'extinction dans le milieu naturel (<https://www.iucnredlist.org/search?query=Sturgeons&searchType=species>; Birstein & DeSalle, 1998; Lassalle et al., 2011; Rochard et al., 1997). Toutes les autres espèces d'esturgeons sont classées comme étant éteintes en milieux naturels ou en danger d'extinction critique selon la liste rouge de IUCN et sont placées dans diverses conventions internationales tel que CITES ou OSPAR (Friedrich, 2018; Lassalle et al., 2011; Rochard, 2011). Cela est causé par la surpêche, la perte et/ou la dégradation des habitats de vie et de reproduction ainsi que la pollution des eaux, pouvant induire des conditions non favorables pour la migration. Parmi ces espèces classées en danger d'extinction, l'esturgeon européen (*Acipenser sturio*), espèce endémique

d'Aquitaine est emblématique des espèces sauvées *in extremis* de l'extinction. Cette espèce est considérée comme en danger d'extinction critique depuis 1996 (Acolas et al., 2011; Billard & Lecointre, 2000; Chassaing et al., 2016; Rochard et al., 1990). Au début des années 1900, l'espèce était présente dans tous les fleuves et rivières européennes assez grandes pour leur permettre de se reproduire, mais à présent le seul site de reproduction et de vie des juvéniles d'*A.sturio* est le bassin Gironde-Garonne-Dordogne. Cela s'explique par la mise en place de plan de conservation et de repeuplement pour cette espèce incluant le stockage des semences mâles, la stimulation de la ponte des femelles, la fécondation *in vitro*, suivi du lâcher des jeunes à différents stades de vie dans le bassin GGD (<http://www.sturio.fr/index.php/esturgeon-ecologie-situation/historique-de-la-conservation/programmes-life>). Ainsi il y a un intérêt à déterminer si les larves ou juvéniles ainsi relâchés trouvent un environnement de qualité suffisante pour leur survie jusqu'à l'âge adulte. Parmi les différents facteurs pouvant influencer négativement la reproduction, les taux d'éclosions ou bien encore la survie des larves d'*A.sturio*, des toxiques tels que les métaux ou les polluants organiques comme l'imidaclopride sont connus pour présenter des effets sur les embryons et les larves de poissons (Acolas et al., 2011). Les concentrations d'imidaclopride sont en moyenne de 0,04 µg/L dans les eaux du bassin GGD (Fig.5). Toutefois, compte-tenu du statut de sauvegarde de l'espèce européenne *A.sturio*, il est inenvisageable de réaliser des tests de toxicité sur cette espèce quel que soit le stade de vie. La toxicité de l'imidaclopride sur les stades embryo-larvaires sera donc testée sur une espèce proche – le plus proche possible – de *A. sturio* et disponible en élevage. Cette espèce est le sterlet, *Acipenser ruthenus*, encore appelé esturgeon du Danube, qui présente un certain nombre de similitudes avec *A.sturio*. Les deux espèces sont considérées comme génétiquement proches ($2n = 60$ (Birstein & DeSalle, 1998)), se nourrissent d'organismes benthiques, ont des périodes de développement similaire (Muscalu-Nagy & Muscalu-Nagy, 2009), des périodes et des températures de reproduction proches : Avril-Mai, entre 12°C et 17°C pour *A. ruthenus* (Billard & Lecointre, 2000; Kalmykov et al., 2010; Muscalu-Nagy & Muscalu-Nagy, 2009; Peterson et al., 2006) et Mai-Juin entre 12°C et 26°C pour *A.sturio* (Billard & Lecointre, 2000; Delage et al., 2020; Lassalle et al., 2011), frayent dans des conditions d'oxygénation allant de 80% à 100% (Delage et al., 2020; Muscalu-Nagy & Muscalu-Nagy, 2009), et déposent leurs œufs dans des gravières (Billard & Lecointre, 2000; Rochard et al., 1990). Ces deux espèces se heurtent donc aux mêmes problématiques de dégradation des habitats ou de la pollution, potentiellement causée par la présence d'imidaclopride dans leurs milieux naturels de vie et de reproduction (Annexe Tab.1 et Fig.5). L'espèce *A.ruthenus* est une espèce d'esturgeon vivant uniquement en milieu dulcicole, avec une présence importante dans le Danube et la Volga (Friedrich, 2018; Kalmykov et al., 2010; Peterson et al., 2006). De plus, il a été montré que les larves de cette espèce peuvent être impactées par la présence de polluants dans leurs milieux, tel que le plomb ou le sélénium qui peut induire des déformations chez les larves *A.ruthenus* ou encore le benzo[a]pyrène induisant de la génotoxicité (Cristina et al., 2019; Gazo et al., 2020; Silvestre et al., 2010).

Ainsi pour toutes ces raisons, le choix d'utiliser *Acipenser ruthenus* comme modèle biologique pour remplacer *Acipenser sturio* est pertinent étant donné que l'objectif est de déterminer les effets potentiels de l'imidaclopride sur les stades embryo-larvaires d'esturgeon.

2. Matériel et méthode

2.1 Système d'exposition à l'imidaclopride

Le protocole d'exposition à l'imidaclopride est présenté en figure 6. Parmi les quatre conditions choisies, il y a un témoin ($T=0 \mu\text{g/L IMI}$), une condition représentant une concentration environnementale d'imidaclopride dans le bassin GGD ($1X= 0,04 \mu\text{g/L IMI}$), une condition représentant la quantité maximale d'imidaclopride trouvée dans le bassin GGD entre 2012 et 2022 ($10X= 0,4 \mu\text{g/L}$), ainsi qu'une dernière condition représentant la gamme de concentrations les plus fortes trouvées au niveau mondial, dans les eaux douces ($100X = 4 \mu\text{g/L IMI}$) (Fig.5 et Tab.1). Afin d'obtenir une eau contaminée à la bonne concentration en imidaclopride, une solution mère a été réalisée à l'aide d'un mélange d'imidaclopride (PESTANAL®, pureté $\geq \pm 98\%$) et d'eau distillée. Cette solution mère est ensuite diluée dans 20L d'eau déchlorée (correspond à la quantité présente dans les bacs « tampons ») afin d'obtenir les différentes concentrations nominales ($0,04 \mu\text{g/L}$, $0,4 \mu\text{g/L}$ et $4 \mu\text{g/L}$) de milieu d'exposition. 24h avant le début de l'expérimentation, une saturation du système est effectuée, afin de limiter au maximum le phénomène d'absorption dans les différents contenants utilisés, qui aurait risqué d'entraîner une diminution de la concentration en substance active. De plus, l'utilisation de tuyaux en vercilic, reconnu comme étant plus inerte que des tuyaux en plastiques simples, a été favorisé lors de l'expérimentation afin de limiter l'absorption de l'imidaclopride. En parallèle de la saturation, des dosages d'imidaclopride dans l'eau ont été effectuées par l'équipe ECOVEA de l'unité EABX d'INRAE Cestas. Ces mesures ont été faites afin de déterminer la concentration en imidaclopride de la solution mère ($= 4270 \mu\text{g/L}$) ainsi que pour vérifier la stabilité de notre molécule dans le temps car l'imidaclopride est connue pour être plus ou moins sensible à la photolyse en fonction des sources lumineuses (<https://substances.ineris.fr/substance/138261-41-3>; Moza et al., 1998; Raschitor et al., 2021). Par précaution un renouvellement quotidien de chacun des milieux d'expositions a été réalisé afin de maintenir les concentrations en imidaclopride stables. Chaque condition d'exposition est réalisée en 6 réplicats, contenant chacun une centaine d'œufs et si fécondés d'embryons si fécondés provenant de la reproduction artificielle issus de femelles *A. ruthenus*. La mise en contact des œufs et de la semence utilisée pour la fécondation, coïncide avec le début de l'exposition, dont la durée sera comptabilisée en heures post fécondation (hpf). L'exposition se poursuivant au-delà de l'éclosion, elle sera ensuite comptée en jours post-éclosion (dph), et durera jusqu'à la résorption de la vésicule vitelline. L'exposition à l'imidaclopride correspond finalement à une durée d'exposition de 12 jours. Pendant ces 12 jours d'exposition, les milieux d'exposition devront respecter certains paramètres tels qu'un éclairage continu de 12h par jour (de 07h00 à 19h00), une température maintenue à $15^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, un taux d'oxygénation compris entre 90% et 100% ainsi qu'un débit d'eau constant ($\approx 34 \text{ ml/min}$). Ainsi il y aura un suivi quotidien des températures et du taux d'oxygène dans chaque bac tampon. L'eau contaminée utilisée lors de l'expérimentation est gardée afin d'être traitée à l'aide d'un passage répété à des UV à 250 nm (pic dégradation entre 240 et 290 nm), ce qui permet une rapide photolyse, pendant 24h, suivi d'un passage dans du charbon actif afin de fixer les métabolites potentiellement toxiques comme imidaclopride-olefin sur la colonne de charbon actif.

2.2 Obtention et fécondation des œufs, mortalité et éclosion des embryons/larves

Les œufs et donc par extension les larves utilisées lors de ce projet sont issues d'une fécondation artificielle réalisée avec les esturgeons sterlet de la station expérimentale de Saint-Seurin-sur-l'Isle appartenant à l'unité EABX d'INRAE. Pour effectuer cette reproduction assistée, la même méthode que pour la reproduction d'*A. sturio* a été utilisée (Rouault et al., 2008). Ainsi un pool d'œufs provenant de 3 femelles matures différentes combiné à un mélange de semence de trois mâles a été utilisé. Chaque réplicat doit contenir initialement 100 œufs. Après calcul du poids moyen des œufs de chaque femelle, il est apparu qu'il fallait prélever 1,8 g d'œufs dans le pool pour disposer d'un échantillon de 100 œufs. Ainsi pour réaliser la fécondation, 1,80g \pm 0,10g d'œufs issus du pool de femelles ont été pesés puis 125 μ l de semence et 10 ml d'eau (Sert d'activateur de semence) ont été déposés sur les œufs. Le mélange est ensuite agité pendant exactement 1min 30 afin d'optimiser la fécondation. Les œufs sont déposés dans les réplicats correspondant à un ordre spécifique pour éviter d'avoir des écarts trop importants dans l'horaire de fécondation entre les œufs fécondés de chaque condition. Ils seront décollés les uns des autres pour éviter le développement de maladie et/ou une mortalité accrue. La détermination du pourcentage d'œufs fécondés est effectuée et se base sur le nombre d'œufs atteignant le stade 4 cellules. Pour effectuer cela, des photos sont prises toutes les 30 minutes pendant 2h après les 4 hpf ce qui correspond en moyenne au début d'apparition du stade 4 cellules (C. Park et al., 2013; J. Park et al., 2016). Ainsi les photos permettront de dénombrer le nombre d'œufs fécondés. Pendant les 12 jours suivant la fécondation, un suivi quotidien est effectué afin de dénombrer et retirer les individus morts ainsi que pour déterminer le nombre d'éclosion.

2.3 Analyses des données biométriques

2.3.1 Activités cardiaques

L'analyse de l'activité cardiaque des larves est réalisée à partir de 3 vidéos de 20 secondes de chaque individu à l'aide d'une loupe binoculaire (Nikon SMZ1270) équipée d'une caméra (Nikon DS-Fi3) dans une salle réglée à 16°C. Le choix des larves est fait de façon aléatoire parmi les larves ne montrant pas la présence d'anomalies physiologiques et/ou comportementale. Ainsi 5 larves sont prises dans les réplicats 1,2,3,4 et 5 de chaque condition (T, 1X, 10X et 100X) donc 25 larves (5 dph) par condition seront analysées. Les larves sont anesthésiées par balnéation dans une solution de benzocaïne et d'eau déchlorée à une concentration de 0,375mg/mL (Procédure d'anesthésie INRAE St-Seurin). La durée d'exposition pour l'anesthésie est variable en fonction des larves (\approx 4 minutes) ; on a préféré de se baser sur certains critères (la perte d'équilibre et l'absence de réponse aux stimuli tactiles) comme repère de l'anesthésie profonde et stable des larves. Une fois anesthésiées, les larves sont filmées avec le cœur visible pendant 20 secondes et ceci pour 3 vidéos. Les vidéos sont ensuite analysées pour déterminer le nombre de battements en 20 secondes pour chaque vidéo, ce nombre de battements sera multiplié par 3 afin d'obtenir le nombre de battements moyen par minute. Les larves utilisées pour l'analyse cardiaque sont euthanasiées à l'aide d'une solution de benzocaïne (0,75mg/mL) et sont utilisées pour les données biométriques (taille et poids) des larves de chaque condition.

2.3.2 Taille, poids et anomalies

Les larves euthanasiées utilisées pour l'analyse cardiaque sont pesées et mesurées. Pour la pesée, chaque larve est déposée sur du papier absorbant afin de retirer un maximum de l'eau résiduelle pouvant fausser le résultat. Cela sera répété pour l'ensemble des larves de chaque condition (25 larves par conditions de 5 dph). La mesure de la taille est faite sur les mêmes larves que celles utilisées pour la pesée, à l'aide de photos prises sous une loupe binoculaire (Nikon SMZ1270) équipée d'une caméra (Nikon DS-Fi3). La caméra a été calibrée grâce à un graticule pour microscope. Les photographies sont analysées grâce au logiciel Image J, donnant la taille de la tête, la taille du corps, et la surface de l'œil (Photo 1). Ces mêmes larves sont observées afin de dénombrer la présence d'anomalies ou malformations : courbures de la colonne, hémorragies, déformations, taille des yeux ou encore taille de l'estomac. Pour compléter l'analyse des anomalies, les larves présentant des signes de déformation/anomalie sévères ont été euthanasiées dans une solution de benzocaïne (0,75 mg/mL) puis pris en photographie en suivant le même protocole que pour les mesures de la taille afin de déterminer plus précisément les déformations et anomalies.

2.4 Analyses comportementales

L'analyse comportementale est réalisée sur 5 larves (3 dph) venant des 6 réplicats de chaque condition. Le système Daniovision combiné au logiciel de tracking Ethovision XT 16 ont été utilisés avec des plaques à 12 puits afin de pouvoir passer 3 larves de chaque condition par plaques. Les larves sont analysées selon un ordre précis afin de limiter l'impact d'une différence de temps sur les réactions des larves. Les larves passent par une période d'acclimatation de 7 minutes dans l'obscurité à 15°C avant le début de l'exposition à divers stimuli vibrants (stimulus vibratoire répété avec une vibration intensité 8 toutes les secondes pendant 51s ou stimulus vibratoire simple avec une intensité de 4) ainsi qu'aux stimuli lumineux (luminosité maximum puis diminution lente de la luminosité) avec une période de repos de 2 minutes. Pour ce faire, une procédure test a été créé (Annexe Image.2). Les résultats de ces différentes stimulations sont analysés en fonction de plusieurs critères pour déterminer s'il y a une réponse, une différence de réponse entre les conditions et/ou une adaptation aux stimuli. Les critères d'analyses sont la distance totale parcourue en cm, la vitesse moyenne de nage en cm/s ainsi que l'accélération des mouvements de nage en cm/s² et cela pour chaque larve pendant les 15 secondes suivant une stimulation sensorielle (Stimulus vibratoire ou changement de luminosité). Les larves sont euthanasiées avec une solution de benzocaïne (0,75mg/mL) à la fin de l'analyse.

2.5 Analyses des biomarqueurs

L'analyse de certaines enzymes considérées comme des biomarqueurs a été effectuée. Les biomarqueurs dont l'activité a été mesuré sont de la catalase (CAT), de la glutathion-S-transférase (GST), de l'acétylcholinestérase (AChE). D'autres biomarqueurs ont été analysés tel que l'estimation du taux de peroxydation lipidique par mesure de la quantité en Tbars ainsi que le taux d'oxydation des protéines par la mesure de la quantité de protéine carbonylées. Les analyses ont été réalisées à partir de suspension de tissus biologiques broyés (S9) d'un pool de 5 larves par réplicats et par conditions (au total 30 larves âgées de 6 dph analysées par condition). Les larves sont anesthésiées dans la benzocaïne, pesées par pool dans le cryotube puis congelées dans l'azote

liquide, afin de limiter les pertes des réponses enzymatiques. La pesée permet de rapporter l'expression de l'activité enzymatique à la quantité de tissu (ou de protéines). Les larves sont stockées à -150°C jusqu'à l'analyse, au laboratoire EPOC, de l'Université Bordeaux. Les analyses sont effectuées sur la fraction S9 de chaque pool, en suivant les 5 protocoles adaptés qui ont été fournis par EPOC (Augustyniak et al., 2015; Buege & Aust, 1978; Claiborne, 1985; Habig et al., 1974). Ce S9 correspond au broyage des pools, mélangé avec du tampon phosphate à $\text{pH} = 7,4$ puis une centrifugation à $9000g$. L'activité de la CAT est déterminée par rapport à la dégradation H_2O_2 alors que l'activité de la GST est déterminée par la formation du complexe GSH-CDNB. Ces activités enzymatiques de S9 sont déterminées par spectrophotométrie avec comme longueur d'onde respective de 240 nm (CAT) et 340 nm (GST). Les TBARs mesurent la quantité de MDA généré par la peroxydation des lipides dans notre échantillon de S9, l'analyse est faite par lecture de microplaque en fluorescence (Filtre 530/25). Pour la carbonylation des protéines, cela est réalisé par dosage des protéines carbonylées par spectrophotométrie à 370 nm.

3. Résultat

3.1 Taux de fécondité, mortalité et d'éclosion

La quantification du taux de fécondité par les stades 4 cellules et l'analyse statistique indique qu'aucune différence significative n'est observée entre les œufs fécondés témoins et les œufs fécondés exposés à de l'imidaclopride. Le taux de fécondité moyen des 4 conditions est de 81% avec un taux par condition de 80%, 81%, 80% et 84% pour respectivement le témoin, 1X, 10X et 100X. Aucune différence significative de mortalité embryonnaire entre les 4 conditions n'est à noter, le taux moyen de mortalité cumulée chez les embryons est de 25% pour le témoin, 24% pour la condition 1X, 24% pour la condition 10X et 25% pour la condition 100X. La mortalité chez les larves ne montre aucune différence significative entre les différentes conditions. Le taux moyen de mortalité chez les larves à 6 dph est de 1,9 % pour le témoin, 0,3 % pour la condition 1X, 1,4 % pour la condition 10X et 1,7 % pour la condition 100X. Le taux d'éclosion ne montre pas de différence significative entre les différents groupes d'exposition, avec un taux moyen d'éclosion de 68% pour le témoin, 69% pour la condition 1X, 69% pour la condition 10X et 71 % pour la condition 100X. Les statistiques ont été réalisées en omettant les incubateurs 6 de chaque condition à la suite d'un défaut de bacs ainsi qu'une mortalité accrue pour ces incubateurs.

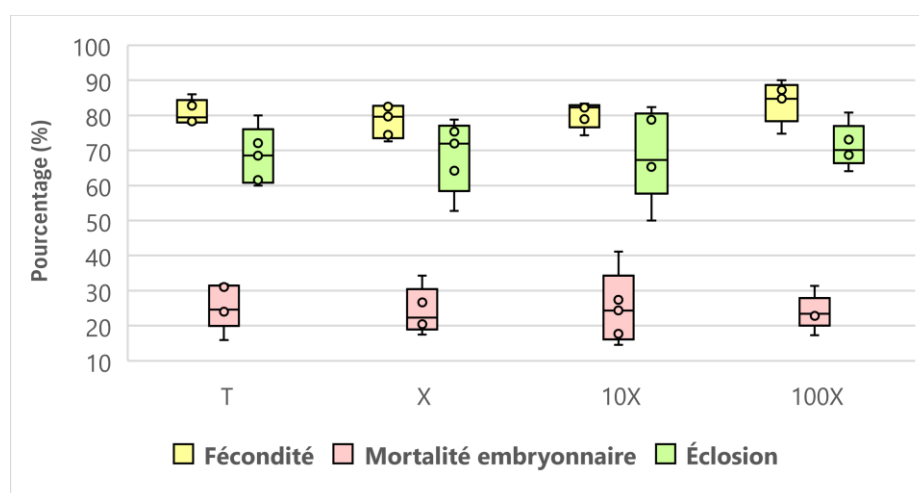


Figure 7 : Taux de fécondité des œufs, de mortalité embryonnaire et d'éclosion d'A.ruthenus lors d'exposition à différentes concentrations d'imidaclopride (N=4, n= 600 ± 20).

3.2 Activité cardiaque

L'analyse statistique indique une activité cardiaque significativement plus élevée chez les individus de la condition 100X en comparaison de la condition Témoin et de la condition 1X mais aucune différence significative avec la condition 10X. En parallèle, il y a aussi une activité cardiaque significativement plus élevée pour la condition 10X par rapport à la condition Témoin mais aucune différence entre la condition 10X et la condition 1X (Fig. 8). En moyenne les larves seront a 94 bpm, 97 bpm, 101 bpm et 104 bpm pour respectivement les larves Témoin, 1X, 10X et 100X.

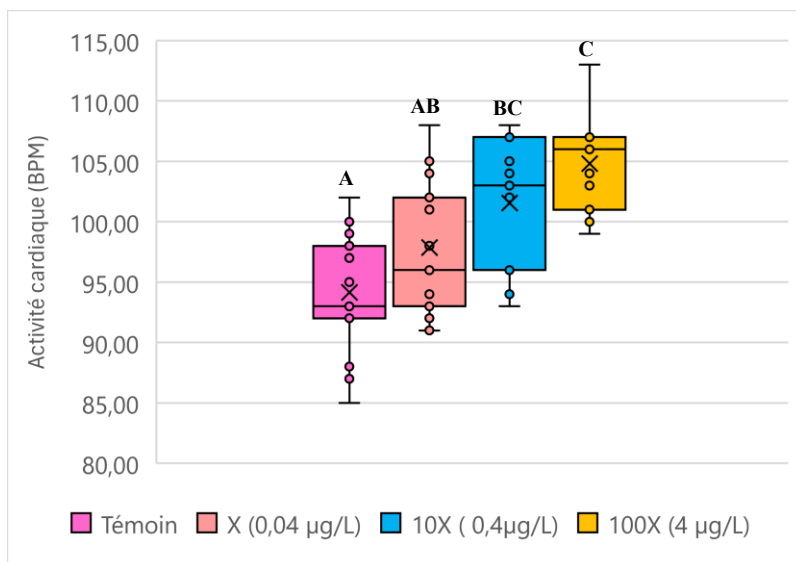


Figure 8 : Activité cardiaque de larves *A.ruthenus* (à 5 dph), exposées à différentes concentrations d'imidaclopride (N= 4, n= 15).

Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes (test statistique et $p < 0,05$).

3.3 Taille, poids et anomalies physiologiques

L'analyse de la taille des larves *A.ruthenus* indique des différences significatives pour la taille de la tête, qui est plus grande chez les larves issues de la condition 1X (0,04 µg/L) que chez les 3 autres conditions (Fig.9).

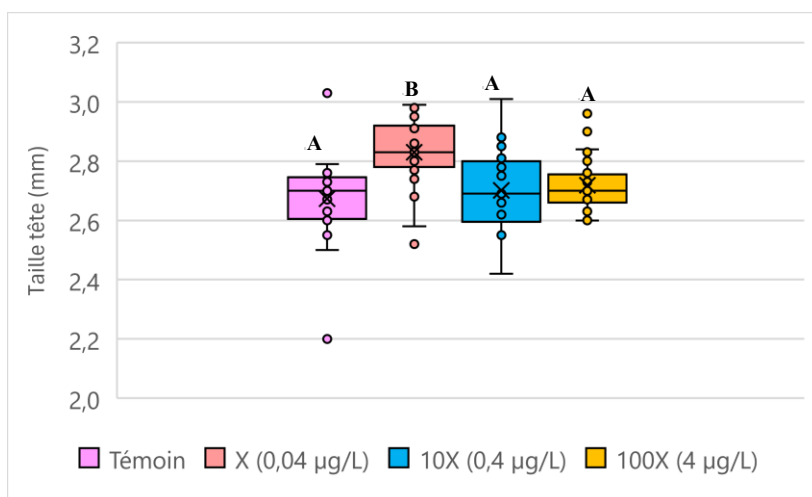


Figure 9 : Taille de la tête de larves *A.ruthenus* (à 5 dph) après une exposition à différentes concentrations d'imidaclopride (N= 4, n= 30).

Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes (test statistique et $p < 0,05$).

Aucune différence significative n'est observée ni pour la taille du corps ni la taille totale (moyenne = 14,9 mm \pm 0,4 mm). Toutefois il est possible d'observer une différence significative de la surface de l'œil entre les larves de la condition 1X et les larves de la condition 10X et 100X (Fig.10).

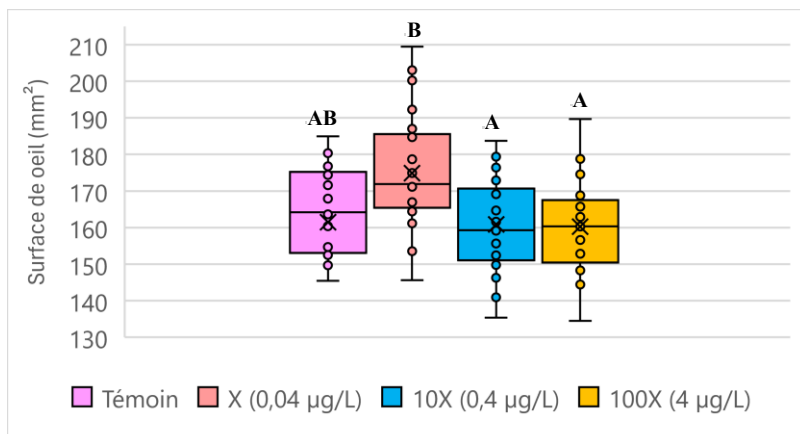


Figure 10 : Surface d'œil de larves *A.ruthenus* (à 5 dph) après une exposition à différentes concentrations d'imidaclopride (N= 4, n= 30).

Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes (test statistique et $p < 0,05$).

L'analyse du poids des larves d'*A.ruthenus* indiquent que les larves des conditions 100X possèdent un poids moyen significativement inférieure aux larves des autres conditions donc Témoin, 1X et 10X (Fig.11).

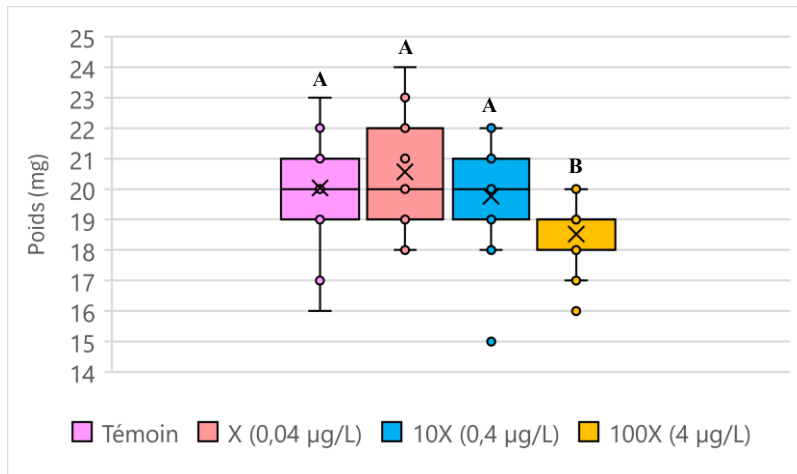


Figure 11 : Poids de larves d'*A.ruthenus* (5 dph) en fonction d'une exposition à différentes concentrations d'imidaclopride (N= 4, n=25)

Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes (test statistique et $p < 0,05$).

Le ratio Poids/taille ne montre aucune différence significative entre les différents groupes de larves. De plus, le nombres de larves montrant des anomalies et des difformités entre les conditions indique aucune différence significative.

3.4 Analyse comportementale

L'analyse de la distance totale parcourue et de l'accélération maximale sur les larves témoins indique des différences significatives avec les valeurs enregistrées pendant les 15s qui suivent les trois tappings (Annexe Fig.12 A et B). Mais ces différences ne sont pas visibles dans le cas d'une stimulation lumineuse (lumière allumée) et d'un stimulus vibratoire répété. Ces résultats sont identiques pour les contrôles des autres concentrations testées. En parallèle, l'analyse des différentes stimulations en fonction des différentes conditions indique des résultats variables. Il n'y a aucune différence significative entre les conditions d'exposition que cela soit pour la distance totale parcourue ou l'accélération maximale après un stimulus vibratoire simple. Toutefois à la suite d'un stimulus vibratoire répété, des différences significatives peuvent être observées pour la distance totale parcourue et l'accélération. Ces différences observées indiquent une distance totale et une accélération plus faible chez les individus exposés à l'imidaclopride pour les 3 concentrations testées par rapport aux individus témoins (Fig.13 et 14).

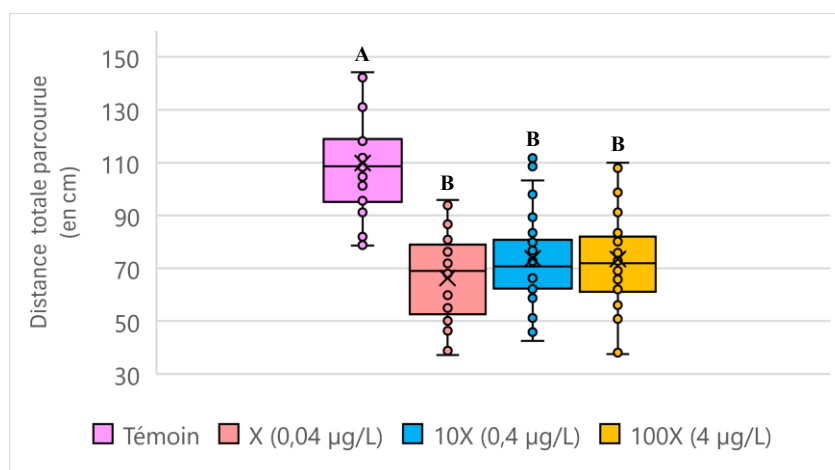


Figure 13 : Distance totale parcourue pendant 15 secondes de larves *A.ruthenus* (3 dph), suivant un stimulus vibratoire répété et une exposition à de l'imidaclopride (N=4, n= 30).

(Test statistique et $p < 0,05$).

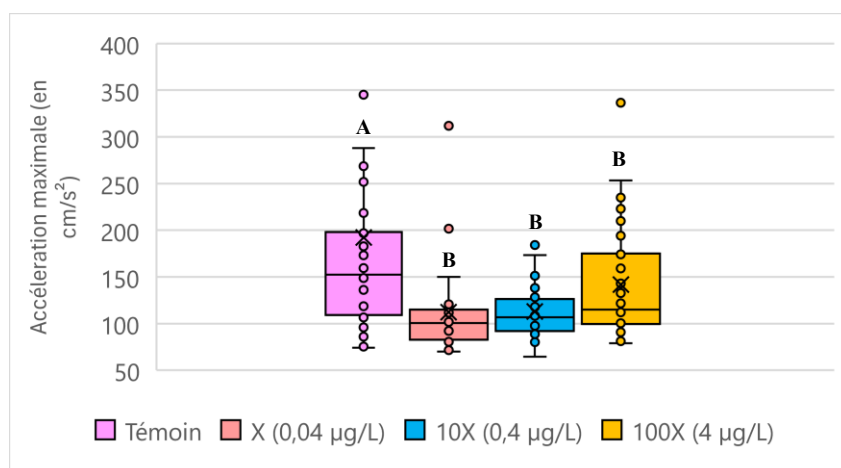


Figure 14 : Accélération maximale de larves *A.ruthenus* (3 dph), pendant 15 secondes suivant un stimulus vibratoire répété et une exposition à de l'imidaclopride (N=4, n = 30).

(Test statistique et $p < 0,05$).

L'exposition à la lumière n'induit pas de différence significative entre les groupes. Et aucune différence significative a été observée pour le critère de la vitesse moyenne, que cela soit par rapport au contrôle ou que cela soit lors de l'analyse des 4 conditions différentes d'exposition pour les différents critères.

3.5 Analyse des biomarqueurs

Les résultats de 5 biomarqueurs analysés ont été analysés en ACP (Fig. 15). L'ACP indique une forte corrélation positive entre les TBARS (peroxydation lipidique) et les protéines carbonylées. En parallèle, il y a aussi une corrélation légèrement plus faible entre les TBARS et les protéines carbonylées par rapport à l'expression de la GST. De plus, il est possible d'observer une peroxydation lipidique, une expression de la GST et une carbonylation de protéine bien plus élevée chez les individus exposés à 4 µg/L (100X) et 0,4 µg/L (10X) d'imidaclopride que chez les témoins ou les individus exposés à 0,04 µg/L (1X) d'imidaclopride (Fig. 15). Cela semble cohérent avec les tests statistiques indiquant également des différences significatives entre les différents groupes (Annexe Fig.16 A,B et E). Ainsi on a observé une activité accrue de la GST chez les larves des conditions 10X et 100X comparées aux autres conditions, une quantité de TBARs plus élevée dans les tissus des larves 100X et une carbonylation des protéines significativement plus élevées dans toutes les larves exposées à l'imidaclopride par rapport au Témoin. L'ACP indique aussi que l'acétylcholinestérase (AChE) est négativement corrélée avec toutes les composantes. L'expression de l'AChE ne montre aucune différence significative entre les conditions d'exposition à l'imidaclopride (Annexe Fig.16 D). Dans le cas de la CAT, l'ACP indique aucune corrélation avec les protéines carbonylées et la peroxydation lipidique (Tbars). Mais il est possible d'observer une certaine corrélation positive entre la CAT et la GST. L'expression de la catalase ne montre statistiquement aucune différence significative entre les conditions d'exposition à l'imidaclopride (Annexe Fig.16 C).

4. Discussion

4.1 Taux de fécondité, mortalité et d'éclosion

Le taux de fécondité ne montre aucune différence significative entre les différentes conditions d'exposition d'imidaclopride et le témoin. Le taux de fécondité obtenue est égal à 80%, 81%, 80% et 84% pour respectivement le témoin, 1X, 10X et 100X. Ces taux de fécondité correspondent aux taux de fécondité des contrôles. Ces mêmes contrôles indiquent que l'une des trois femelles utilisées, montrait un grand nombre d'œufs bloqués en stade gastrula. Ce qui peut potentiellement induire un arrêt de développement précoce supplémentaire à celle potentiellement induite par l'imidaclopride. Les résultats des analyses de la mortalité indiquent une absence de mortalité causée par l'imidaclopride que ce soit pour les embryons ou bien pour les larves d'*A.ruthenus*. Ceci est en partie cohérent avec la littérature. Ainsi dans le cas des larves de médaka (*Oryzias latipes*) ou de poisson zèbre (*Danio rerio*) exposées à des concentrations environnementales (entre 0,2 et 2000 µg/L) d'imidaclopride aucune mortalité n'a été observée (Vignet et al., 2019). Néanmoins d'autres études chez différentes espèces de poissons indiquent une augmentation de la mortalité des embryons et des larves lors d'une exposition à des doses environnementales de ce composé. Parmi ces espèces, il y a la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et le poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) qui indique une mortalité accrue des embryons et des larves lors d'une exposition aigue (entre 48 et 96h) respectivement à 10 µg/L et 30µg/L d'imidaclopride (Erhunmwunse et al., 2023; Islam et al., 2019). Ainsi, il est possible de penser que la mortalité plus ou moins importante causée par une exposition à des doses environnementales d'imidaclopride soit espèce dépendante. Toutefois, il y a aussi le cas du vairon à grosse tête (*Pimephales promelas*) dont la mortalité des larves varier selon les études. Ainsi, dans l'étude de Stinson aucune mortalité aigue n'est recensée pour les larves (exposée de 7-14 dpf) à des doses comprises entre 0,01 et 1 µg/L d'imidaclopride. En parallèle, dans l'étude de Jeninga, la même espèce montre des signes de mortalité significativement accrue pour des larves exposées de leurs stade embryonnaire jusqu'au stade larvaire (6 dpf) pour des doses de 0,16µg/L d'imidaclopride (Jeninga et al., 2023; Stinson et al., 2022). En plus de la nature de l'espèce, le temps d'exposition et le stade de développement exposé jouent aussi sur la mortalité comme le montre l'exemple précédent mais il est aussi possible d'illustrer cela avec le poisson zèbre (Y. Wang et al., 2017; Wu et al., 2018). Ainsi il est possible que les embryons et les larves d'esturgeon sterlet soient plus résistantes à l'imidaclopride que d'autres espèces malgré une exposition chronique durant tout le développement embryo-larvaire donc de la fécondation à la résorption de la vésicule vitelline. Expliquant potentiellement cette absence de mortalité. Les résultats du taux d'éclosion indiquent eux aussi une absence de différence significative entre les témoins et les conditions d'expérimentations. Cela correspond là aussi à ce qui a été montré avec le taux d'éclosion global des embryons de médaka et de poisson zèbre exposés à des concentrations environnementales (entre 0,2 µg/L à 2000µg/L) d'imidaclopride (Vignet et al., 2019). En parallèle, pour le poisson zèbre même pendant une exposition à des concentrations de 118 mg/L d'imidaclopride, aucune modification du taux d'éclosion n'a été rapportée (Könemann et al., 2022). Toutefois comme pour la mortalité, les effets sur le taux d'éclosion est potentiellement espèce dépendante. Ainsi d'après la littérature, d'autres travaux montrent que le taux d'éclosion diminue en présence d'imidaclopride chez certaines espèces même à doses environnementales

(entre 10 et 30 µg/L). C'est le cas de la carpe commune ou du poisson-chat africain (Erhunmwunse et al., 2023; Islam et al., 2019; Tyor & Kamboj, 2016).

4.2 Activité cardiaque

Les résultats de l'analyse cardiaque indiquent une augmentation de l'activité cardiaque pour les larves exposées à 0,4 µg/L (10X) et 4 µg/L (100X). Cette augmentation de l'activité cardiaque semble être dose-dépendante. Ainsi les battements cardiaques montrent que les larves d'*A.ruthenus* exposées font de la tachycardie et que cet effet est de plus en plus fort en fonction de la dose d'imidaclopride avec un effet significatif à partir de 0,4 µg/L (10X). Les effets observés chez ces larves *A.ruthenus* sont en sens inverses de ce qui est référencé dans la littérature. Les larves de *C.gariepinus* et de *D.rerio* exposées à de l'imidaclopride ont montré des effets de bradycardie donc une diminution de l'activité cardiaque. Dans le cas de *D.rerio* l'étude utilisait des doses d'imidaclopride de 118 mg/L et de 181 mg/L, et *C.gariepinus* les effets de bradycardies sont apparus pour une dose de 100 µg/L d'imidaclopride (Erhunmwunse et al., 2023; Könemann et al., 2022). Toutefois il est intéressant de prendre en compte les effets de bradycardie pourraient être dû à une diminution du métabolisme causée par des effets pathologiques de la molécule à forte concentration entraînant donc cette bradycardie. A l'inverse, une faible dose de polluants pourrait stimuler les processus de détoxification et donc augmenter la demande en oxygène du métabolisme et ainsi augmenter la fréquence cardiaque et potentiellement induire une tachycardie (Osterauer & Köhler, 2008). Ce qui pourrait être cohérent car chez le poisson zèbre il a été montré que lors d'une phase de dépuraison, une augmentation de la fréquence cardiaque apparaissait (Könemann et al., 2022). De plus, les résultats obtenus concernant les biomarqueurs indiquent une augmentation de la GST qui est une enzyme de détoxification ce qui pourrait indiquer une détoxification de l'imidaclopride qui nécessite un surplus énergétique et donc possiblement une augmentation de l'activité cardiaque.

4.3 Croissance

D'après les résultats obtenus, aucune différence n'est significative entre la condition témoin et les autres conditions par rapport à la taille totale des larves exposées aux concentrations testées d'imidaclopride. Toutefois la taille totale des larves mesurée correspond à une taille standard pour des larves d'*A.ruthenus* à 5 dph (Rybníkář et al., 2011), pouvant sous-entendre une croissance dite normale de la taille pour toutes les larves utilisées lors de l'expérimentation. Des résultats inverses pour la taille totale ont été obtenus chez des larves de *P.promelas* et *O.latipes*, pour qui une diminution de la taille totale des larves est visible chez ces deux espèces lors d'une exposition à des concentrations environnementales en imidaclopride (Jeninga et al., 2023; Vignet et al., 2019). Néanmoins chez *D.rerio* aucune différence de taille totale n'a été observée sachant que ces larves ont été exposées aux mêmes concentrations d'imidaclopride que les larves d'*O.latipes* (Vignet et al., 2019). Cela nous indique qu'en plus de la mortalité et du taux d'éclosion, les effets sublétaux sont eux aussi variables selon l'espèce. Par ailleurs, nos résultats indiquent une augmentation significative de la taille de la tête ainsi que de la surface de l'œil chez les larves de la condition 1X (0,04 µg/L) en comparaison avec les autres conditions d'exposition. Aucune source bibliographique chez les poissons fait état d'une

augmentation de la taille de la tête ni de la surface des yeux après une exposition à de l'imidaclopride. De ce fait, il est difficile de trouver une explication à ces deux effets chez les larves de la conditions 1X. Mais il est possible de penser que ces différences pourraient peut-être s'expliquer par une surexpression des gènes en lien avec le développement tel que IGF-I (Miandare et al., 2013). Nos résultats indiquent une diminution significative du poids chez les larves exposées à une concentration de 4 µg/L (100X) en comparaison au témoin et aux autres conditions d'exposition. Aucune publication n'existe qui permette de faire le lien entre une exposition à l'imidaclopride et le poids des larves. Toutefois on peut poser l'hypothèse que le poids plus faible des larves exposée à l'imidaclopride soit dû à une augmentation du métabolisme en lien avec l'augmentation de la détoxification de l'organismes.

4.4 Analyse comportementale

L'analyse des contrôles avant stimulation, par rapport aux larves après stimulation (stimulus vibratoires simples), indique une différence significative pour la distance parcourue totale ainsi que pour l'accélération maximale. Cette différence montre que les larves, après ce type de stimulation, vont parcourir moins de distance en plus d'effectuer des accélérations moins fortes. Ce qui laisse sous-entendre que les larves (3 dph) d'*A.ruthenus* sont sensibles à ce type de stimuli et que cela provoque un effet ralentissant grandement les larves dans leurs déplacements. Toutefois, aucune différence significative n'est observée entre les larves des différentes conditions lors d'une stimulation vibratoire simple. Cette absence de différence a été aussi observée pour les larves poisson zèbre (6 dpf) exposés à de l'imidaclopride et des stimulus vibratoires (Könemann et al., 2022). En parallèle pour les larves d'esturgeon sterlet, l'analyse de la stimulation vibratoire répétée qui s'avère désigner les possibles comportements liés à la fuite (Faria et al., 2019; Jeninga et al., 2023), indique une tendance plus faible pour les critères analysés entre les déplacements contrôle et ceux des larves 15s après avoir subi ce stimulus, mais cela n'est pas significatif. De plus il s'avère que pour ce stimulus vibratoire répété, une différence significative existe entre les différentes conditions d'exposition testées pour les larves *A.ruthnenus*. Ainsi les témoins vont avoir une distance parcourue et des pics d'accélération significativement plus élevée que pour les larves exposées à de l'imidaclopride. Sachant qu'une diminution des réponses peut être associée en partie à un phénomène d'habitation ou bien de fatigue (Faria et al., 2019). Les résultats obtenus sont contraires à ce qu'il a été trouver dans le cas de tapping répété chez des larves de poisson zèbre exposés à 25 µM de nicotine qui est elle aussi un agoniste des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine comme l'imidaclopride. Ainsi les larves de *D.rerio* (8 dpf) exposées à de la nicotine, auront une réponse plus importante au stimulus vibratoire répété comme une distance parcourue plus importante que les larves témoins de poissons zèbres (Faria et al., 2019). En ce qui concerne le cas de la stimulation par l'utilisation d'un stimulus lumineux, aucune différence significative a été trouvé entre les contrôles et après stimulation lumineuse. Ce qui pourrait laisser penser que les larves (3 dph) d'*A.ruthenus* ne sont pas sensibles à la lumière. Alors que chez d'autre espèce de poisson, une stimulation lumineuse va induire une diminution de la vitesse de nage et/ou de la distance parcourue comme pour les larves de *D.rerio* lors d'une exposition à de l'imidaclopride (Könemann et al., 2022; von Wyl et al., 2023; Zhang et al., 2021).

4.5 Analyse des biomarqueurs

Dans la littérature, aucun article ne s'intéresse à la relation entre l'exposition à des doses environnementales d'imidaclopride et l'expression de biomarqueurs chez les larves de poissons. Toutefois, ce n'est pas le cas chez les poissons juvéniles et adultes. Les résultats des analyses des différents biomarqueurs indiquent une augmentation significative de la concentration en Tbars chez les larves d'*A.ruthenus* exposées à 4 µg/L d'imidaclopride en comparaison des autres conditions (Fig.16A). Cette augmentation correspond à l'augmentation de la peroxydation lipidique (dégradation des lipides). Il a été mesuré aussi une telle augmentation sur des juvéniles de prochilode rayé (*Prochilodus lineatus*) et de tétra à queue jaune (*Astyanax altiparanae*) à des doses environnementales d'imidaclopride (Almeida et al., 2021; Vieira et al., 2018). Ces mesures de la quantité de Tbars vont varier selon les tissus analysés. Ainsi une augmentation des Tbars sera visible dans le cerveau de *P.lineatus* et dans les branchies ainsi que les muscles de *A.altiparanae*. Cette augmentation a été corrélée à une surproduction d'espèces réactives à l'oxygène (ERO), qui ont conduit à une induction de l'apoptose car les cellules vont perdre leurs intégrités membranaires dû à la peroxydation lipidique (Livingstone, 2001; Valavanidis et al., 2006). Parmi les biomarqueurs analysés, la catalase (CAT) est une enzyme qui joue un rôle dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les résultats indiquent aucune modification de l'activité enzymatique de la CAT que cela soit pour les larves témoins ou pour les larves d'esturgeon exposées à l'imidaclopride (Fig.16C). En parallèle, il a été montré que chez le cichlidé caméléon juvénile (*Australoheros facetus*), il y a une absence de modification de l'activité enzymatique de la CAT malgré une augmentation de la concentration en H₂O₂. De plus, cette augmentation en H₂O₂ est visible dès l'exposition à 1µg/L d'imidaclopride chez cette espèce (Iturburu, Bertrand, et al., 2018). Toutefois chez d'autres espèces de poissons, tel que *P.lineatus* ou sur les larves de *D.rerio*, il a été montré des modifications négatives de l'activité enzymatique de la CAT (Vieira et al., 2018; Wu et al., 2018). La GST est une enzyme de détoxification de phase II (conjugaison), qui va permettre de former un complexe de glutathion réduit au GSH avec un xénobiotique facilitant son excrétion de l'organisme (Habig et al., 1974). Les résultats indiquent une augmentation significative pour les larves d'*A.ruthenus* des conditions 10X et 100X (Fig.16B). Ce qui laisse penser que les larves soumises à des concentrations importantes en imidaclopride sont capables de détoxifier ce xénobiotique en partie grâce à la GST. La modification de l'activité de la GST est plutôt variable pouvant être une diminution ou une augmentation de l'activité comme chez les embryon et adultes de *D.rerio* (entre 300 et 6000 µg/l d'imidaclopride) ou *P.lineatus* (cerveau entre 125 et 1250 µg/L) en fonction du tissu, de l'espèce, de la dose et de la durée d'exposition (Chang et al., 2020; Ge et al., 2015; Tian et al., 2020; Vieira et al., 2018; Wu et al., 2018). Nos résultats font apparaître une quantité de protéines carbonylées significativement plus élevée dans les larves exposées à toutes les concentrations d'imidaclopride par rapport à la condition témoin. Cette augmentation semble être dose-dépendante chez les larves de l'esturgeon sterlet (Fig. 16E). On retrouve pour les juvéniles *P.lineatus* une augmentation significative de la quantité de protéines carbonylées au niveau des branchies mais pas au niveau du cerveau ni du foie (Alvim & Martinez, 2019). Pour finir, nos résultats indiquent une absence de modification de l'activité de l'AchE lors d'une exposition à des doses environnementales d'imidaclopride. Ces résultats correspondent aussi à ceux trouvés chez *P.lineatus*

(Vieira et al., 2018) et *D.rerio* (Zhang et al., 2021). Toutefois chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), lors d'une exposition durant 21 jours à 10 mg/L et 20 mg/L d'imidaclopride une diminution de l'activité de l'Ache a été observée (Fig.16D), indiquant qu'une exposition prolongée à forte dose d'imidaclopride peut induire des perturbations de l'activité de l'Ache (Topal et al., 2017).

5. Conclusion et perspective

Cette étude porte sur les effets de l'imidaclopride lors d'une exposition à des doses environnementales sur les stades embryo-larvaires de l'esturgeon sterlet (*Acipenser ruthenus*). Ainsi l'étude a montré une absence de toxicité pour les embryons et les larves aux concentrations retrouvées dans le bassin GGD. Mais cette même étude a permis de mettre en lumière un certain nombre d'effets sublétaux en lien avec ce néonicotinoïde. Parmi ces effets, l'augmentation de l'activité ou au contraire l'absence d'activité par rapport aux témoins, de certains biomarqueurs de défense (CAT et GST) mais aussi l'augmentation significative des dommages oxydatifs sur les lipides et les protéines (Tbars et protéines carbonylées). De plus, l'imidaclopride peut induire des effets sur la biométrie des larves que ce soit au niveau du poids ou de la taille de la tête ou des yeux. Mais aussi induire des effets sur l'activité cardiaque tel qu'en induisant une tachycardie. Toutefois pour les paramètres cités précédemment, aucun n'indique d'effet significatif aux concentrations moyennes d'imidaclopride dans le bassin GGD (0,04 µg/L). Cependant des effets sur le comportement lié à la fuite ont été observés. Ces effets indiquaient que les larves exposées à n'importe laquelle des concentrations d'imidaclopride même à 0,04 µg/L (1X), montrait une diminution dans les distances parcourues ainsi que sur les accélérations maximales qui sont moins importantes. Ce qui par conséquent, pourrait laisser supposer que les larves présentent en milieu naturelle serait plus enclin à être des proies « faciles ». Et donc faire baisser la survivabilité des individus. En complément de cette étude, il pourra être pertinent de doser/mesurer l'activité de d'autres biomarqueurs tel que la SOD ou les Cytochromes P450. Il sera pertinent également de mesurer l'expression de gènes en lien avec le métabolisme comme avec la consommation d'oxygène, la synthèse d'ATP ou bien les réserves énergétiques. Mais il pourrait aussi être pertinent de s'intéresser aux gènes liés la croissance, le développement du système nerveux central et/ou des organes en général. Enfin, il faudra s'intéresser plus en détails à la présence et la nature des anomalies développement et des lésions tissulaires en conduisant par exemple par des analyses histopathologiques pour déterminer des modifications aux seins de tissus. Il pourrait être aussi pertinent de s'intéresser plus aux modifications du comportements pouvant être possiblement être induit par l'imidaclopride. Ainsi avec l'ensemble de ces données et tests futurs, il pourrait être possible de déterminer de possibles effets létaux et sublétaux de d'autres molécules présentes dans l'eau sur les stades embryo-larvaires d'esturgeon mais aussi pour d'autres espèces touchées par la présence de polluant dans leur milieu de vie. Voir possiblement s'intéresser aux effets cocktails entre l'imidaclopride et d'autre polluant présent dans les eaux

6. Liste des Références Bibliographiques

1. Acolas, M. L., Castelnaud, G., Lepage, M., & Rochard, E. (2011). Biological Cycles and Migrations of *Acipenser sturio*. In P. Williot, E. Rochard, N. Desse-Berset, F. Kirschbaum, & J. Gessner (Éds.), *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio L. 1758 : The Reunion of the European and Atlantic Sturgeons* (p. 147-152). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20611-5_10
2. Almeida, É. C., Passos, L. S., Vieira, C. E. D., Acayaba, R. D., Montagner, C. C., Pinto, E., Martinez, C. B. dos R., & Fonseca, A. L. (2021). Can the insecticide Imidacloprid affect the health of the Neotropical freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei : Characidae)? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103634. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103634>
3. Alvim, T. T., & Martinez, C. B. D. R. (2019). Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 842, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>
4. Augustyniak, E., Adam, A., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Willetts, R., Korkmaz, A., Atalay, M., Weber, D., Grune, T., Borsa, C., Gradinaru, D., Chand Bollineni, R., Fedorova, M., & Griffiths, H. R. (2015). Validation of protein carbonyl measurement : A multi-centre study. *Redox Biology*, 4, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.014>
5. Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
6. Batikian, C. M., Lu, A., Watanabe, K., Pitt, J., & Gersberg, R. M. (2019). Temporal pattern in levels of the neonicotinoid insecticide, imidacloprid, in an urban stream. *Chemosphere*, 223, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.165>
7. Billard, R., & Lecointre, G. (2000). Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4), 355-392. <https://doi.org/10.1023/A:1012231526151>
8. Birstein, V. J., & DeSalle, R. (1998). Molecular Phylogeny of Acipenserinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9(1), 141-155. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0443>

9. Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(78)52032-6)
10. Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., & Johnston, P. (2019). Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Science of The Total Environment*, 670, 1204-1225.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.207>
11. Casida, J. E. (2018). Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators : Progress and Prospects. *Annual Review of Entomology*, 63, 125-144.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>
12. Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 221-225. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.002>
13. Chang, Y., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., & Jiang, H. (2020). Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*) : Acute toxicity and hepatotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10286-10295.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-07653-3>
14. Chassaing, O., Desse-Berset, N., Hänni, C., Hughes, S., & Berrebi, P. (2016). Phylogeography of the European sturgeon (*Acipenser sturio*) : A critically endangered species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 346-357. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.020>
15. Claiborne, A. (1985). Catalase Activity. In *Handbook Methods For Oxygen Radical Research* (p. 283-284). CRC Press.
16. Cristina, R. T., Baroga, M., Grozea, A., Mihailov, S. A., Sirb, N. M., Dumitrescu, E., & Muselin, F. (2019). AN EARLY EMBRYO MODEL OF STERLET (*ACIPENSER RUTHENUS*) FOR THE ASSESSMENT OF LEAD EFFECTS. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(1), 917-929. https://doi.org/10.15666/aeer/1701_917929
17. Delage, N., Couturier, B., Jatteau, P., Larcher, T., Ledevin, M., Goubin, H., Cachot, J., & Rochard, E. (2020). Oxythermal window drastically constraints the survival and development of European sturgeon early life phases. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 3651-3660.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-4021-8>

18. Erhunmwunse, N. O., Tongo, I., & Omigie, K. (2023). Embryonic toxicity of Imidacloprid : Impact on hatchability, survivability, swimming speed and cardiac function of catfish, *Clarias gariepinus*. *Ecotoxicology*, 32(1), 127-134. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02625-y>
19. Faria, M., Prats, E., Novoa-Luna, K. A., Bedrossiantz, J., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L. M., & Raldúa, D. (2019). Development of a vibrational startle response assay for screening environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance. *Science of The Total Environment*, 650, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.421>
20. Friedrich, T. (2018). Danube Sturgeons : Past and Future. In S. Schmutz & J. Sendzimir (Éds.), *Riverine Ecosystem Management : Science for Governing Towards a Sustainable Future* (p. 507-518). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73250-3_26
21. Gazo, I., Franěk, R., Šindelka, R., Lebeda, I., Shivaramu, S., Pšenička, M., & Steinbach, C. (2020). Ancient Sturgeons Possess Effective DNA Repair Mechanisms : Influence of Model Genotoxicants on Embryo Development of Sterlet, *Acipenser ruthenus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 6. <https://doi.org/10.3390/ijms22010006>
22. 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*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1856-1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>
23. Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
24. Goulson, D. (2013). REVIEW : An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
25. Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
26. Hashimoto, F., Takanashi, H., Nakajima, T., Ueda, T., Kadokawa, J., Ishikawa, H., & Miyamoto, N. (2020). Occurrence of imidacloprid and its transformation product (imidacloprid-nitroguanidine) in rivers during an irrigating and soil puddling duration. *Microchemical Journal*, 153, 104496. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104496>

27. Hayasaka, D., Korenaga, T., Suzuki, K., Saito, F., Sánchez-Bayo, F., & Goka, K. (2012). Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.004>
28. Islam, M., Hossen, Md. S., Sumon, K., & Rahman, M. (2019). Acute Toxicity of Imidacloprid on the Developmental Stages of Common Carp *Cyprinus carpio*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 11, 244-251. <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0410-8>
29. Iturburu, F. G., Bertrand, L., Mendieta, J. R., Amé, M. V., & Menone, M. L. (2018). An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts : Oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid. *Ecological Indicators*, 93, 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.019>
30. Iturburu, F. G., Simoniello, M. F., Medici, S., Panzeri, A. M., & Menone, M. L. (2018). Imidacloprid Causes DNA Damage in Fish : Clastogenesis as a Mechanism of Genotoxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(6), 760-764. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2338-0>
31. Iturburu, F. G., Zömisich, M., Panzeri, A. M., Crupkin, A. C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., & Menone, M. L. (2017). Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(3), 699-708. <https://doi.org/10.1002/etc.3574>
32. Jeninga, A. J., Wallace, Z., Victoria, S., Harrahy, E., & King-Heiden, T. C. (2023). Chronic Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Imidacloprid Impact Survival and Ecologically Relevant Behaviors of Fathead Minnow Larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(10), 2184-2192. <https://doi.org/10.1002/etc.5710>
33. Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—From zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64(11), 1084-1098. <https://doi.org/10.1002/ps.1631>
34. Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897-2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>

35. Kalmykov, V. A., Ruban, G. I., & Pavlov, D. S. (2010). Migrations and resources of sterlet *Acipenser ruthenus* (Acipenseridae) from the lower reaches of the Volga River. *Journal of Ichthyology*, 50(1), 44-51. <https://doi.org/10.1134/S0032945210010066>
36. Könemann, S., von Wyl, M., & vom Berg, C. (2022). Zebrafish Larvae Rapidly Recover from Locomotor Effects and Neuromuscular Alterations Induced by Cholinergic Insecticides. *Environmental Science & Technology*, 56(12), 8449-8462. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00161>
37. Lassalle, G., Béguer, M., & Rochard, E. (2011). An Overview on Geographical Distribution from Past Descriptions. In P. Williot, E. Rochard, N. Desse-Berset, F. Kirschbaum, & J. Gessner (Éds.), *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio* L. 1758 : The Reunion of the European and Atlantic Sturgeons (p. 81-90). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20611-5_6
38. Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)
39. Mamy, L., Pesce, S., Sanchez, W., Aviron, S., Bedos, C., Berny, P., Bertrand, C., Betoulle, S., Charles, S., Chaumot, A., Coeurdassier, M., Coutellec, M.-A., Crouzet, O., Faburé, J., Fritsch, C., Gonzalez, P., Hedde, M., Leboulanger, C., Margoum, C., ... Leenhardt, S. (2023). Impacts of neonicotinoids on biodiversity : A critical review. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31032-3>
40. Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids : Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573-580. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01820-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4)
41. Miandare, H. K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytönen, K. T., & Nikinmaa, M. (2013). Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 182, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.013>
42. Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic

invertebrates : A review. *Environment International*, 74, 291-303.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>

43. Moza, P. N., Hustert, K., Feicht, E., & Kettrup, A. (1998). Photolysis of imidacloprid in aqueous solution. *Chemosphere*, 36(3), 497-502. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00359-7)
44. Muscalu-Nagy, C., & Muscalu-Nagy, R. (2009, octobre 31). *OBSERVATIONS REGARDING THE EMBRYONARY AND LARVAL DEVELOPMENT OF STERLET (ACIPENSER RUTHENUS)*. <https://www.semanticscholar.org/paper/OBSERVATIONS-REGARDING-THE-EMBRYONARY-AND-LARVAL-OF-Muscalu-Nagy-Muscalu-Nagy/1e30f9dbbd1504fe89fe1b6bf2ac5a2023d3e71b>
45. Osterauer, R., & Köhler, H.-R. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 86(4), 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.013>
46. Pang, S., Lin, Z., Zhang, Y., Zhang, W., Alansary, N., Mishra, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). Insights into the Toxicity and Degradation Mechanisms of Imidacloprid Via Physicochemical and Microbial Approaches. *Toxics*, 8(3), 65. <https://doi.org/10.3390/toxics8030065>
47. Park, C., Lee, S. Y., Kim, D. S., & Nam, Y. K. (2013). Embryonic Development of Siberian Sturgeon *Acipenser baerii* under Hatchery Conditions : An Image Guide with Embryological Descriptions. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(1), 15-23. <https://doi.org/10.5657/FAS.2013.0015>
48. Park, J., Yoon, S., Seo, Y.-S., Han, K.-H., Jae, D., & Yoo. (2016). *Morphological Development of Eggs, Larvae and Juveniles of the Sterlet sturgeon, Acipenser ruthenus (Pisces : Acipenseridae)*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Morphological-Development-of-Eggs%2C-Larvae-and-of-Park-Yoon/b6f77ffc0d79241ff42bdfada4c63d3901e2ee2>
49. Peterson, D., Vecsei, P., & Hochleithner, M. (2006). Threatened fishes of the world : *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 (Acipenseridae). *Environmental Biology of Fishes*. <https://doi.org/10.1007/s10641-006-6659-1>
50. Raschitor, A., Romero, A., Sanches, S., Pereira, V. J., Crespo, J. G., & Llanos, J. (2021). Degradation of Neonicotinoids and Caffeine from Surface Water by Photolysis. *Molecules*, 26(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/molecules26237277>

51. Rico, A., Arenas-Sánchez, A., Pasqualini, J., García-Astillero, A., Cherta, L., Nozal, L., & Vighi, M. (2018). Effects of imidacloprid and a neonicotinoid mixture on aquatic invertebrate communities under Mediterranean conditions. *Aquatic Toxicology*, 204, 130-143.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.09.004>
52. Rochard, E. (2011). Present Legal Status of the European Sturgeon *Acipenser sturio*. In P. Williot, E. Rochard, N. Desse-Berset, F. Kirschbaum, & J. Gessner (Éds.), *Biology and Conservation of the European Sturgeon Acipenser sturio L. 1758 : The Reunion of the European and Atlantic Sturgeons* (p. 251-255). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20611-5_18
53. Rochard, E., Castelnaud, G., & Lepage, M. (1990). Sturgeons (Pisces : Acipenseridae); threats and prospects. *Journal of Fish Biology*, 37(sA), 123-132. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1990.tb05028.x>
54. Rochard, E., Lepage, M., & Meauzé, L. (1997). Identification et caractérisation de l'aire de répartition marine de l'esturgeon européen *Acipenser sturio* à partir de déclarations de captures. *Aquatic Living Resources*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.1051/alr:1997011>
55. Rouault, T., Chèvre, P., Rochard, E., Jatteau, P., Jacobs, L., & Gonthier, P. (2008). *Programme de recherche et de conservation de l'esturgeon européen Acipenser sturio ; bilan scientifique et technique 2007* (p. 80) [Report, irstea]. <https://hal.inrae.fr/hal-02596673>
56. Rybníkář, J., Prokeš, M., Mareš, J., & Cileček, M. (2011). Early development and growth of sterlet [*acipenser ruthenus*] in the CZECH REPUBLIC. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59, 217-226. <https://doi.org/10.11118/actaun201159050217>
57. Samojeden, C. G., Pavan, F. A., Rutkoski, C. F., Folador, A., da Fré, S. P., Müller, C., Hartmann, P. A., & Hartmann, M. (2022). Toxicity and genotoxicity of imidacloprid in the tadpoles of *Leptodactylus luctator* and *Physalaemus cuvieri* (Anura : Leptodactylidae). *Scientific Reports*, 12(1), 11926.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-16039-z>
58. Sánchez-Bayo, F., & Hyne, R. V. (2014). Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides. *Chemosphere*, 99, 143-151.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.051>

59. Silvestre, F., Linares-Casenave, J., Doroshov, S. I., & Kültz, D. (2010). A proteomic analysis of green and white sturgeon larvae exposed to heat stress and selenium. *Science of The Total Environment*, 408(16), 3176-3188. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.005>
61. Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., ... Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil) : Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
62. Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 146-162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>
63. Sparks, T. C., & Lorschach, B. A. (2017). Agrochemical Discovery—Building the Next Generation of Insect Control Agents. In *Advances in Agrochemicals : Ion Channels and G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) as Targets for Pest Control* (Vol. 1264, p. 1-17). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2017-1264.ch001>
64. Stinson, S. A., Hasenbein, S., Connon, R. E., Deng, X., Alejo, J. S., Lawler, S. P., & Holland, E. B. (2022). Agricultural surface water, imidacloprid, and chlorantraniliprole result in altered gene expression and receptor activation in *Pimephales promelas*. *Science of The Total Environment*, 806, 150920. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150920>
65. Strouhova, A., Velisek, J., & Stara, A. (2023). Selected neonicotinoids and associated risk for aquatic organisms. *Veterinarni Medicina*, 68(8), 313-336. <https://doi.org/10.17221/78/2023-VETMED>
66. Thunnissen, N. W., Lautz, L. S., van Schaik, T. W. G., & Hendriks, A. J. (2020). Ecological risks of imidacloprid to aquatic species in the Netherlands : Measured and estimated concentrations compared to species sensitivity distributions. *Chemosphere*, 254, 126604. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126604>

67. Tian, X., Hong, X., Yan, S., Li, X., Wu, H., Lin, A., & Yang, W. (2020). Neonicotinoids caused oxidative stress and DNA damage in juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197, 110566. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110566>
68. Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY : Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
69. 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.047>
70. Tyor, A., & Kamboj, D. (2016). Effects of imidacloprid on viability and hatchability of embryos of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4, 385-389.
71. Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
72. Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D., 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.077>
73. Vignet, C., Cappello, T., Fu, Q., Lajoie, K., De Marco, G., Clérandeau, C., Mottaz, H., Maisano, M., Hollender, J., Schirmer, K., & Cachot, J. (2019). Imidacloprid induces adverse effects on fish early life stages that are more severe in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) than in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 225, 470-478. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.002>
74. von Wyl, M., Könnemann, S., & vom Berg, C. (2023). Different developmental insecticide exposure windows trigger distinct locomotor phenotypes in the early life stages of zebrafish. *Chemosphere*, 317, 137874. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137874>

75. Wang, J., Yin, R., Liu, Y., Wang, B., Wang, N., Xiao, P., Xiao, T., & Hirai, H. (2023). Meta-analysis of neonicotinoid insecticides in global surface waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(1), 1039-1047. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22270-y>
76. Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., & Martínez, M.-A. (2018). Mechanism of Neonicotinoid Toxicity : Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58, 471-507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429>
77. Wang, Y., Yang, G., Dai, D., Xu, Z., Cai, L., Wang, Q., & Yu, Y. (2017). Individual and mixture effects of five agricultural pesticides on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(5), 4528-4536. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8205-9>
78. Wu, S., Li, X., Liu, X., Yang, G., An, X., Wang, Q., & Wang, Y. (2018). Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 235, 470-481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.120>
79. Zhang, J.-G., Ma, D.-D., Xiong, Q., Qiu, S.-Q., Huang, G.-Y., Shi, W.-J., & Ying, G.-G. (2021). Imidacloprid and thiamethoxam affect synaptic transmission in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 112917. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112917>

7. Références internet

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0783&from=NL>

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0485>

<https://www.iucnredlist.org/search?query=Sturgeons&searchType=species>

<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043099904>

<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000045098120>

<https://substances.ineris.fr/substance/138261-41-3>

<http://www.sturio.fr/index.php/esturgeon-ecologie-situation/historique-de-la-conservation/programmes-life>

8. 4ème de couverture

L'imidaclopride est un insecticide de la famille des néonicotinoïdes. Ces molécule sont des agonistes des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine. Ainsi l'intérêt d'utiliser cette famille de molécule, et donc l'imidaclopride, va être leur sélectivité pour les récepteurs d'insectes n'induisant pas de toxicité chez les vertébrés. Toutefois, plusieurs études ont montré des effets sublétaux de l'imidaclopride pour des espèces de vertébrés, tels que des poissons adultes. Ainsi il est pertinent de déterminer si l'imidaclopride va avoir des effets toxiques sur des stades de vie plus fragiles de vertébrés tels que les stades embryo-larvaires. Ce qui pourrait potentiellement diminuer la survie d'une espèce. Sachant que l'on retrouve de l'imidaclopride dans le milieu de vie d'espèce en voie d'extinction tel que le bassin GGD ou dans le Danube, biotopes respectivement de l'esturgeon européen (*A.sturio*) et de l'esturgeon du Danube (*A.ruthenus*). Ainsi cette étude va permettre de mettre en lumière différents effets toxiques de l'imidaclopride à des doses environnementales (0,04 µg/L, 0,4 µg/L et 4 µg/L) sur les stades embryo-larvaires d'esturgeon sterlet lors d'une exposition aigue (0 hpf à 12 dph). Parmi les effets observés, on peut retrouver chez les larves, de la tachycardie, une diminution du poids, des modifications comportementales ainsi que des modifications d'expression de biomarqueurs (Tbars, GST et protéines carbonylées). Toutefois aucun impact sur la mortalité ainsi que le développement des embryons et larves n'as été recensé.

Mots-clés : Imidaclopride, *A.ruthenus*, Embryon, Larve, Biomarqueurs

Abstract :

Imidacloprid is an insecticide in the neonicotinoid family. This family of molecules are agonists of nicotinic acetylcholine receptors. The advantage of using this family of molecules, and therefore imidacloprid, is that their selectivity for insect receptors does not induce toxicity in vertebrates. However, several studies have shown sublethal effects of imidacloprid in vertebrate species such as adult fish. It is therefore relevant to determine whether neonicotinoids, and thus imidacloprid, will also have toxic effects on the more fragile life stages of vertebrates, such as embryo-larval stages. This could potentially reduce the survival of a species. Given that imidacloprid is found in the habitats of endangered species such as the GGD basin and the Danube. Containing respectively European sturgeon (*A.sturio*) and Danube sturgeon (*A.ruthenus*). This study highlighted the various toxic effects of imidacloprid at environmental doses (0.04 µg/L, 0.4 µg/L and 4 µg/L) on the embryo-larval stages of sterlet sturgeon during acute exposure (0 hpf to 12 dph). Effects observed in larvae included tachycardia, weight loss, behavioral changes and changes in biomarker expression (Tbars, GST and carbonylated proteins). However, there was no impact on mortality or embryo/larvae development.

Keywords : Imidacloprid, *A.ruthenus*, Embryo, Larva, Biomarkers

9. Annexe

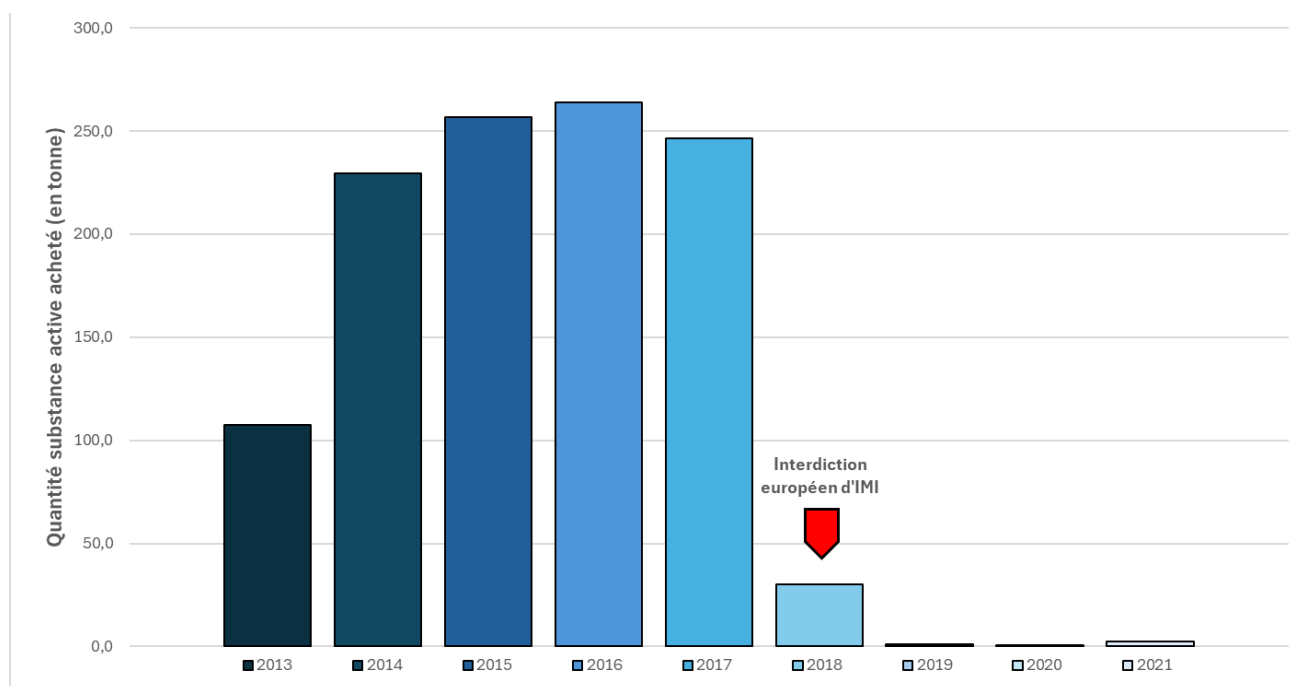


Figure 1 : Evolution de la quantité de substance active d'imidaclopride achetée en France entre 2013 et 2021. (<https://ventes-produits-phytopharmaceutiques.eaufrance.fr/search?filetype=Achats>)

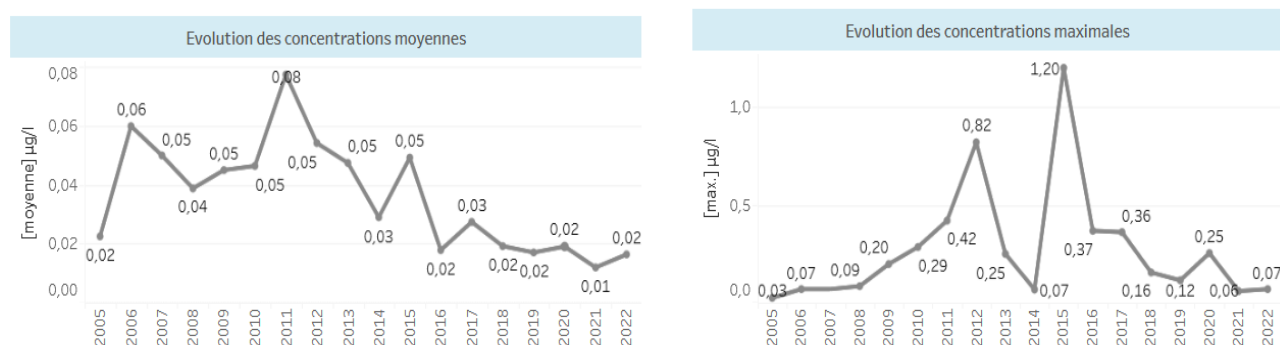


Figure 2 : Evolution des concentrations d'imidaclopride entre 2005 et 2022 dans les cours d'eau en Bretagne. (<https://bretagne-environnement.fr/pesticides-cours-eau-bretons-datavisualisation>)

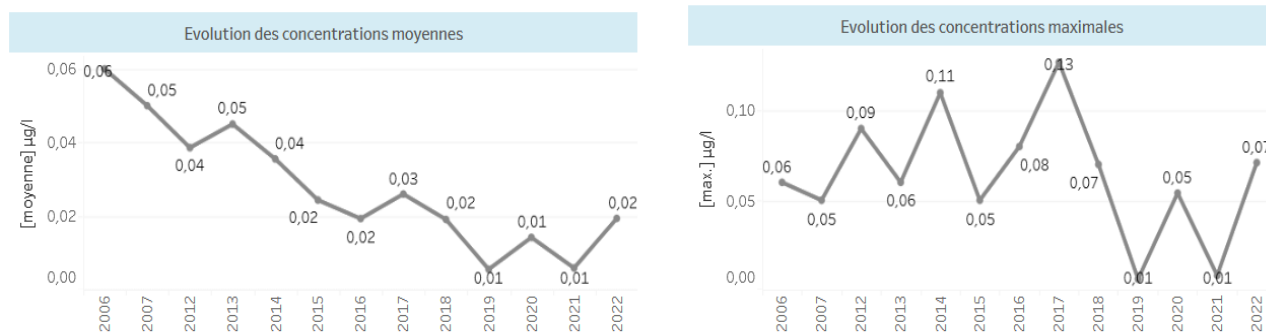


Figure 3 : Evolution des concentrations d'imidaclopride entre 2006 et 2022 dans les cours d'eau des Pays de la Loire. (<https://bretagne-environnement.fr/pesticides-cours-eau-bretons-datavisualisation>)

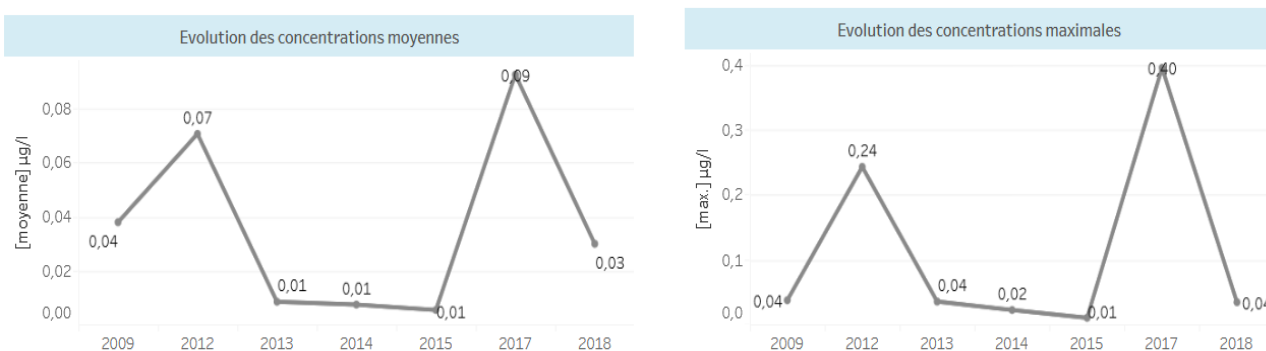


Figure 4 : Evolution des concentrations d'imidaclopride entre 2009 et 2018 dans les cours d'eau de Normandie. (<https://bretagne-environnement.fr/pesticides-cours-eau-bretons-datavisualisation>)

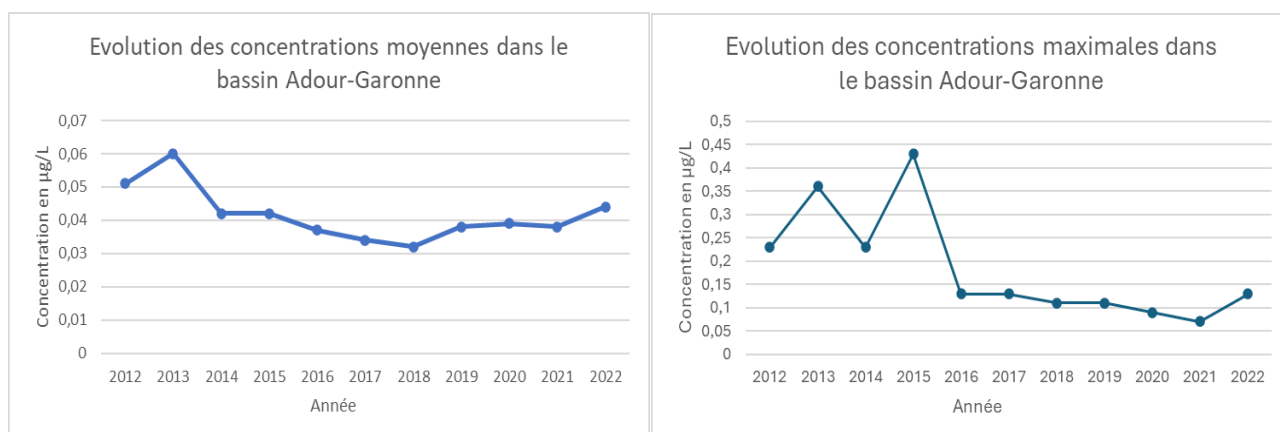


Figure 5 : Evolution des concentrations d'imidaclopride dans le Bassin Adour-Garonne entre 2012 et 2022. (<https://adour-garonne.eaufrance.fr/data/phytos>)

Zone d'analyse	Concentration en µg/L	Référence	Zone d'analyse	Concentration en µg/L	Référence
États-Unis (Monterey county)	Entre 0,02 et 9,14	Anderson et al. (2017)	Espagne (La Rioja Alta)	Entre 0,015 et 0,656	Sousa et al. (2018)
États-Unis (Imperial county)	Entre 0,103 et 3,48	Anderson et al. (2017)	Grèce (Pinios River basin)	0,306	Sousa et al. (2018)
Espagne	0,342	Araujo et al. (2022)	Brésil (Brilhante river)	Entre 0,016 et 0,053	Sposito et al. (2018)
États-Unis (Forester Creek)	0,016	Batikian et al. (2019)	Brésil (Dourados river)	Entre 0,020 et 0,030	Sposito et al. (2018)
Espagne (Ebro River)	0,016	Borrull et al. (2019)	Etats-Unis (proche de Salinas)	Entre 0,019 et 1,19	Stinson et al. (2022)
Belgique (Wulfdambeek)	0,004	Casado et al. (2019)	Argentine (Tapalqué Rive)	Entre 0,008 et 0,19	Strouhova et al. (2023)
Belgique (De Wamp)	0,006	Casado et al. (2019)	Canada (Nicomekl River)	Entre 0,009 et 3,4	Strouhova et al. (2023)
Italie (Roggia Saverona)	0,005	Casado et al. (2019)	Chine (Yangtze River Delta)	Entre 0,001 et 1,88	Strouhova et al. (2023)
Allemagne (Ems)	0,034	Casado et al. (2019)	Espagne	Entre 0,005 et 0,447	Strouhova et al. (2023)
Royaume-Unis (Otter)	0,013	Casado et al.(2019)	République Tchèque (Úhlava River)	0,011	Strouhova et al. (2023)
Japon (Uchida River)	0,409	Hashimoto et al. (2020)	Portugal (Guadiana Streams)	0,034	Strouhova et al. (2023)
Roumanie (Danube River)	Entre 0,0 et 0,008	Iancu et al. (2019)	Italie (Mariana Mantovana)	0,005	Strouhova et al. (2023)
Roumanie (Arges River)	Entre 0,003 et 0,008	Iancu et al. (2019)	États-Unis	10,4	Struger et al. (2017)
Chine (Yangtze River)	Entre 0,0 et 0,044	Mahai et al. (2019)	Chine (Yangtze River)	Entre 0,001 et 0,032	Wan et al. (2020)
Australie (autour de Sydney)	4,56	Sousa et al. (2018)	États-Unis	9,14	Wang et al. (2023)
Brésil (Jacuí river basin)	1,66	Sousa et al. (2018)	Chine (Beijiang River)	Entre 0,004 et 0,162	Zhang et al. (2019)

Tableau 1 Concentration en imidaclopride dans les différents cours d'eau du monde.

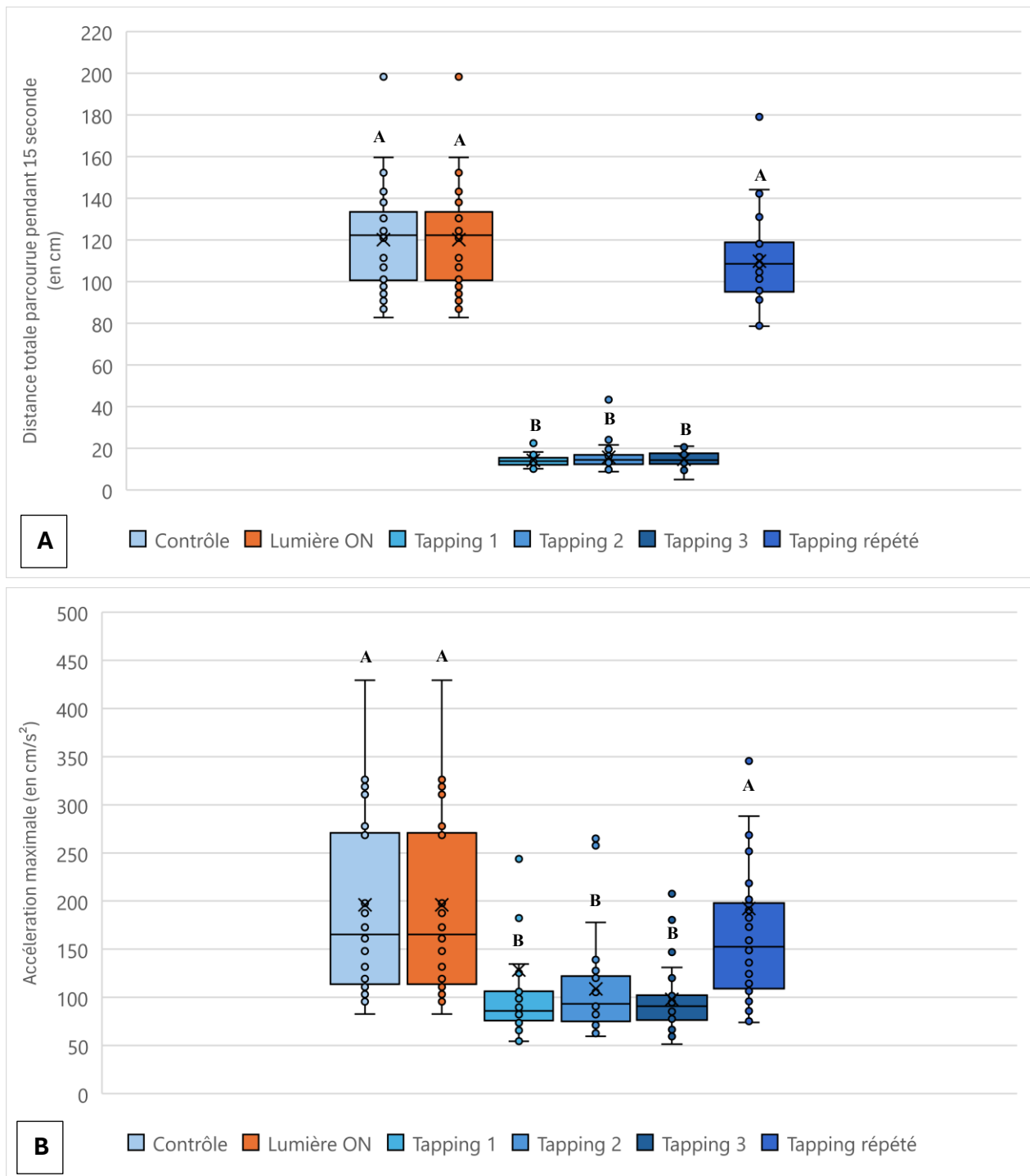


Figure 12 : Différence de réaction entre des larves d'*A.ruthenus* contrôles (avant stimulation) et 15 secondes suivant une stimulation (stimulus vibratoire et exposition à la lumière). Les larves utilisées sont issues des témoins d'exposition à l'imidaclopride (n=30).

Graphique **A** = Distance totale parcourue.

Graphique **B** = Accélération maximale.

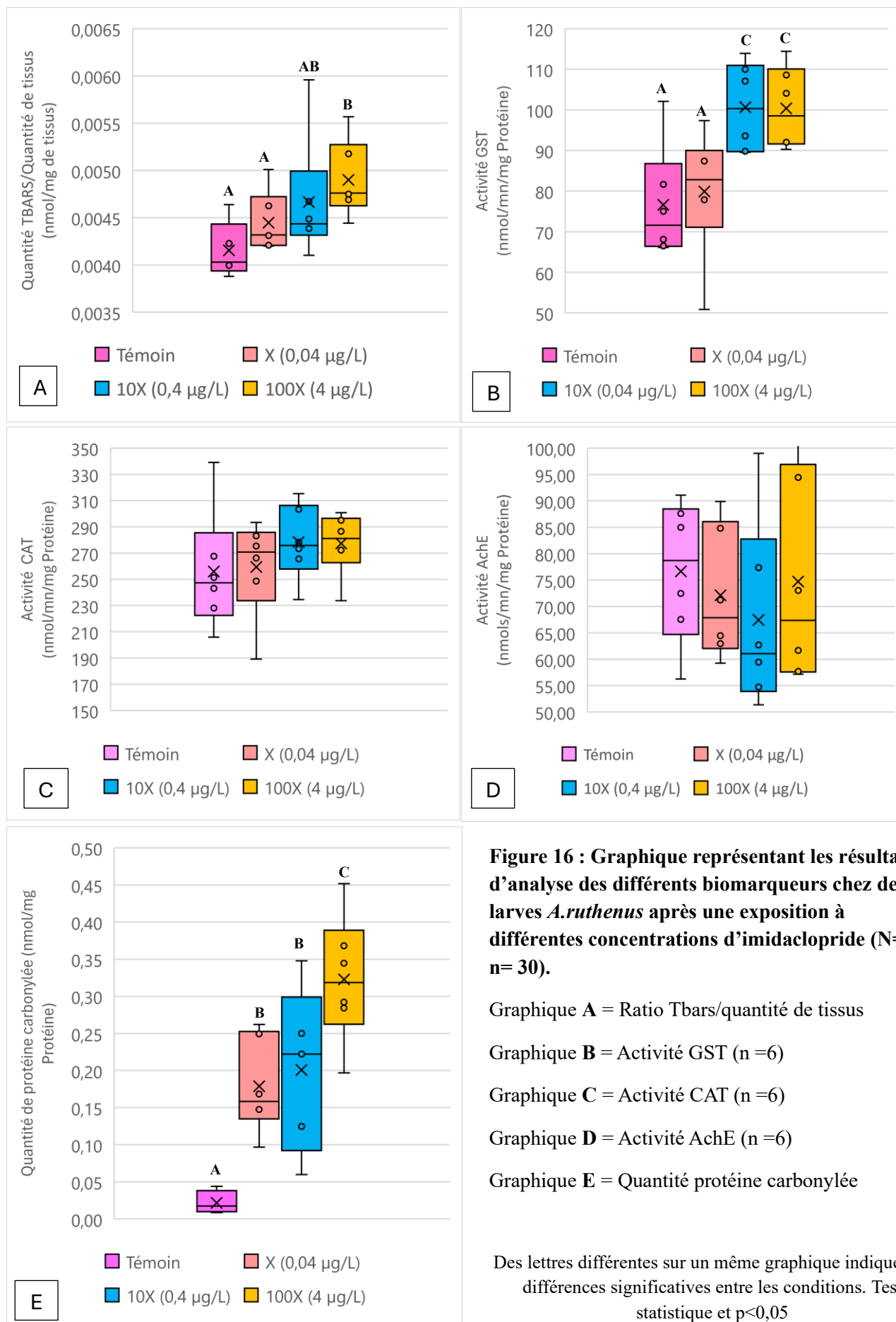


Figure 16 : Graphique représentant les résultats d'analyse des différents biomarqueurs chez des larves *A.ruthenus* après une exposition à différentes concentrations d'imidaclopride (N=4, n= 30).

Graphique **A** = Ratio Tbars/quantité de tissus

Graphique **B** = Activité GST (n =6)

Graphique **C** = Activité CAT (n =6)

Graphique **D** = Activité AchE (n =6)

Graphique **E** = Quantité protéine carbonylée

Des lettres différentes sur un même graphique indique des différences significatives entre les conditions. Test statistique et $p < 0,05$