

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE PESTICIDES SUR *Elliptio complanata* *IN VITRO ET IN SITU* : UTILISATION et
ADAPTATION DE BIOMARQUEURS

THÈSE PRÉSENTÉE COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR

YANNICK ARNOLD NOMBRE

JANVIER 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Avant tout, j'aimerais exprimer ma profonde gratitude à Lise Parent et Monique Boily, qui ont assuré ma direction de recherche et m'ont soutenu contre vents et marées au fil de ces années d'études mouvementées. À Lise, merci de m'avoir offert cette opportunité : notre première rencontre remonte à 2017, lorsque tu m'as donné ma chance pour mes projets de maîtrise. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir pris sous ton aile. Ta multidisciplinarité m'a permis d'approfondir de nombreux sujets pertinents. Je n'oublierai jamais nos sorties de terrain, à la fois très productives et riches en anecdotes que je raconte encore aujourd'hui à mes ami·e·s. Malgré les aléas de la vie, ton dévouement à la poursuite du projet est resté inébranlable.

À Monique, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour avoir également cru en moi et m'avoir accueilli à bras ouverts dans ton laboratoire. J'ai eu la chance de bénéficier de ton expertise en biologie, particulièrement en expérimentation et en développement de méthodes d'évaluation de biomarqueurs, qui ont été d'une importance cruciale pour mon apprentissage. Merci à vous deux d'avoir consacré tant de temps à mon encadrement. Je vous serai toujours reconnaissant pour les sacrifices consentis en vue de la réussite de mon projet de thèse. Votre expertise, vos conseils avisés et votre disponibilité constante ont été des éléments clés qui ont permis à ce projet d'aboutir. Vous avez su me guider avec rigueur et bienveillance, tout en me laissant l'autonomie nécessaire pour développer mes idées et approfondir mes réflexions. Merci pour votre patience face à mes interrogations et vos encouragements dans les moments de doute. Vos remarques constructives et votre regard critique ont contribué à rehausser la qualité de ce travail et m'ont aidé à progresser, tant sur le plan intellectuel que personnel.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes ayant participé à mon encadrement. Merci à François Gagné, Vani Mohi, Alain Geffard et Catherine Jumarie, qui m'ont accompagné lors des examens doctoraux. Vos perspectives et vos conseils ont enrichi mes recherches et donné une dimension plus aboutie à cette thèse. Un merci tout particulier à Catherine Jumarie pour son soutien technique, son écoute et ses conseils précieux.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude à toutes celles et ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à cette aventure intellectuelle et humaine. Ces années de recherche, ponctuées de

défis, d'apprentissages et de moments de joie, n'auraient pas été possibles sans le soutien indéfectible de ma famille, de mes amis et de mes collègues.

À ma grande famille (oncles, tantes, cousins et cousines), merci pour votre amour inconditionnel, votre patience et votre soutien indéfectible tout au long de ce parcours. Vous avez été mon pilier, ma source de motivation et mon repère lorsque la route s'assombrissait. Vos encouragements constants m'ont donné la force de persévérer, et vos paroles réconfortantes ont souvent illuminé les moments les plus difficiles. Je vous suis profondément reconnaissant d'avoir toujours cru en moi. Papa, un immense merci pour tous les sacrifices que tu as consentis afin de m'offrir la meilleure éducation possible. Tu as toujours placé l'éducation et le bien-être de tes enfants, neveux et nièces au premier plan. C'est en grande partie grâce à toi si j'en suis arrivé là aujourd'hui. Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille au Québec (tonton Martin, tanti Denise, Shae, Séré et Phil). Merci pour votre accueil chaleureux, votre ouverture d'esprit, votre soutien sous toutes ses formes, votre amour, vos conseils précieux et vos encouragements dans mes moments les plus sombres.

Mes remerciements vont également à mes amis et collègues : Yann, Marie, Anaïs, Meredith, Le Meyer, Louis-Philippe, Georges, Sarah, Coralie, Fernanda et Maxime. Votre présence et votre soutien ont été essentiels pour préserver mon équilibre et ma sérénité. Que ce soit au travers de discussions bienveillantes, de conseils judicieux ou simplement de votre capacité à me faire rire lorsque j'en avais le plus besoin, vous avez enrichi cette expérience bien au-delà de la sphère académique. Merci pour vos encouragements, votre patience face à mes absences et votre amitié sincère. Je remercie également mes collègues, passés et présents, pour leur collaboration et leur soutien tout au long de cette thèse. Vos discussions éclairantes, vos conseils avisés et votre disponibilité ont nourri ma réflexion et contribué à l'avancement de mes travaux. Travailler à vos côtés a été un privilège et une source constante d'inspiration. Merci à celles et ceux qui m'ont accompagné dans les périodes de doute et partagé avec moi des instants de joie. Je salue tout particulièrement Maxime Gauthier, ami, collègue et frère de cœur, qui a été l'un des piliers de soutien durant une grande partie de la thèse : merci pour ton écoute, ton temps, ta gentillesse et ton cœur en or.

À toutes ces personnes, qu'elles soient proches ou plus éloignées, qui ont, à leur manière, permis que ce voyage aboutisse : vos gestes, vos paroles et votre présence m'ont profondément marqué, et je vous en resterai toujours reconnaissant. Cette thèse est le fruit d'un effort collectif tout autant qu'individuel, et je suis honoré de l'avoir menée à terme grâce à vous. Enfin, merci à toutes celles

et ceux qui, dans l'ombre des institutions et parfois à des heures tardives ou très matinales, ont veillé à ce que mon espace de travail demeure propre et agréable.

Merci aux différents organismes subventionnaires, l'Université du Québec à Montréal (UQÀM) et la fondation UQÀM, à Environnement et Changement climatique Canada (Fonds pour dommages à l'environnement), le Collectif de recherche Écosanté sur les pesticides, les politiques et les alternatives (CREPPA), le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), le Centre de recherche en écotoxicologie du Québec (EcotoQ) et le Centre interdisciplinaire de recherche en opérationnalisation du développement durable (CIRODD).

DÉDICACE

J'adresse cette thèse aux trois femmes les plus inspirantes de ma vie :

À ma tante Clémentine,

À ta détermination sans faille pour la réussite de tes neveux et nièces.

À ta force inébranlable face aux épreuves de la vie.

À ta générosité qui n'a jamais connu de limites.

Tu as toute mon admiration.

À ma tante Jacqueline,

À ta vie consacrée à l'éducation et à la transmission du savoir.

À ton abnégation sans bornes pour maintenir ta famille unie.

À ta gentillesse infinie et à ta compassion.

Tu as été un modèle de dévouement.

À ma grand-mère, m'ma Thérèse,

À ta force et à ta détermination hors du commun.

À l'amour inconditionnel que tu m'as offert.

À la famille que tu as bâtie et dont je suis fier d'être un membre.

Aux innombrables sacrifices que tu as consentis pour moi.

À ton altruisme exemplaire et à ton sens inébranlable de la justice.

Je te dois la vie.

À vous trois, reposez en paix.

Avec tout mon amour,

Yannick

AVANT-PROPOS

La thèse développée dans le cadre de ce projet doctoral s'inscrit dans une collaboration étroite avec le Collectif de recherche Écosanté sur les pesticides, les politiques et les alternatives (CREPPA), un vaste programme visant à réduire l'usage des pesticides les plus nocifs pour l'environnement et la santé humaine. Ce projet cible en particulier l'écosystème du fleuve Saint-Laurent, dans l'optique de promouvoir une gestion intégrée et durable des pesticides. Par ailleurs, il ambitionne de renforcer les synergies entre les acteurs engagés dans la préservation de la qualité des eaux de ce fleuve emblématique.

Malgré les avancées notables du plan Saint-Laurent, qui a permis de diminuer les rejets toxiques liquides issus de l'industrie, les efforts entrepris pour réduire les rejets de micropolluants d'origine agro-industrielle demeurent insuffisants. Les données issues des études gouvernementales et privées révèlent chaque année une augmentation significative de la charge de pesticides dans les cours d'eau, et ce, en dépit des mesures adoptées pour limiter leur usage. L'évaluation des effets écotoxicologiques de ces substances dans l'environnement aquatique apparaît donc comme une nécessité. La problématique de la qualité et de la préservation des milieux aquatiques constitue un enjeu fondamental pour la biodiversité et les services écosystémiques qu'ils fournissent, tels que la pêche, l'approvisionnement en eau potable et les activités récréatives.

Dans le contexte actuel de la contamination du fleuve Saint-Laurent, notamment dans le tronçon situé dans la région de Montréal, il s'avère impératif de développer des approches novatrices pour évaluer et suivre à la fois la contamination et la toxicité des pesticides présents dans les cours d'eau. Ces travaux permettront de formuler des recommandations concrètes pour cibler les enjeux les plus importants de contamination par les pesticides des écosystèmes aquatiques.

Dans ce cadre, cette thèse se focalise sur l'analyse et la caractérisation des effets des principaux pesticides utilisés dans les zones d'agriculture intensive de la Montérégie, au sud de Montréal, sur la rive sud du fleuve Saint-Laurent. Ces pesticides, transportés par le ruissellement des eaux de surface, posent une menace grave pour la qualité des affluents et, par extension, pour celle du fleuve lui-même. Cette étude a pour ambition d'apporter une contribution scientifique majeure à la lutte contre la contamination des milieux aquatiques et à la sauvegarde de leurs écosystèmes.

Dans un premier temps, l'objectif a été d'identifier les pesticides les plus problématiques dans la région, puis d'étudier leurs effets précoces sur des organismes aquatiques en laboratoire. Ensuite, l'analyse s'est portée sur les réactions des organismes vivant directement dans le milieu naturel, exposés à un mélange complexe de pesticides, pour évaluer les risques qu'ils encourent dans leur habitat. Pour cela, il était essentiel de travailler avec une espèce indigène afin de ne pas perturber l'écosystème et de mieux comprendre les menaces pesant sur les espèces endémiques. Le choix s'est ainsi porté sur *Elliptio complanata*, une moule d'eau douce dont les caractéristiques biologiques et écologiques en font une excellente espèce sentinelle.

Concernant l'évaluation des effets, l'accent a été mis sur les effets précoces, mesurés via des biomarqueurs biochimiques. Ces indicateurs permettent d'identifier des perturbations au niveau infraindividuel, avant que des impacts ne se manifestent à des échelles biologiques supérieures (population, communauté, etc.). Cette approche vise à mieux comprendre l'état de santé des organismes aquatiques et à anticiper les conséquences écologiques à long terme. Enfin, des indices d'intégration des données de pesticides et de biomarqueurs ont été proposés pour l'évaluation du risque chimique associé aux pesticides, du niveaux de réponse des biomarqueurs ainsi que du risque global encouru par la moule *E. complanata* dans un environnement contaminé par ces pesticides.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
DÉDICACE	v
AVANT-PROPOS	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xvii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xix
RÉSUMÉ	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCTION	3
CHAPITRE I.....	5
1.1 Contexte théorique et état des connaissances.....	5
1.1.1 Les pesticides dans le milieu aquatique	5
1.1.2 Autres contaminants en Montérégie.....	17
1.1.3 Les moules d’eau douce (<i>Bivalvia : Unionoida</i>).....	18
1.1.4 La biosurveillance de la pollution par les pesticides au Québec	20
1.1.5 Les biomarqueurs chez les bivalves d’eau douce exposées aux pesticides et aux effluents urbains	21
1.1.6 L’intégration des données de biomarqueurs	39
1.2 Approche méthodologique	40
1.2.1 Intérêt de l’étude	40
1.2.2 Choix des biomarqueurs, pesticides et rivières	40
1.2.3 Planification	43
1.2.4 Choix du modèle biologique	43
1.2.5 Acquisition, acclimatation et dépuration des moules.....	44
1.2.6 Exposition au laboratoire	45
1.2.7 Encagement des moules sur les sites d’intérêt	45

1.2.8	Mesures et analyses.....	46
1.3	Objectifs et hypothèses	47
1.3.1	But et objectifs	47
1.3.2	Hypothèses.....	48
ANNEXES : Données sur la quantité de pesticides utilisée (1990-2022).		51
CHAPITRE II HEALTH EFFECTS OF A GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON <i>ELLIPTIO COMPLANATA</i> : MULTI-BIOMARKER APPROACH.....		59
RÉSUMÉ		60
ABSTRACT.....		61
INTRODUCTION		62
2.1	Materials and methods	65
2.1.1	Chemicals.....	65
2.1.2	Mussel's handling and exposure	66
2.1.3	Chemical analysis and sample preparation	67
2.1.4	Biomarkers assays.....	67
2.1.5	Data processing	69
2.2	Results and discussion	71
2.2.1	Exposure environment	71
2.2.2	Biomarkers responses	73
2.3	Conclusions.....	88
Appendix A Supplementary data		90
CHAPITRE III EFFECTS OF TWO INSECTICIDES AND THEIR MIXTURES WITH A GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON <i>ELLIPTIO COMPLANATA</i> : SIMULATION OF AGROECOSYSTEM MIXTURE CONCENTRATIONS		96
RÉSUMÉ		97
ABSTRACT.....		99
INTRODUCTION		101
3.1	Materials and methods	104
3.1.1	Chemicals.....	104
3.1.2	Mussel's sampling and exposure	105
3.1.3	Chemical analysis and sample preparation	106
3.1.4	Biomarkers assays.....	107
3.1.5	Threshold values definition.....	109

3.1.6	Data processing	109
3.2	Results and discussion	112
3.2.1	Pesticides concentrations	114
3.2.2	Biomarker responses	117
3.3	Conclusion	137
	Appendix A Supplementary data	139
CHAPITRE IV Ecotoxicological Effects of Agricultural Pollution on Native Mussels (<i>Elliptio complanata</i>): Insights from Integrative Biomarker Analysis.....		141
	RÉSUMÉ	142
	ABSTRACT.....	144
	INTRODUCTION	146
4.1	Materials and methods	151
4.1.1	Chemicals.....	151
4.1.2	Mussels' sampling, caging and tissue sample preparation.....	151
4.1.3	Biomarkers assays.....	154
4.1.4	Data processing	155
4.2	Results and discussion	157
4.3	Conclusion	176
	Appendix A Supplementary data	178
CHAPITRE V LE RISQUE CACHÉ DES PESTICIDES : PROPOSITION D'OUTIL DE DIAGNOSTIC DE L'ÉTAT DE SANTÉ DES AGROÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES		clxxxi
	RÉSUMÉ	182
	INTRODUCTION	184
5.1	Méthodologie	187
5.1.1	La méthode IRPRB : intégration séquentielle.....	188
5.2	Résultats et discussion	192
5.2.1	Calcul de l'Indices de risque des pesticides (IRP)	192
5.2.2	Calcul des indices des réponses de biomarqueurs (IRB)	194
5.2.3	Calcul de l'indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB)	195
5.3	Conclusion	197
	Appendix A, Matériel supplémentaire	199
CONCLUSION.....		206
6.1	Retour sur les hypothèses et les objectifs de recherche	206

6.2 Perspectives, limites et contributions scientifiques de cette étude.....	208
RÉFÉRENCES	212

LISTE DES FIGURES

- Figure 2. 1 Oxidative damages in *E. complanata* exposed to glyphosate. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in *E. complanata* digestive gland (a) and gills of females (b) and males (c) following exposure to glyphosate. The values are means $\pm$ SD (n = 12) and were compared between treatments and the control by Dunnett's test. The dash indicates a tendency and the asterisk statistically significant difference: # p < 0.1, *p < 0.05..... 75
- Figure 2. 2 Acetylcholinesterase (AChE) in *E. complanata* exposed to glyphosate. AChE activity in *E. complanata* gills (a), and foot (b). The values are mean $\pm$ SD (n = 12). The asterisks indicate statistically significant differences compared to controls by Dunnett's test: *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001. 77
- Figure 2. 3 Vitellogenin – indirectly measured by alkali-labile phosphate (ALP) technique – in *E. complanata* males' (a) and females' (b) gonads, expressed in ALP μ g/mg of protein. The values are mean + SD (n = 12). The dash indicates a tendency compared to controls by Dunnett's test: # p < 0.1. 80
- Figure 2. 4 Triglycerides concentration in the gills (a) and lipids content in females' digestive gland (b). The values are mean $\pm$ SD (n = 12). The asterisks indicate statistically significant differences compared to controls by Dunnett's test: **p < 0.01. 83
- Figure 2. 5 Principal component analysis (PC1 and 2). TBARS (thiobarbituric acid reactive substances); AChE (acetylcholinesterase activity); GST (Glutathione-S-transferase); VTG (vitellogenin content); CI (condition index; G (Gills); DG (digestive gland); G (gills); Ft (foot); Gnd (gonads); LIP (lipids); TGL (triglycerides); Prot (proteins). 85
- Figure 2. 6 Integrated biomarker responses (IBRv2). Deviation index from the control for a (50 μ g/L); b (100 μ g/L) and c (150 μ g/L). d represent the superposition of all the deviation index from the control. G_TBARS_F (females gills thiobarbituric acid reactive substances content); G_TBARS_M (males gills thiobarbituric acid reactive substances content); DG_TBARS (digestive gland thiobarbituric acid reactive substances content); G_AChE (gills acetylcholinesterase activity); Ft_AChE (foot acetylcholinesterase activity); VTG_F (female gonads vitellogenin content); G_TGL (gills triglycerides); and DG_LIP (digestive gland lipid content). The blue, green, orange, and red lines are respectively the control, 50 μ g/L, 100 μ g/L, and 150 μ g/L. 87
- Figure 3. 1 Biomarkers of *Elliptio complanata* following exposure to thiamethoxam. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a), means $\pm$ SD (n=12). Triglycerides content in males' digestive gland (b), means $\pm$ SD (n=5-9). Protein content in foot (c), means $\pm$ SD (n=12). Glutathione-S-transferase (GST) activity in the digestive gland (d), means $\pm$ SD (n=12). From significant ANOVA model, data of each group were compared with the control group by Dunnett's tests, *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001. 131
- Figure 3. 2 Biomarkers of *Elliptio complanata* following exposure to chlorantraniliprole. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a) and digestive gland (b), means $\pm$ SD (n=12). Acetylcholinesterase (AChE) activity in females' gills (c), means $\pm$ SD (n=9). From

- significant ANOVA model, data of each group were compared with the control group by Dunnett's tests, $**p < 0.01$ 132
- Figure 3. 3 Biomarkers of *Elliptio complanata* following exposure to low, medium and high mixture concentrations. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a), means $\pm$ SD (n=12). Acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills (b) and foot (c), means $\pm$ SD (n=12). Vitellogenin (VTG/ALP) content in gonads (d), means $\pm$ SD (n=12). Protein content in the gills (e) and foot (f), means $\pm$ SD (n=12). From significant ANOVA model, data of each group were compared with the control group by Dunnett's tests, # $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ 133
- Figure 3. 4 *Elliptio complanata*'s biomarker responses following exposure to thiamethoxam (THX), chlorantraniliprole (CAP), and their mixture (MIX) with glyphosate. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a) and digestive gland (b), means $\pm$ SD (n=12). Acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills (c) and foot (d), means $\pm$ SD (n=12). Vitellogenin (VTG/ALP) content in males' gonads can, means $\pm$ SD (n=12). Glutathione-S-transferase (GST) activity in the digestive gland (f), means $\pm$ SD (n=12). The biomarker responses were integrated with the laboratory threshold of each biomarker (see Materials and methods). The inhibition thresholds are represented by red lines and the induction thresholds by green lines. 134
- Figure 3. 5 *Elliptio complanata*'s biomarker responses following exposure to thiamethoxam (THX), chlorantraniliprole (CAP), and their mixture (MIX) with glyphosate. Fulton condition index (k) for mussels' general health status (a), means $\pm$ SD (n=12). Gonadosomatic index (GSI) for mussels' gonadal integrity (b), means $\pm$ SD (n=12). The biomarker responses were integrated with the laboratory threshold of each biomarker (see Materials and methods). The inhibition thresholds are represented by red lines. 135
- Figure 3. 6 *Elliptio complanata*'s biomarker responses following exposure to thiamethoxam (THX), chlorantraniliprole (CAP), and their mixture (MIX) with glyphosate. Protein content in gills (a), foot (b), gonads (c) and digestive gland (d), means $\pm$ SD (n=12). Lipid content in the gills can and digestive gland (f), means $\pm$ SD (n=12). The biomarker responses were integrated with the laboratory threshold of each biomarker (see Materials and methods). The inhibition thresholds are represented by the red lines. 136
- Figure 4. 1 Map of the study area: mussels' sampling and caging sites in Châteauguay River watershed (See also Appendix A, Fig. S1 for ropland occupation in Montérégie in general). 153
- Figure 4. 2 Des Anglais biomarkers. (A) gills' acetylcholinesterase activity (AChE), (B) gill's oxidative damages (TBARS), (C) digestive gland's glutathione-S-tranferase (GST), (D) Gonads' vitellogenin (VTG), © Gonads' proteins, (F) foot's proteins, (G) digestive lipids, and (H) total proteins in *E. complanata* exposed upstream and downstream Des Anglais River. The values are means $\pm$ SD (n=10). The data were tested by two-way and/or one-way ANOVA. Only the total protein was tested by Kruskal-Wallis' rank sum test. The letter b indicates statistically significant difference between sites. 173
- Figure 4. 3 Chateauguay River's biomarkers. (A) Gills' oxidative damages (TBARS), (B) digestive gland's lipids and (C) gonads' proteins in *E. complanata* exposed upstream and downstream Chateauguay River. The values are means $\pm$ SD (n=10). The data were tested by two-way and/or one-way ANOVA tests. The letter b indicates statistically significant difference between sites. 174

- Figure 4. 4 Starplots of IBR-T for Des Anglais River upstream (A) and downstream (B), and Chateauguay River upstream (C) and downstream (D). The thresholds are represented by the blue dotted curve and the IBR-T values are given at the top right in each figure. 175
- Figure S4. 1 Different crops representation in the Montérégie region. Data: Financière Agricole (Québec), 2018. 179
- Figure 5. 1 Représentation de l'indice de risque des pesticides (IRP) dans les rivières. Risque absent (vert) et risque majeur (rouge). 193
- Figure 5. 2 Représentation de l'indice de réponse des biomarqueurs (IRB) dans les rivières. Indice absent (vert), indice faible (jaune) et indice modéré (orange). 195
- Figure 5. 3 Représentation de l'Indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB). Risque : absent de 0-10% (gris pale), faible de 10-25% (bleu), modéré de 25-45% (jaune), majeur de 45-70% (rouge) et sévère de 70-100% (noir)..... 196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. 1 Concentrations maximales de pesticides et leurs produits de transformation mesurées en Montérégie.	9
Tableau 1. 2 Exemples d'effets de différentes classes de pesticides sur plusieurs taxons d'organismes aquatiques	14
Tableau 1. 3 Résumé des études de biomarqueurs biochimiques de pesticides sur les bivalves d'eau douce.	23
Tableau 1. 4 Les biomarqueurs physiologiques mesurés chez la moule <i>E. complanata</i> exposée à divers polluants au laboratoire et in situ	30
Table 2. 1 Nominal and measured concentrations of glyphosate and AMPA in the water used for mussels' exposure, collected from 0 h-24 h.	72
Table S2. 1 Concentrations of glyphosate, AMPA and trace metal elements in the commercial herbicide formulation Credit® Xtreme.	90
Table S2. 2 Biomarkers (means $\pm$ SD) with no statistical significance, measured in different tissues of <i>E. Complanata</i>	91
Table S2. 3 Two-way ANOVA and Kruskal-Wallis analysis results.	92
Table S2. 4 Pearson's product-moment correlation p-values corrected by Holm's method. Bold values indicate a statistical significance ranging from $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, to $p < 0.0001$	94
Table 3. 1 Nominal concentrations used in the mixture experiment.	106
Table 3. 2 Threshold and reference values of biomarkers measured on <i>Elliptio complanata</i> by tissue.	113
Table 3. 3 Degradation of pesticides over 24h: nominal and measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of thiamethoxam, chlorantraniliprole and the transformation product clothianidin, in the water used for mussels' exposure, collected from 0h-24h in the single pesticide experiment.	115
Table 3. 4 Monitoring the degradation of pesticides: nominal and measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of glyphosate, thiamethoxam, chlorantraniliprole and the transformation products AMPA and clothianidin in the mixture used for mussels' exposure, collected from 0h-24h.	116
Table S3. 1 Means $\pm$ SD of nominal and chemical concentrations ($\mu\text{g/L}$) of glyphosate, thiamethoxam, chlorantraniliprole and the main transformation products AMPA and clothianidin, in the water of the mixture experiment at T=0h each week.	139
Table S3. 2 Nominal and chemical concentrations ($\mu\text{g/L}$) of thiamethoxam and chlorantraniliprole in the water used for mussels' exposure, collected at T=0h in the single pesticide experiment.	139

Table 4. 1 Pesticides concentration (ng/L) measured in mussels from the Châteauguay River and Des Anglais River in August 2021.....	159
Table 4. 2 Reference and threshold values of biomarkers for <i>E. complanata</i> , derived from Leprêtre et al. (2022) and Catteau et al. (2023) methodologies.	170
Table S4. 1 Physicochemical parameters recorded at mussels' caging sites.	178
Tableau 5. 1 Valeur des indices de risque des pesticides (IRP), indices de réponses des biomarqueurs (IRB) et indices de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB)	193
Tableau S5. 1 Valeur de risque finale (VRF) des pesticides détectés dans les sites d'encagement.	199
Tableau S5. 2 Valeurs seuil et de référence des biomarqueurs d' <i>E. complanata</i>	202
Tableau S5. 3 Valeurs moyennes des biomarqueurs et des IBR-T pondérés.....	203

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Abréviation/Acronyme	Signification
AChE	Acétylcholinestérase
IA	Indice d'aggrégation
AMPA	Acide Aminométhylphosphonique
CCME	Conseil canadien des ministres de l'environnement
CES	Carboxylestérase
CI	Condition Index (Indice de condition)
COX	Cyclooxygenase
CTRL	Contrôle
DG	Digestive Gland (Glande digestive)
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase
EROD	Éthoxyresorufin-O-dééthylase
Ft	Foot (pied)
G	Gills (branchies)
GBH	Glyphosate-Based Herbicides (Herbicide à base de glyphosate)
GLY	Glyphosate
Gnd	Gonads (gonades)
GPx	Glutathion peroxidase
GSI	Gonadosomatic Index
GST	Glutathione-S-Transférase
IBR	Integrated Biomarker Response (Réponse intégrée des biomarqueurs)

Abréviation/Acronyme	Signification
IBRv2	Integrated Biomarker Response version 2 (Réponse intégrée des biomarqueurs v2)
IBR-T	Integrated Biomarker Response – Threshold (Réponse intégrée des biomarqueurs avec seuil)
IRB	Indice des réponses de biomarqueurs
IRP	Indice de risque des pesticides
IRPRB	Indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs
LD	Limite de détection
LIP	Lipids (Lipides)
LOD	Limit of Detection
LPO	Lipid Peroxidation (Péroxydation des lipides)
MDA	Malondialdéhyde
MELCC	Ministère de l’Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques
MELCCFP	Ministère de l’Environnement, de la Lutte contre les Changements Climatiques, de la Faune, des Forêts et des Parcs
MT	Metallothioneins (Protéines de liaison des métaux)
pH	Potentiel Hydrogène
Prot	Proteins (Protéines)
TGL	Triglycerides
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
VTG	Vitellogenin Content
WoE	Weight of Evidence (Poids de l’évidence)

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Unité de mesure	Signification
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
g	Force gravitationnelle
g/L	Gramme par litre
h	Heure
kg	Kilogramme
m	Mole
mL	Millilitre
mg	Milligramme
mg/g	Milligramme par gramme
mg/kg	Milligramme par kilogramme
mg/L	Milligramme par litre
min	Minute
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
nmol/mg	Nanomole par milligramme
ppb	Partie par milliard
ppm	Partie par million
µg	Microgramme

Unité de mesure	Signification
$\mu\text{g/g}$	Microgramme par gramme
$\mu\text{g/L}$	Microgramme par litre
$\mu\text{g/mg}$	Microgramme par milligramme
μM	Micromolaire
μm	Micromètre
$\mu\text{S/cm}$	Microsiemen par centimètre

RÉSUMÉ

Cette thèse examine l'impact de l'utilisation intensive de pesticides dans les zones agricoles de la région Montérégie (Québec) sur la moule d'eau douce *Elliptio complanata*, un organisme sentinelle endémique intéressant pour l'évaluation de la qualité de l'eau. L'étude s'inscrit dans un contexte où les apports polluants, tels que les rejets agricoles, menacent les usages de l'eau douce et les écosystèmes abritant des espèces à statut juridique particulier. Alors que les recherches antérieures se sont principalement concentrées sur la détection chimique des contaminants, cette thèse propose une approche intégrée de biosurveillance active, associant des données de contamination en pesticides aux réponses biologiques d'*E. complanata*.

Grâce à une série d'expériences en laboratoire et d'études *in situ*, ces travaux démontrent que même de faibles concentrations de glyphosate, de thiaméthoxame et de chlorantraniliprole, utilisés seuls ou en mélange, induisent chez *E. complanata* divers effets négatifs, notamment : un stress oxydatif, des dysfonctionnements neurologiques, une altération des mécanismes de détoxification, une diminution des réserves protéiques et lipidiques, ainsi qu'une perturbation de la vitellogénine, ce qui reflète un impact défavorable sur la reproduction. Deux indices intégrateurs ont permis d'évaluer de manière globale et précise, les niveaux de réponse des biomarqueurs, les gradients de pollution et le risque environnemental que la moule encourt dans les agroécosystèmes. Au-delà de l'apport théorique, l'élaboration de ces outils répond à un besoin opérationnel pour orienter les politiques de gestion en vue de soutenir la préservation de la biodiversité et des services écosystémiques de l'eau. Ce travail contribue ainsi à comprendre les réponses physiologiques d'*E. complanata* face à des changements chimiques de son habitat liés aux pesticides, à améliorer la compréhension des effets cocktails des pesticides et à proposer une méthodologie pragmatique pour estimer leurs impacts dans les tributaires agricoles du fleuve Saint-Laurent.

ABSTRACT

This thesis examines the impact of intensive pesticide use in the agricultural areas of the Montérégie region (Québec) on the freshwater mussel *Elliptio complanata*, an endemic sentinel organism of interest for water quality assessment. The study is set in a context where pollutant inputs, such as agricultural discharges, threaten both the uses of freshwater and the ecosystems hosting species with particular legal protection. While previous research has mainly focused on the chemical detection of contaminants, this thesis proposes an integrated active biomonitoring approach that combines data on pesticide contamination with the biological responses of *E. complanata*.

Through a series of laboratory experiments and *in situ* studies, this work demonstrates that even low concentrations of glyphosate, thiamethoxam, and chlorantraniliprole, whether used individually or in combination, induce various negative effects in *E. complanata*. These effects include oxidative stress, neurological dysfunction, disruption of detoxification mechanisms, depletion of protein and lipid reserves, as well as disturbances in vitellogenin, reflecting an adverse impact on reproduction. Two integrative indices enabled a comprehensive and precise evaluation of biomarker response levels, pollution gradients, and the environmental risk faced by the mussel in agroecosystems. Beyond its theoretical contribution, the development of these tools addresses an operational need to guide management policies in order to preserve biodiversity and water-related ecosystem services. This work thus helps to elucidate the physiological responses of *E. complanata* to pesticide-related chemical changes in its habitat, enhances understanding of the “cocktail effects” of pesticides, and proposes a pragmatic methodology to assess their impacts in the agricultural tributaries of the Saint Lawrence River.

INTRODUCTION

L'eau douce représente une ressource vitale pour la planète, dont la disponibilité et la qualité sont essentielles au maintien de l'équilibre des écosystèmes, à la sécurité alimentaire, au développement économique et au bien-être des populations humaines. Le Canada héberge environ 27% des réserves mondiales d'eau douce, incluant les nappes phréatiques et les glaciers (ECCC, 2013 a,b). Le Québec, à lui seul, concentre environ 3% des ressources mondiales d'eau douce renouvelable, avec une multitude de lacs, de rivières et de milieux humides. Ces écosystèmes se distinguent par leur importante biodiversité et le rôle-clé que jouent les zones humides : filtration naturelle de l'eau, atténuation des inondations et refuge pour une faune et une flore diversifiées (MELCC, 2020a).

Au Québec, l'eau douce ne fournit pas uniquement des services écosystémiques indirects; elle remplit également des fonctions directes et fondamentales pour les populations humaines et est profondément intégrée à l'identité et aux traditions de plusieurs communautés autochtones (AFAC, 2024; Wilmot, 2023). L'eau douce est enfin au cœur de plusieurs secteurs productifs tels que l'agriculture, l'élevage, l'aquaculture, la foresterie, l'industrie minière et le secteur manufacturier (Lajoie, 1999; Lapointe et al., 2015; Lasserre, 2009; Prémont et Proulx, 2020; Tourisme Québec, 2002).

Cependant, la qualité de l'eau dans les zones densément peuplées, comme la grande région de Montréal, est mise à mal par divers apports polluants. Le fleuve Saint-Laurent et ses affluents subissent, entre autres, les rejets industriels, le drainage agricole, les eaux usées non traitées et le ruissellement urbain et agricole. En Montérégie, sur la rive sud de Montréal, se concentre la majeure partie des exploitations agricoles de la province. Cette région, avec plus de 953 000 hectares de terres sur un total de 1,8 million d'hectares cultivés dans la province, est un pôle de production de cultures majeures (légumes de transformation, pommes, maïs et soja) (MAPAQ, 2014; MELCCFP, 2024). Les pesticides, omniprésents dans ces cultures, constituent la principale source de contamination diffuse de l'eau. Or, seule une fraction des pesticides appliqués cible effectivement les ravageurs et les mauvaises herbes. Le surplus, entraîné par le ruissellement, rejoint les cours d'eau, puis le fleuve Saint-Laurent. Ces contaminations généralisées ont des effets potentiels sur la santé humaine, la biodiversité et, *in fine*, sur l'ensemble des usages de l'eau dans cette région en particulier, et la grande région de Montréal.

L'impact négatif des pesticides sur l'environnement, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés de manière excessive ou inappropriée, est de mieux en mieux documenté (Bernardes et al., 2015; Tudi et al., 2021; Weiss et al., 2004). Parmi les organismes non-ciblés, mais vulnérables, les moules d'eau douce occupent une place particulière. Très diversifiées il y a encore un siècle, elles ont connu un déclin marqué, au point d'être désormais considérées comme le groupe animal le plus menacé d'Amérique du Nord. Certaines espèces figurent sur la liste des espèces en péril, d'autres sont qualifiées comme étant préoccupantes (Martel et al., 2010). Pourtant, ces bivalves jouent un rôle essentiel dans le maintien de la qualité des écosystèmes aquatiques, notamment grâce à leur capacité de filtration qui contribue à l'épuration naturelle de l'eau, à la réduction des coliformes, des bactéries et d'autres contaminants, y compris certains produits chimiques. Leur position sédentaire et leur rôle de filtreur font néanmoins de ces mollusques des organismes particulièrement sensibles à la pollution diffuse, dont l'origine agricole est souvent prédominante, comme le démontrent les déclins observés dans les bassins versants à forte croissance démographique et agricole au Québec (Martel et al., 2010; Paquet et al., 2005).

À ce jour, les études réalisées en Montérégie se sont principalement focalisées sur la caractérisation chimique des contaminants. Aucun programme de biosurveillance active n'y a véritablement été mené pour évaluer l'impact des pesticides sur la faune aquatique, et en particulier sur les moules d'eau douce. De plus, les gestionnaires environnementaux manquent d'outils permettant d'intégrer les données de contamination en pesticides avec les réponses biologiques potentiels des espèces sentinelles, afin de soutenir des prises de décision éclairées visant à protéger la biodiversité et la qualité de l'eau.

Dans cette perspective, la présente thèse propose le développement d'outils simples et opérationnels pour l'évaluation du risque sur l'état de santé de la moule *Elliptio complanata*, une espèce indigène du Québec, largement présente dans les cours d'eau de la Montérégie. En s'appuyant sur une approche intégrée, fondée sur l'utilisation de biomarqueurs biochimiques et physiologiques, cette étude vise à lier le degré de contamination par les pesticides dans l'habitat à la santé des organismes qui y vivent. En plus de l'avancée des connaissances en écophysiologie et de l'extension des données sur les impacts des pesticides problématiques sur *E. complanata*, cette recherche contribuera à la conception d'un outil d'aide à la décision environnementale afin de limiter l'utilisation des pesticides les plus néfastes dans les tributaires agricoles du tronçon montréalais du fleuve Saint-Laurent. Ultimement, cet outil permettra de protéger tant la biodiversité que les services écosystémiques de l'eau dans la grande région montréalaise.

CHAPITRE I

1.1 Contexte théorique et état des connaissances

Les pesticides ont apporté des bénéfices en agriculture soit dans la lutte contre les maladies et les ravageurs des cultures ou dans l'élimination de la compétition. Sans pesticides, jusqu'à 70 % des rendements agricoles mondiaux pourraient être perdus, alors que leur utilisation accroît la productivité d'environ 50 % avec les herbicides et de 17 % avec les insecticides et fongicides (Virk et al., 2024). Toutefois, de plus en plus d'évidences de leurs effets délétères sur des organismes non-ciblés ont été rapportées dans des études scientifiques ou dans des suivis gouvernementaux. Les organismes aquatiques, tout autant que les organismes terrestres, sont concernés par ce risque. En milieu aquatique, les paramètres de mesure utilisés pour les tests de toxicités des pesticides s'étendent du niveau populationnel à l'échelle biochimique en passant par l'individu. Comme exemples de paramètres de mesure, on peut citer la reproduction, la croissance de la population ou de l'individu, le développement, les biomarqueurs biochimiques, etc. Les mesures des biomarqueurs chez la moule *E. complanata* seront l'objet principal de ce projet.

1.1.1 Les pesticides dans le milieu aquatique

Les pesticides sont largement utilisés dans divers secteurs tels que l'agriculture, la gestion parasitaire, l'horticulture ornementale, l'aménagement paysager et la santé publique. Ils sont classés en plusieurs catégories selon leur usage, notamment les insecticides, les acaricides, les herbicides, les rodenticides, les nématicides et les fongicides. Bien qu'utiles, il est crucial de considérer que les pesticides peuvent également nuire aux organismes non visés et présenter des risques pour la santé humaine et l'environnement, particulièrement en cas de mauvaise utilisation ou d'application excessive (Bernardes et al., 2015; Tudi et al., 2021; Weiss, et al., 2004).

L'utilisation des pesticides dans le monde suit une tendance croissante depuis les années 1990 jusqu'à ce jour (FAO, 2024). À l'instar du continent américain qui est le premier utilisateur de pesticides dans le monde devant l'Asie, le Canada ne fait pas exception à cette tendance. Effectivement, le Canada occupe la quatrième place sur le continent en matière d'utilisation de ces substances (FAO, 2024)¹. Les pesticides homologués au Canada le sont par conséquent dans toutes les provinces du pays à moins qu'il y ait des

¹ Voir les Annexes A, B, C et D.

dispositions réglementaires plus strictes restreignant ou interdisant l'utilisation de certains d'entre eux. Selon le ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques du Québec (MELCC, 2018), plus de 7 600 pesticides sont homologués dans le pays, bien que de nombreux composés, nouveaux ou anciens, soient régulièrement évalués pour leur homologation, retrait ou interdiction.

Au Québec, la vente d'ingrédients actifs a dépassé les 5 millions de kilogrammes à partir de 2021. Ces produits sont majoritairement destinés à l'agriculture, avec 77 % des ventes totales dont 65% d'herbicides (FAO, 2024 ; MELCCFP, 2024). Les herbicides fréquemment utilisés sont entre autres le glyphosate, le *S*-métolachlore et le 2,4-D. Ils sont surtout appliqués dans les champs de maïs et de soya, omniprésents au Québec et représentant plus de 40% des cultures de la province soit 825 700 ha de surfaces cultivées (Giroux, 2019, 2022 ; MELCCFP, 2024). Parmi ces pesticides, l'utilisation des herbicides à base de glyphosate (HBG) reste encore la plus importante depuis plus d'une décennie. Les HBG sont parfois accompagnés d'une utilisation du *S*-métolachlore et de l'atrazine afin de limiter le développement d'une résistance. Ils sont soit utilisés séparément, c'est-à-dire différentes formulations, soit en combinaison, c'est-à-dire une seule formulation contenant plusieurs ingrédients actifs (a.i.) (par exemple, *PRIMEXTRA II MAGNUM* est le nom commercial d'une formulation contenant du *S*-métolachlore et de l'atrazine) (Giroux, 2019). En plus d'être très utilisés pour les cultures de maïs et de soya, ces herbicides le sont aussi dans le domaine des maraîchers et des vergers. Des fongicides sont également utilisés dans les champs de céréales (incluant le maïs) et de soya, mais ils représentent une minorité des ventes totales de pesticides (MELCCFP, 2024) et sont très peu détectés dans l'environnement comparativement aux autres groupes de pesticides.

Depuis 2008, les insecticides utilisés au Québec pour le traitement des semences ou l'application foliaire incluent le chlorpyrifos et divers néonicotinoïdes (clothianidine, thiaméthoxame, imidaclopride), auxquels se sont récemment ajoutés le chlorantraniliprole et le cyantraniliprole (Giroux, 2019). Avant 2018, la réglementation québécoise ne régissait pas entièrement la vente et l'utilisation de ces pesticides (Giroux, 2019). Hormis l'enrobage des semences, chaque agriculteur était donc libre d'utiliser la quantité d'insecticides qu'il jugeait nécessaire. De plus, ces produits étaient employés pour la majorité des cultures prédominantes. Bien qu'en 2018, de nouvelles règles aient instauré une exigence de prescription (par un agronome) pour leur acquisition entraînant une baisse de leurs ventes à partir de 2019, elles demeurent problématiques dans de nombreux cours d'eau de la province (Feng et al., 2024 ; Giroux, 2022 ; Gouvernement du Québec, 2024).

Au Québec, les surfaces cultivées représentent plus de 1 805 207 hectares et se concentrent principalement dans le sud de la province, plus précisément dans la région de la Montérégie (MELCCFP, 2024). Cette

région compte près du quart des fermes québécoises avec plus de 953 000 hectares d'exploitation (dont 60% en culture) (MAPAQ, 2014). De nombreux pesticides sont employés de façon intensive dans les grandes cultures de la Montérégie, mais selon Bernardes et al. (2015) seule une fraction cible efficacement les insectes ravageurs et les mauvaises herbes.

Le problème qui se pose est le cheminement de toute cette quantité de pesticides après leur utilisation. Selon Pimentel (1995), la majeure partie des pesticides se retrouvent dans plusieurs compartiments de l'environnement, tels que l'eau, l'air, le sol et dans les organismes vivants. La contamination de l'air peut s'observer pendant et après l'épandage où des particules de pesticides sont envoyées directement dans l'atmosphère soit par volatilisation ou par le concours du vent entraînant la poussière superficielle, les particules en suspensions ou balayant la surface du sol et du feuillage des plantes (de Souza et al., 2020 ; Limay-Rios et al., 2016 ; Van Der Werf, 1997). Des résidus ont ainsi été détectés dans des zones où ces produits ne sont pas employés, par exemple à 2 km et 32 km du point d'utilisation respectivement pour les épandages au sol et par avion (Pimentel, 1995). Outre l'épandage direct, d'autres mécanismes (dépôts via précipitations ou brouillard, drainage, lixiviation, infiltration, ruissellement) contribuent à la contamination des compartiments environnementaux (de Souza et al., 2020; Pimentel, 1995; Van Der Werf, 1997). Notamment, des pesticides ont pu être détectés dans le brouillard océanique, l'océan Atlantique, les eaux continentales de surface et souterraines et même dans la neige arctique (Giroux et al., 2010 ; Giroux 2014 ; Pimentel, 1995).

La volatilisation est une forme de perte des pesticides au champ, mais elle peut être aussi considérée comme un moyen de dissémination des pesticides dans l'environnement et dépend intimement de la pression de vapeur et de la constante de Henry de la matière active du pesticide (Schrack et al., 2009; Van Der Werf, 1997). La persistance d'un pesticide dans l'environnement dépend de ses caractéristiques physico-chimiques, notamment de son affinité pour les colloïdes du sol (déterminée par le coefficient de partage carbone organique-eau) et de sa sensibilité à la dégradation (chimique et biologique), elle-même liée à la demi-vie et à l'adsorption à la matière organique (Schrack et al., 2009; Van Der Werf, 1997).

L'accumulation de la matière active des pesticides dans les compartiments environnementaux peut, avec le temps, générer des sous-produits parfois plus toxiques et très persistants dans l'eau (Schrack et al., 2009). Par conséquent, les cours d'eau et les milieux humides se retrouvent contaminés à la fois par les matières actives et leurs produits de transformation. Ainsi, Feng et al. (2024) et Giroux (2022, 2019) rapportent que ces produits de transformation sont détectés très fréquemment, parfois en proportions comparables à celles de la molécule active (**Tableau 1.1**). Il convient aussi de noter la présence potentielle des co-formulants,

car les pesticides agricoles sont généralement utilisés en formulations associant plusieurs molécules. Par conséquent, les organismes présents dans ces milieux subissent une exposition multiple incluant les molécules actives, les adjuvants et les produits de transformation.

En Montérégie, une partie des pesticides employés s'écoule vers les rivières tributaires du Saint-Laurent, menaçant ainsi les habitats essentiels et les espèces incluant celles à statut juridique particulier. Cette contamination compromet également les services écosystémiques, notamment l'approvisionnement en eau. Pour préserver la biodiversité et les usages de l'eau dans la région et au sud de Montréal, il est donc crucial d'évaluer et de protéger les milieux aquatiques. Plusieurs études gouvernementales et initiatives privées ont été menées pour suivre les pesticides dans le fleuve Saint-Laurent et certains de ses tributaires, révélant de nombreux dépassements des critères de qualité pour la vie aquatique (Feng et al., 2024; Giroux, 2022, 2019; Montiel-León et al., 2019). Des mesures récentes de Giroux (2022, 2019) et Feng et al. (2024) effectuées dans le fleuve Saint-Laurent et dans plusieurs rivières montréalaises ont notamment mis en évidence des concentrations supérieures aux critères de qualité pour la vie aquatique chronique (CVAC) et, dans certains cas, aiguë (CVAA) pour un grand nombre des principaux pesticides analysés (**Tableau 1.1**).

Suite tableau 1.1

	Giroux (2022)						Feng et al. (2024)	
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2019	2021
Insecticides	(µg/L)							
Chlorantraniliprole	0,39	0,22	0,42	0,15	0,94	0,25	0,04	0,1
Thiaméthoxame	4,5	0,69	0,86	0,65	0,66	0,28	0,5	0,09
Clothianidine	0,52	0,34	0,51	0,17	0,052	0,042	0,3	0,04
Imidaclopride	-	-	0,23	0,37	0,097	0,078	0,2	0,2
Cyantraniliprole	-	-	0,10	0,32	0,41	0,22	-	-
<i>Imidaclopride-guanidine</i>	-	-	< LD	0,017	0,006	0,01	-	-
<i>Desnitro-imidacloprid</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,01
Diméthoate	0,32	< LD	0,11	0,27	1,2	0,19	-	
Flonicamid	-	-	-	-	-	-	0,02	0,005
Thiaclopride	-	-	0,025	0,028	0,013	0,005	0,001	
Carbaryl	0,12	0,41	0,19	< LD	0,18	0,48	-	0,002
Dinotefuran	-	-	-	-	-	-	-	0,0003
Flupyradifurone	-	-	0,016	0,006	0,008	0,015	-	-
Acétamipride	-	-	< LD	0,006	0,021	0,033	0,005	0,001
Diazinon	0,05	< LD	0,01	< LD	< LD	0,23	-	-
Malathion	5,5	< LD	0,04	0,04	< LD	0,05	-	-
Nitenpyram	-	-	-	-	-	-	0,0002	0,0002
Chlorpyrifos	0,27	0,06	< LD	0,04	< LD	< LD	0,006	0,001
λ-Cyhalothrine	< LD	< LD	< LD	0,02	< LD	< LD	-	-
1-Naphtol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,04	-	-
Parathion-méthyl	0,08	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	-	-
Propoxur	< LD	< LD	0,06	< LD	< LD	< LD		
Perméthrine	1,1	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	-	-

Suite tableau 1.1

	Giroux (2022)						Feng et al. (2024)	
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2019	2021
Fongicides	(µg/L)							
Azoxystrobine	0,007	-	0,12	0,26	0,054	0,041	0,02	0,19
Boscalide	0,98	0,40	0,77	0,22	0,36	0,14	-	-
Pyriméthanol	-	-	0,025	0,04	0,28	0,25	0,001	0,12
<i>Hydroxychlorothalonil</i>	-	-	-	-	0,13	0,35	-	-
Fénamidone			0,008	< LD	0,002	0,005	-	-
Métalaxyl	0,06	0,98	0,05	< LD	< LD	0,22	-	-
Dimétomorphe	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,40	-	-
Trifloxystrobine	-	0,06	-	< LD	< LD	< LD	-	-
Propiconazole	-	-	-	-	-	-	0,01	0,03
Fluxapyroxad	-	-	-	-	-	-	0,004	0,02
Tebuconazole	-	-	-	-	-	-	0,007	0,08
Carbendazime	-	-	-	-	-	-	0,008	0,02
Metconazole	-	-	-	-	-	-	0,001	0,0002
Fluazinam	-	-	-	-	-	-	0,0002	0,002
Chlorothalonil	-	-	-	-	-	-	0,001	-

- : non analysé; LD : limite de détection; italique : produit de transformation; gras : valeur dépassant le CVAC

Plusieurs études en écotoxicologie aquatique rapportent les effets des pesticides sur des organismes de niveaux trophiques majeurs distincts, allant des microorganismes aux vertébrés, en passant par les crustacés, les mollusques et les poissons (Du et al., 2023 ; Gauthier et al., 2023 ; Huong et al., 2024 ; Jeninga et al., 2023).

Selon certains auteurs, les microorganismes, à la base de la chaîne trophique, sont considérablement affectés par les pesticides et cela pourrait se répercuter sur de plus hauts niveaux de cette chaîne (DeLorenzo et al., 2001 ; Ukhurebor et al., 2021). Les microorganismes sont capables de métaboliser ou de bioaccumuler les pesticides. DeLorenzo et al. (2001) rapportent également qu'une grande variété de pesticides interfèrent avec plusieurs fonctions biologiques des microorganismes : la respiration ou la production d'énergie, la photosynthèse, la croissance et la composition moléculaire des cellules.

Chez les mollusques, par exemple, la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*), l'huître creuse du Pacifique (*Crassostrea gigas*) ou l'escargot d'eau douce (*Lymnaea stagnalis*), les pesticides provoquent entre autres, des mortalités, des inhibitions enzymatiques, du stress et des dommages oxydatifs ainsi que des perturbations de la croissance, des mécanismes immunitaires et reproductifs (Flynn et al., 2013 ; Huong et al., 2024 ; Matozzo et al., 2019 ; Schleicherová et al., 2024 ; Stara et al., 2020 ; Séguin et al., 2017). Le **Tableau 1.2** fourni des exemples d'effets causés par différents pesticides sur différents taxons d'organismes aquatiques.

Tableau 1. 2 Exemples d'effets de différentes classes de pesticides sur plusieurs taxons d'organismes aquatiques

Taxons	Espèces	Effets	Pesticides	Références
Microalgues	<i>Chaetoceros neogracile</i> , <i>Micromonas bravo</i> , <i>Micromonas polaris</i> , <i>Chaetoceros neogracilis</i> ,	Photosynthèse, croissance	Atrazine et simazine	Du et al. (2023)
	<i>Tisochrysis lutea</i> , <i>Skeletonema marinoi</i>	Croissance	Diuron, isoproturon, métazachlore, S-métolachlore; chlorpyriphos-méthyl, azoxystrobine, spiromaxime, quinoxifène, krésoxim-méthyl	Dupraz et al. (2019)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Croissance, photosynthèse, teneur en pigments, stress oxydatif et morphologie	Fomesafen	Naoum et al. (2023)
Plantes vasculaires aquatiques	<i>Spirodela polyrhiza</i> , <i>Lemna minor</i>	Photosystème II, dommage oxydatif, transfert d'électron entre photosystèmes	Atrazine, glyphosate, S-métolachlore	Cruz et al. (2024)
	<i>Lemna minor</i>	Stress oxydatif	Glyphosate	Gomes et Juneau (2016)

Suite Tableau 1.2

Taxons	Espèces	Effets	Pesticides	Références
Crustacées	<i>Daphnia magna</i>	Mortalité, immobilisation	Chlorpyrifos, cyperméthrine, glyphosate	Demetrio et al. (2014)
	<i>Daphnia magna</i>	Reproduction	Chlorpyrifos	Palma et al. (2009)
	<i>Gammarus fossarum</i>	Reproduction, développement	Méthoprene, glyphosate	Gauthier et al. (2023)
	<i>Tubuca urvillei</i>	Comportement, neurotoxicité, métabolisme, dommage oxydatif	dimethoate	L'Honoré et al. (2024)
Mollusques	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Histopathologie, mortalité, stress oxydatif, immunité	Thiaclopride,	Stara et al. (2020)
	<i>Crassostrea gigas</i>	Reproduction, croissance	Glyphosate	Séguin et al. (2017)
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Immunité	Glyphosate	Matozzo et al. (2019)
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Croissance, reproduction, dommage génomique	Glyphosate	Schleicherová et al. (2024)
	<i>Elliptio complanata</i>	Comportement	Atrazine	Flynn et al. (2013)
	<i>Crassostrea gigas</i>	Survie, développement	DDT	Huong et al. (2024)

Suite Tableau 1.2

Taxons	Espèces	Effets	Pesticides	Références
Poissons	<i>Danio rerio</i>	Reproduction, développement, comportement, stress oxydatif, génotoxicité	Fluxapyroxade	Lin et al. (2021)
	<i>Danio rerio</i>	Immunité, stress oxydatif, survie, croissance, battement cardiaque, comportement	Pyrazosulfuron-ethyl	Zhang et al. (2022)
	<i>Danio rerio</i>	Reproduction, développement, comportement, battement cardiaque, morphologie, neurotoxicité, génotoxicité	Atrazine	Liu et al. (2016)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Histopathologie	Carbosulfan, propinèbe, bénomyl	Capkin et al. (2010)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Reproduction, fonctions hémato-immunologiques, métabolisme énergétique, stress oxydatif	Glyphosate	Du-Carrée et al. (2021)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Morphologie, histopathologie, stress oxydatif	Atrazine	Chromcová et al. (2013)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Reproduction	Chlorpyrifos, cyperméthrine	Yancheva et al. (2022)
	<i>Pimephales promelas</i>	Comportement, croissance, reproduction, survie	Imidaclopride, thiaméthoxame	Jeninga et al. (2023)

1.1.2 Autres contaminants en Montérégie

En Montérégie, et plus précisément dans le bassin versant de la rivière Châteauguay, Simoneau (2007) a dressé un état des lieux de la contamination métallique. Des métaux ont été détectés dans l'eau, les sédiments et la biote, le mercure dans la chair des poissons constituant le signal le plus préoccupant : des concentrations dépassant fréquemment le critère de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Santé Canada) ont été observées, surtout chez les individus de plus grande taille (Simoneau, 2007). Ces observations proviennent toutefois principalement de campagnes menées entre les années 1980 et 2000.

Des enquêtes plus récentes (2008–2011) menées par Duchemin et Hébert (2014) ont porté sur 21 métaux à l'embouchure des principaux bassins versants tributaires du fleuve Saint-Laurent. À l'embouchure de la rivière Châteauguay, les analyses ont montré une présence modérée en métaux : les concentrations mesurées des formes dissoutes se situaient largement en dessous des critères de qualité basés sur des critères de qualité pour la vie aquatique chronique.² Les formes dissoutes étant généralement les plus préoccupantes pour la biodiversité, il est notable que, pour certains éléments, les fractions particulières prédominaient ; cela réduit leur biodisponibilité immédiate et, par conséquent, leur toxicité potentielle. Ces résultats suggèrent une influence anthropique limitée sur la contamination métallique du bassin, avec une contribution géologique modérée, typique des régions agricoles ou semi-urbaines. En conclusion, la qualité de l'eau de la rivière Châteauguay, au regard des métaux, apparaissait globalement satisfaisante durant la période étudiée et ne présentait pas de signes de contamination préoccupante au regard des critères environnementaux en vigueur (Duchemin et Hébert, 2014).

La contamination par les nutriments — nitrates, azote ammoniacal et phosphore total — demeure une préoccupation persistante dans le bassin versant de la rivière Châteauguay, en grande partie liée aux activités agricoles intensives. Les données historiques (2003–2016 ; Données Québec, s.d.) indiquent que les concentrations d'ammoniac et de nitrates dans la rivière Châteauguay et la rivière des Anglais se situent très souvent en deçà des critères de qualité pour la protection des organismes aquatiques (ammoniac : $0,02\text{--}1,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; nitrates : $3\text{--}13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ à pH 7 et 20°C) (CCME, 2010, 2012 ; EPA, 2013). En revanche, le phosphore total dépasse occasionnellement les seuils visant à prévenir l'eutrophisation (MELCC, 2019) : certains affluents agricoles, comme le ruisseau Norton, peuvent présenter des valeurs élevées (par exemple

² Concentrations des formes dissoutes des métaux détectés : Ag = $0,001 \text{ } \mu\text{g/L}$; Al = $23 \text{ } \mu\text{g/L}$; As = $0,44 \text{ } \mu\text{g/L}$; Ba = $26 \text{ } \mu\text{g/L}$; B = $17 \text{ } \mu\text{g/L}$; Be = $0,004 \text{ } \mu\text{g/L}$; Cd = $0,006 \text{ } \mu\text{g/L}$; Co = $0,12 \text{ } \mu\text{g/L}$; Cr = $0,13 \text{ } \mu\text{g/L}$; Cu = $1 \text{ } \mu\text{g/L}$; Fe = $120 \text{ } \mu\text{g/L}$; Mn = $23 \text{ } \mu\text{g/L}$; Mo = $0,59 \text{ } \mu\text{g/L}$; Ni = $0,49 \text{ } \mu\text{g/L}$; Pb = $0,12 \text{ } \mu\text{g/L}$; Sb = $0,058 \text{ } \mu\text{g/L}$; Sr = $130 \text{ } \mu\text{g/L}$; U = $0,31 \text{ } \mu\text{g/L}$; V = $0,8 \text{ } \mu\text{g/L}$ et Zn = $0,5 \text{ } \mu\text{g/L}$.

jusqu'à $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Les apports proviennent principalement de l'épandage d'engrais organiques et minéraux, des effluents agricoles et des eaux usées insuffisamment traitées. Les zones à faible courant favorisent la stagnation et l'eutrophisation localisée, caractérisée par une prolifération algale, une diminution de l'oxygène dissous et une altération des communautés aquatiques. L'azote ammoniacal, bien que le plus souvent en dessous des seuils de toxicité, constitue néanmoins un risque lorsque ses concentrations s'accumulent dans ces zones stagnantes.

Par ailleurs, d'autres contaminants organiques d'origine urbaine et industrielle, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les biphényles polychlorés (BPC) et divers phtalates, sont également présents dans les eaux de surface de la région. Ces composés, fortement hydrophobes, s'accumulent principalement dans les sédiments en raison de leur affinité pour la matière organique particulaire (Simoneau, 2007). Les stations d'épuration municipales éliminent partiellement ces substances ; les composés hydrophobes sont souvent adsorbés sur les particules et transférés vers les boues plutôt qu'éliminés complètement, tandis qu'une fraction dissoute peut subsister dans l'effluent (Pham et Proulx, 1997).

1.1.3 Les moules d'eau douce (*Bivalvia* : *Unionoida*)

Les moules d'eau douce appartiennent principalement aux familles des Unionidés et des Margaritiféridés. Ces bivalves endémiques des milieux d'eau douce se trouvent généralement dans des substrats sableux ou graveleux (Paquet et al., 2018). Leur organisme comprend une partie rigide constituée de deux coquilles protectrices et une partie molle interne, composée principalement de cinq organes majeurs (le manteau, le pied, les branchies, les gonades et la glande digestive), ainsi que d'autres tissus moins représentés (Haag, 2012). Contrairement aux bivalves marins, qui s'enfoncent profondément dans les sédiments, les bivalves d'eau douce ne s'enfoncent que légèrement dans le substrat, où ils filtrent leur nourriture (Flynn et al., 2013; Haag, 2012). Leur diversité mondiale est remarquable, avec environ 800 à 1000 espèces répertoriées. Près de 300 d'entre elles se trouvent en Amérique du Nord, une région considérée comme un point chaud de biodiversité pour l'ordre Unionoida. Toutefois, environ 70 % de ces espèces nord-américaines sont actuellement menacées (Martel et al., 2010 ; Paquet et al., 2005). Au Québec, 23 espèces indigènes ont été recensées, dont 8 sont considérées vulnérables ou menacées, notamment *Anodonta implicata* (l'Anodonte du gaspareau), classée en situation critique (Paquet et al., 2018; Gouvernement du Québec, 2021). Certaines espèces, comme *Alasmodonta heterodon*, ont même disparu du Canada, illustrant la vulnérabilité des populations de moules aux perturbations anthropiques (Martel et al., 2010).

Les moules habitent principalement le fond des rivières, lacs et estuaires et, bien que peu étudiées, ces organismes benthiques jouent un rôle écologique clé dans les écosystèmes aquatiques (Paquet et al., 2018). En effet, les moules d'eau douce remplissent des fonctions écologiques essentielles en limitant l'eutrophisation des lacs, favorisant le transfert de nutriment dans la chaîne alimentaire et offrant des habitats à diverses espèces aquatiques. En tant qu'organismes filtreurs, elles participent activement à l'épuration de l'eau en éliminant les particules en suspension, incluant les champignons, les matières organiques, la biocénose planctonique et les microorganismes, contribuant ainsi à l'amélioration de la qualité de l'eau (Bärlocher et Brendelberger, 2004 ; Martel et al., 2010 ; Paquet et al., 2005 ; Vaughn et al., 2008). Un individu adulte peut filtrer plusieurs litres d'eau par jour, influençant directement les propriétés chimiques et biologiques des écosystèmes. Cette filtration joue un rôle encore plus crucial dans les habitats où les moules se trouvent en grande densité. Par exemple, les espèces comme *E. complanata* peuvent atteindre jusqu'à 150 individus par m² (Bärlocher et Brendelberger, 2004). En plus d'améliorer la qualité de l'eau, les moules influencent la dynamique des nutriments et jouent un rôle clé dans le maintien des écosystèmes aquatiques. Leur bio-déposition enrichit les sédiments en nutriments essentiels, ce qui augmente la productivité des écosystèmes (Martel et al., 2010 ; Paquet et al., 2005). Qu'elles soient vivantes ou non, leurs coquilles modifient la structure benthique en fournissant des substrats pour la fraie de certains poissons et des habitats favorables à d'autres espèces benthiques. De plus, leurs déplacements dans les sédiments améliorent leur oxygénation, contribuant ainsi à la stabilité des écosystèmes (Paquet et al., 2005).

Malgré leur importance écologique, les populations de moules d'eau douce sont fortement menacées par divers facteurs anthropiques et environnementaux. La disparition des moules entraînerait une perte importante de biodiversité et pourrait modifier profondément la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, vue leur rôle clé dans la dynamique de ces derniers (Martel et al., 2010; Ricciardi et al., 1998). Ces menaces à la survie des moules telles que la fragmentation des cours d'eau par l'urbanisation et les barrages perturbent la dispersion des poissons hôtes, indispensables à leur reproduction et dissémination (Martel et al., 2010). La sédimentation excessive, la pollution et les espèces envahissantes (moules zébrées et quaggas) accentuent leur déclin, pouvant anéantir des populations indigènes en quelques années (Martel et al., 2010; Ricciardi et al., 1998). Les changements climatiques (sécheresses, fluctuations extrêmes du niveau d'eau) et les effluents municipaux (nutriments, métaux lourds, pesticides) aggravent encore la situation, entraînant respectivement des mortalités massives et des effets sur leur croissance, survie, immunité, métabolisme et capacité de filtration (Douville et al., 2009 ; Gagné et al., 2018 ; Gendron et al., 2023 ; Nobles et Zhang, 2015, Paquet et al., 2005, 2018).

Parmi tous ces facteurs anthropiques, la pollution pourrait créer un véritable cercle vicieux de dégradation de la qualité de l'eau. Les moules, grâce à leur sédentarité et leur remarquable capacité de filtration, jouent un rôle essentiel dans l'amélioration de cette qualité. Cependant, les polluants ont des effets délétères sur leur santé, réduisant leur efficacité dans l'épuration de l'eau. Cette diminution entraînerait une dégradation accrue de la qualité de l'eau, ce qui accélérerait à son tour le déclin des populations de moules. Ainsi, ce cercle vicieux s'amplifie et aggrave la situation. Par ailleurs, la sensibilité à la pollution et la sédentarité font des moules des sentinelles intéressantes pour une surveillance efficace des impacts anthropiques sur les écosystèmes aquatiques.

1.1.4 La biosurveillance de la pollution par les pesticides au Québec

Les dépassements de critères de vie aquatique chronique (CVAC) des pesticides, signalés par des études de suivi antérieures, suggèrent des risques sous-létaux pour les organismes aquatiques exposés (Feng et al., 2024). Cependant, les effets des pesticides sur ces organismes dépendent de leur toxicocinétique, bien que cette dernière ne permette pas d'évaluer précisément les effets biologiques des composés biodisponibles (Amiard et Amiard-Triquet, 2017). Cette limitation est particulièrement marquée pour les composés faiblement bioaccumulables. Au Québec, en complément des mesures chimiques des pesticides dans les milieux, des programmes de surveillance de la santé des écosystèmes aquatiques, comme RSBenthos et SurVol Benthos, sont mis en œuvre. Ces initiatives de biosurveillance reposent sur divers outils de diagnostic et indices, tels que la santé du benthos, l'intégrité biotique, la qualité globale de l'eau, la qualité bactériologique et physicochimique, ainsi que l'état des bandes riveraines. Bien qu'elles soulignent l'importance d'une approche intégrée, combinant chimie, biologie et gestion écologique pour préserver les milieux aquatiques, ces démarches permettent souvent de constater les faits accomplis, lorsqu'il y a par exemple déclin d'une population benthique. En effet, elles ne permettent pas de détecter précisément les effets écotoxicologiques précoces des mélanges complexes de pesticides sur les organismes. Pour pallier cela, la biosurveillance active par biomarqueurs biochimiques et physiologiques a prouvé être une des alternatives très intéressante en Europe (Amiard et Amiard-Triquet, 2017).

Les biomarqueurs sont des réponses biologiques à un xénobiotique (pesticides dans le cas présent) à différentes échelles organisationnelles du vivant (molécule, cellule, individu, communauté...) et peuvent être mesurées et reproduites avec une certaine précision, d'où la définition selon laquelle « un biomarqueur est un changement observable ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant... » (Lagadic et al., 1997). L'utilisation des biomarqueurs est l'une des

méthodes utilisées en toxicologie pour traduire directement l'effet d'un pesticide donné sur un organisme (WHO, 1993).

Ces biomarqueurs, capables de mettre en évidence l'impact individuel ou combiné des contaminants, représentent l'une des premières alertes signalant une potentielle dégradation de la santé de l'écosystème (Milinkovitch et al., 2019), d'où la notion d'effets écotoxicologiques précoces. Bien que des études de biosurveillance active aient déjà évalué l'effet des rejets urbains sur divers organismes aquatiques (Gagné et al., 2011a,b, 2007, 2004, 2001a,b ; Gagnon et al., 2006), elles demeurent plus rares dans les milieux fortement influencés par la pollution agricole. Certaines études sont faites dans des milieux influencés par les rejets agricoles (saisonniers) et urbains (ponctuels) simultanément (Gagné et al., 2018). La moule d'eau douce *E. complanata* est fréquemment utilisée comme organisme sentinelle dans ces études. Les biomarqueurs mesurés dans ces recherches proviennent presque exclusivement de l'hémolymphe de la moule. Parmi les biomarqueurs étudiés, on retrouve le nombre d'hémocytes, leur viabilité, leur capacité de phagocytose, ainsi que la production d'oxyde nitrique (NO), de lysozyme (LY), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), la teneur en thiol, les dommages à l'ADN, l'activité de la cyclooxygénase (COX) et de l'activité de la glutathion S-transférase (GST). D'autres biomarqueurs, tels que la liaison de l'œstradiol aux protéines cytosoliques et la capacité d'induction de la vitelline, sont également mesurés (Gagné et al., 2018, 2001 ; Gendron et al., 2023). Par ailleurs, de nombreux autres biomarqueurs, étudiés dans différents organes de divers bivalves, ont fait l'objet de multiples recherches écotoxicologiques et restent tout aussi pertinents pour la biosurveillance de la contamination par les pesticides au Québec.

1.1.5 Les biomarqueurs chez les bivalves d'eau douce exposées aux pesticides et aux effluents urbains

Plusieurs processus biochimiques et physiologiques contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme et peuvent être altérés par les xénobiotiques, ce qui se traduit par des modifications de biomarqueurs. Chez les bivalves, certains jouent un rôle spécifique dans la limitation de la toxicité ou la détoxification des contaminants, tels le cytochrome P4501A (P450) et la métallothionéine (MT). L'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) constitue pour sa part un indicateur majeur de neurotoxicité, tandis que la détection d'adduits d'ADN renseigne sur la présence de dommages au matériel génétique (Lagadic et al., 1997).

Dans différentes études portant sur divers bivalves d'eau douce exposés à des pesticides, plusieurs biomarqueurs ont été mesurés, dont la plupart sont détaillés dans le **Tableau 1.3**. Dans ces recherches, des

effets variés ont été observés selon le biomarqueur évalué (les activités de l'éthoxyresorufin-O-dééthylase (EROD), de la glutathion-S-transférase (GST), de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), de la carboxylestérase (CES), de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion réductase (GR), de la phosphatase alcaline (ALP) et les niveaux de glutathion (GSH), de peroxydation lipidique (LPO), ainsi que les processus comme celui du mécanisme de résistance multi-xénobiotique (MXR). La plupart de ces expériences ont mis en évidence des perturbations significatives de l'EROD, de la SOD (inhibition et augmentation), de la CAT (inhibition et augmentation), de la GST (augmentation), du GSH, de la LPO (augmentation) ou de l'AChE (inhibition) selon la substance et les tissus mesurés tels que les branchies, la glande digestive, le manteau, les muscles, etc. (Amanullah et al., 2010 ; dos Santos et Martinez, 2014 ; Iummato et al., 2013 ; Khazri et al., 2016 ; Köprücü et al., 2008 ; Mundhe et al., 2016 ; Mundhe et Pandit, 2014). Par exemple, Iummato et al. (2013) se sont intéressés à *Limnoperna fortunei* exposée en microcosme à des concentrations environnementales de glyphosate. Les activités de la GST et de l'ALP, de même que les niveaux de LPO, ont augmenté, tandis que la CES et la SOD ont significativement diminué (Iummato et al., 2013). Par ailleurs, les données sur des biomarqueurs similaires chez *E. complanata* exposée à différents contaminants sont consignées dans un tableau différent (**Tableau 1. 4**).

Tableau 1. 3 Résumé des études de biomarqueurs biochimiques de pesticides sur les bivalves d'eau douce.

Biomarqueur	Méthode	Pesticide	Espèce	Organe	Durée	Concentration	Observation	Référence
EROD	Eggens et al. (1992)	Atrazine	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie	96h	2 et 10 µg/L	Réduction significative	Dos Santos, et Martinez (2014)
EROD	Eggens et al. (1992)	Atrazine +Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie	96h	2 µg/L (ATZ) + 2mg/L (RD); 10 µg/L (ATZ) + 10 mg/L (RD)	Réduction	
GST	Keen et al. (1976)	Atrazine, Round-up et Atrazine +Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie et glande digestive	96h	2 et 10 µg/L (ATZ); 2 et 10 mg/L (RD); 2 µg/L (ATZ) + 2mg/L (RD); 10 µg/L (ATZ) + 10 mg/L (RD)	Pas d'effet (tendance de baisse non significative avec l'atrazine dans la glande digestive)	
MXR	Kurelec et al. (2000)	Atrazine +Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie	96h	10 µg/L (ATZ) + 10 mg/L (RD)	Diminution significative	
SOD	McCord et Fridovich (1969)	Atrazine et Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie	96h	10 µg/L (ATZ) et 10 mg/L (RD)	Augmentation	
SOD	McCord et Fridovich (1969)	Atrazine	<i>Corbicula manilensis</i>	Glande digestive	96h	2 et 10 µg/L	Augmentation	

Suite Tableau 1.3

Biomarqueur	Méthode	Pesticide	Espèce	Organe	Durée	Concentration	Observation	Référence
CAT	Beutler (1975)	Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Glande digestive	96h	10 mg/L	Réduction significative	Dos Santos, et Martinez (2014)
GPx	Hopkins et Tudhope (1973)	Atrazine et Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie	96h	2 µg/L (ATZ) et 10mg/L (RD)	Augmentation significative	
GR	Carlberg et Mannervik (1975)	Atrazine + Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie	96h	2 µg/L (ATZ) + 2mg/L (RD)	Augmentation significative	
LPO	Camejo et al. (1998)	Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Branchie et glande digestive	96h	10 mg/L	Augmentation significative	
LPO	Camejo et al. (1998)	Atrazine et atrazine + Round-up	<i>Corbicula manilensis</i>	Glande digestive	96h	2 µg/L (ATZ) et 10 µg/L(ATZ)+10 mg/L(RD)	Réduction significative	
AChe	Pilz (1965)	Chlorpyrifos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Hépatopancréas, branchie et muscle	5j; 15j; 30j	5 mg/L	Réduction significative	Amanullah, et al. (2010)
LDH	Pilz (1965)	Chlorpyrifos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Hépatopancréas, branchie et muscle	5j; 15j; 30j	5 mg/L	Augmentation significative	

Suite Tableau 1.3

Biomarqueur	Méthode	Pesticide	Espèce	Organe	Durée	Concentration	Observation	Référence
GST	Habig et al. (1974)	Glyphosate	<i>Limnoperna fortunei</i>	Tous les tissus	26j	1, 3 et 6 mg/L	Augmentation significative	Iummato et al. (2013)
VTG/ALP	Bowers et McComb (1966)	Glyphosate	<i>Limnoperna fortunei</i>	Tous les tissus	26j	3 et 6 mg/L	Augmentation significative	
LPO	Buege et Aust (1978)	Glyphosate	<i>Limnoperna fortunei</i>	Tous les tissus	26j	3 et 6 mg/L	Augmentation (6mg/l) significative (3mg/L)	
SOD	Beauchamp et Fidrovich (1971)	Glyphosate	<i>Limnoperna fortunei</i>	Tous les tissus	26j	1, 3 et 6 mg/L	Réduction significative	
CES	Kristoff et al. (2010)	Glyphosate	<i>Limnoperna fortunei</i>	Tous les tissus	26j	1, 3 et 6 mg/L	Réduction (1mg/L) significative (3 et 6 mg/L)	
LPO	Esterbauer et Cheesman (1990)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Manteau, branchie, pied et muscle	96h	52,36 mg/l	Augmentation significative	Mundhe et Pandit (2014)
SOD	Beauchamp et Fidrovich (1971)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Manteau, branchie, pied et muscle	96h	52,36 mg/l	Augmentation significative	

Suite Tableau 1.3

Biomarqueur	Méthode	Pesticide	Espèce	Organe	Durée	Concentration	Observation	Référence
GST	Habig et al. (1974)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Branchie, pied et muscle	96h	52,36 mg/l	Réduction significative (branchie), augmentation significative (pied et muscle)	Mundhe et Pandit (2014)
CAT	Aebi (1984)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Manteau, branchie, et muscle	96h	52,36 mg/l	Réduction significative	
GR	Goldberg et Spooner (1983)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Manteau, branchie, et muscle	96h	52,36 mg/l	Réduction significative (manteau et muscle), double augmentation significative (branchie)	
AChE	Ellman et al. (1961)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i>	Branchie, pied et muscle	96h	52,36 mg/l	Réduction significative	
GST	Habig et al. (1974)	Atrazine	<i>Anodonta cygnea</i>	Glande digestive	365j	0 < x < 3,5 µg/L (sites naturels)	Réduction significative	Robillard et al. (2003)
SOD	Misra et Fridovich (1972)	Cyperméthrine	<i>Unio gibbus</i>	Glande digestive	96h	100 et 150 µg/L	Augmentation significative	Khazri et al. (2016)

Suite Tableau 1.3

Biomarqueur	Méthode	Pesticide	Espèce	Organe	Durée	Concentration	Observation	Référence
CAT	Beutler (1982)	Cyperméthrine	<i>Unio gibbus</i>	Glande digestive	96h	100 et 150 µg/L	Augmentation significative	Khazri et al. (2016)
GSH	Benke et al. (1974)	Cyperméthrine	<i>Unio gibbus</i>	Glande digestive	96h	150 µg/L	Réduction significative	
LPO	Buege et Aust (1978)	Cyperméthrine	<i>Unio gibbus</i>	Glande digestive	96h	150 µg/L	Augmentation significative	
AChE	Ellman et al. (1961)	Cyperméthrine	<i>Unio gibbus</i>	Glande digestive	96h	100 et 150 µg/L	Réduction significative	
LPO	Ohkawa et al. (1979)	Deltaméthrine	<i>Unio elongatulus eucirrus</i>	Branchies et glande digestive	1h; 1, 2, 3 et 4j	25, 50, 100, 200, 400, 800 et 1,600 µg/L	Augmentation significative	Köprücü et al. (2008)
GSH	Ellman (1959)	Deltaméthrine	<i>Unio elongatulus eucirrus</i>	Branchies et glande digestive	1-96h	25, 50, 100, 200, 400, 800 et 1,600 µg/L	Réduction significative	
CAT	Aebi (1974)	Deltaméthrine	<i>Unio elongatulus eucirrus</i>	Branchies et glande digestive	1-96h	25, 50, 100, 200, 400, 800 et 1,600 µg/L	Réduction significative	
LPO	Esterbauer et Cheeseman (1990)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i> (Lamarck)	Branchies, muscle, manteau et pied	7j	5,25 mg/L	Augmentation significative	Mundhe et al. (2016)

Suite Tableau 1.3

Biomarqueur	Méthode	Pesticide	Espèce	Organe	Durée	Concentration	Observation	Référence
GST	Habig et al. (1974)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i> (Lamarck)	Branchies muscle, manteau et pied	7j	5,25 mg/L	Augmentation significative	Mundhe et al. (2016)
CAT	Aebi (1984)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i> (Lamarck)	Branchies muscle, manteau et pied	7j	5,25 mg/L	Augmentation significative	
SOD	Beauchamp et Fidrovich (1971)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i> (Lamarck)	Branchies, manteau et pied	7j	5,25 mg/L	Augmentation significative	
GR	Goldberg et Spooner (1983)	Monocrotophos	<i>Lamellidens marginalis</i> (Lamarck)	Branchies muscle, manteau et pied	7j	5,25 mg/L	Changements significatifs: augmentation (branchies), réduction (pied < muscle < manteau)	

EROD : Ethoxyresorufin-O-dééthylase, GST : Glutathion-S-transférase, MXR : Résistance multi-xénobiotique, SOD : Superoxyde dismutase, CAT : Catalase, GPx : Glutathion peroxydase, GR : Glutathion réductase, LPO : Peroxydation lipidique, AChE : Acétylcholinestérase, LDH : Lactate déshydrogénase, VTG/ALP : Vitellogénine/Alkali-labile phosphate, CES : Carboxylestérase, GSH : Glutathion réduit ; ATZ : atrazine ; RD : Round-up, un herbicide à base de glyphosate.

Dans le cas d'*E. complanata*, les mêmes biomarqueurs ont été étudiés à la suite d'expositions à différents pesticides et effluents. Le **Tableau 1.4** synthétise les principaux biomarqueurs analysés, leurs conditions d'exposition et les effets mesurés. Seulement quelques études en laboratoire ont investigué l'impact de plusieurs polluants (dont l'atrazine, des produits œstrogéniques et des mélanges urbains ou agricoles) sur des paramètres biochimiques ou comportementaux de cette espèce. Par exemple, *E. complanata* se révèle très sensible à l'atrazine : le β -estradiol et les herbicides (atrazine, 2,4-D, paraquat) peuvent stimuler ou inhiber son métabolisme thermique en fonction de la concentration et de la durée d'exposition (Cheney et al., 1997). Flynn et Spellman (2009) et Flynn et al. (2013) ont montré que l'atrazine (1,5, 15 et 150 $\mu\text{g/L}$) et l'estradiol affectent l'indice d'agrégation (AI) de *E. complanata*, possiblement lié à sa reproduction, ainsi que la profondeur de fouissage (particulièrement chez les mâles). Par ailleurs, l'atrazine (15 $\mu\text{g/L}$) provoque une augmentation de la vitellogénine (VTG) dans les gonades d'individus moins enfouis (Flynn et al., 2013).

Au Québec, en matière de biosurveillance active, diverses expériences d'encagement ont été réalisées pour exposer *E. complanata* à des mélanges de polluants urbains, principalement issus d'effluents de grandes villes. Elles ont mis en évidence des perturbations significatives pour plusieurs biomarqueurs (neurotoxicité, reproduction, immunotoxicité, stress oxydatif) dans différents tissus de la moule : VTG, P450, MT, acides aminés libres, sérotonine (5-HT), dopamine, LPO, GST, AChE, monoamine oxydase (MAO) et dommage à l'ADN (Day et al., 1990; Gagné et al., 2007, 2004, 2002; Gagné et Blaise, 2003). Par exemple, dans la plupart de ces études on observe une hausse du dommage à l'ADN, de la LPO, de la VTG, de l'activité de la GST et une inhibition de l'AChE chez la moule. D'autres indicateurs, comme la viabilité des moules, l'indice de condition (IC), l'indice gonado-somatique (GSI), la cellularité, la viabilité des hémocytes, l'activité cytotoxique de type NK, celle des lysozymes, l'efficacité de la phagocytose ou encore l'inflammation (cyclo-oxygénase), se sont également révélés sensibles (Bouchard et al., 2009; Farcy et al., 2011; Gagné et al., 2012).

Tableau 1. 4 Les biomarqueurs physiologiques mesurés chez la moule *E. complanata* exposée à divers polluants au laboratoire et in situ

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration	Observation	Référence	Notes
					d'exposition			
IA	NR	Atrazine	NR	72h	1,5-150 µg/L	Diminution	Flynn et Spellman (2009)	L'agrégation pourrait être liée à la reproduction
IA	NR	Estradiol	NR	72h	100 µg/L (contrôle +)	Diminution		L'agrégation pourrait être liée à la reproduction
Fouissage	NR	Atrazine	NR	0-6h	15 µg/L	Diminution significative	Flynn et al. (2013)	Dimorphisme sexuel, féminisation
VTG/ALP	Gagné et Blaise (2003)	Atrazine	Gonades	0-6h	1,5 µg/L	Augmentation significative		Chez les mâles
Potentiel de liaisons opiacés	Sherman (1989)	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	1-20%	Augmentation légère	Gagné et al. (2007)	
GABA et glutamate décarboxylase	Woff et Klemish (1991)	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	1, 3, 10, et 20%	Diminution significative		

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration	Observation	Référence	Notes
					d'exposition			
Taux de monoamines (5-HT, DA)	Orsinger et al. (1980); Szabo et al. (1983)	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	10% et 20%	Augmentation significative	Gagné et al. (2007)	
MAO	NR	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	20%	Diminution significative		
AChE	Bonacci et al. (2004)	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	1, 3, 10, et 20%	Diminution significative		
LPO	Wills (1987)	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	1, 3, 10, et 20%	Augmentation		Significatif à 20%
GSI	NR	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	10 et 20%	Diminution significative		Tendance opposée, à 1%
VTG/ALP	Gagné et al. (2003)	Effluent (agricole et urbain)	Gonades	30j	3, 10, et 20%	Augmentation significative		Chez les mâles

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration		Observation	Référence	Notes
					d'exposition				
Sexe ratio	—	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Différence significative	Gagné et al. (2011c)	De 30-80% entre 2 sites de femelles
VTG/ALP	Gagné et al. (2003)	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Augmentation significative		Seulement chez les males
Sérotonine	Kim et al. (2008)	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Différence significative		
COX	Fujimoto et al. (2002)	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ				
Dopamine	Kim et al. (2008)	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Différence significative		
GSI	—	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Différence significative		
ATC	Mathieu et al. (1982)	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Différence significative		
LPO	Wills (1987)	Effluent (urbain)	Gonades	NR	In situ		Différence significative		

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration	Observation	Référence	Notes
					d'exposition			
VTG/ALP	—	Effluent (urbain)	Gonades et hémolymphes	96h et 62j	10, 25, et 50% et in situ respectivement	Augmentation significative	Gagné et al. (2001a)	
Lipides totaux et Sucre	Frings (1972) et Jermyn (1975)	Effluent (urbain)	Gonades et hémolymphes	62j	In situ	Augmentation significative		
Indice de croissance (GI)	—	Effluent (urbain)	Gonades et hémolymphes	62j	In situ	Différence significative		
MT	Viarengo et al. (1997)	Effluent (urbain)	Branchies, Glande digestive et gonades	1 an	In situ	Augmentation	Gagné et al. (2004)	
LPO	Wills (1987)	Effluent (urbain)	Branchies et gonades	1 an	In situ	Augmentation significative		
Domage à l'ADN	Olive (1988); Gagné et Blaise, (1995)	Effluent (urbain)	Gonades	1 an	In situ	Diminution significative		
GST	—	Effluent (urbain)	Glande digestive	1 an	In situ	Augmentation forte		

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration		Observation	Référence	Notes
					d'exposition				
Monoamines (5-HT, DA)	Orsinger et al. (1980); Szabo et al. (1983)	Effluent (urbain)	Branchies, Glande digestive et gonades	1 an	In situ		Diminution	Gagné et al. (2004)	
MAO	—	Effluent (urbain)	Branchies, Glande digestive et gonades	1 an	In situ		Diminution		
Transport ATP-dépendant	Kakko et al. (2003)	Effluent (urbain)	Branchies, Glande digestive et gonades	1 an	In situ		Beaucoup de fluctuation dépendamment des sites et des monoamines		
CI	—	Effluent (urbain)	Tout le corps	1 an	In situ		Différence significative		
GSI	—	Effluent (urbain)	Gonades	1 an	In situ		Différence significative		

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration		Observation	Référence	Notes
					d'exposition				
MT	Scheuhammer et Cherian (1986)	Effluent (urbain)	Branchies, Glande digestive	62j	In situ		Variation significative	Gagné et al. (2002)	Diminution dans la glande digestive et augmentation dans les branchies
Cytochrome P4501A1	Hahn et al. (1995)	Effluent (urbain)	Glande digestive	62j	In situ		Augmentation significative		
Domage à l'ADN	Olive (1988); Gagné et Blaise, (1995)	Effluent (urbain)	Glande digestive	62j	In situ		Diminution significative		
Lipides totaux	Frings et al. (1972)	Effluent (urbain)	Gonades	62j	In situ		Augmentation significative		
VTG/ALP	Gagné et al. (2001)	Effluent (urbain)	Hémolymphe	62j	In situ		Augmentation significative		
Activité de phagocytose	Blaise et al. (2002)	Effluent (urbain)	Hémolymphe	62j	In situ		Diminution significative		

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration		Observation	Référence	Notes
					d'exposition				
AChE	Bonacci et al. (2004)	Effluent (urbain)	Gonades et ganglions	14j	20%		Diminution significative	Gagné et al. (2011b)	
MAO	Gagné et al. (2010)	Effluent (urbain)	Gonades et ganglions	14j	10 et 20%		Différence significative		Réduction à 10% et augmentation à 20%
LPO	Wills (1987)	Effluent (urbain)	Gonades	14j	10%		Augmentation significative		
SOD	Ewing et Janero (1995)	Effluent (urbain)	Gonades et ganglions	14j	3, 10 et 20%		Différence significative		Réduction à 10 et 20% et augmentation à 3%
VTG/ALP	Gagné et al. (2010)	Effluent (urbain)	Gonades	14j	3, 10 et 20%		Augmentation significative		
Glutamate		Effluent (urbain)	Gonades et ganglions	14j	3, 10 et 20%		Augmentation significative		
Lipides totaux	Frings et al. (1972)	Effluent (urbain)	Gonades	14j	20%		Augmentation significative		

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration		Référence	Notes
					d'exposition	Observation		
Mortalité	—	Effluent (urbain)	—	14j	In situ	Augmentation	Farcy et al. (2011)	
CI	—	Effluent (urbain)	—	14j	In situ	Diminution significative		
GST	Boryslawskyj et al. (1988)	Effluent (urbain)	Glande digestive	14j	In situ	Augmentation significative		
VTG/ALP	Gagné et Blaise (1998)	Effluent (urbain)	Gonades	30j	In situ	Augmentation significative	Bouchard et al. (2009)	
GSI	—	Effluent (urbain)	Gonades	30j	In situ	Diminution		
Mortalité	—	Effluent (urbain)	—	30j	In situ	Augmentation significative		
ChE	Hill et Fleming (1982)	Aldicarb	Muscle abducteur	96h	0-320 mg/L	Diminution significative	Moulton et al. (1996)	Inhibée aux conc. $\geq$ 0,1 mg/L
ChE	Hill et Fleming (1982)	Acephate	Muscle abducteur	96h	0-320 mg/L	Variation significative		Inhibée aux conc. $\geq$ 1,3 mg/L et stimulée à 0,01 et 0,1 mg/L

Biomarqueurs	Méthode	Contaminant	Tissus	Durée	Concentration	Observation	Référence	Notes
					d'exposition			
Oxyde nitrique	—	Effluent (urbain et agricole)	Hémolymphe	1-3 mois	In situ	Augmentation significative	Gagné et al. (2018)	Comparé à la référence
Lysozyme	—	Effluent (urbain et agricole)	Hémolymphe	1-3 mois	In situ			Comparé à la référence
ROS	—	Effluent (urbain et agricole)	Hémolymphe	1-3 mois	In situ	Augmentation significative		Comparé à la référence
Thiol	—	Effluent (urbain et agricole)	Hémolymphe	1-3 mois	In situ	Variation significative		Comparé à la référence
COX	—	Effluent (urbain et agricole)	Hémolymphe	1-3 mois	In situ	Diminution significative		Comparé à la référence
GST	—	Effluent (urbain et agricole)	Hémolymphe	1-3 mois	In situ	Diminution significative		Comparé à la référence
ADN (dommage)	—	Effluent (agricole)	Hémolymphe	56 jours	In situ	Augmentation significative	Gendron et al. (2023)	

NR : Non répertorié, IA : Indice d'agrégation, VTG/ALP : Vitellogénine/Alkali-labile phosphate, GABA : acide γ -aminobutyrique, MAO : Monoamine oxydase, AChE : Acétylcholinestérase, LPO : Peroxydation lipidique, COX : cyclooxygénase, GSI : Indice gonadosomatique, ATC : Aspartate transcarbamoylase, MT : métallothionine, SOD : Superoxyde dismutase, CI : Indice de condition, GST : Glutathion-S-transférase, ChE : Cholinestérase, ROS : Espèces réactives à l'oxygène.

1.1.6 L'intégration des données de biomarqueurs

Pour faire une évaluation holistique de l'état des systèmes et fonctions biologiques des organismes, l'utilisation de plusieurs biomarqueurs est indispensable, ce qui génère de vastes ensembles de données de biomarqueurs. Cependant, l'interprétation de ces données volumineuses constitue un défi majeur dans le domaine de la biosurveillance active de l'environnement (Catteau et al., 2023). Il est alors nécessaire d'utiliser des approches multidisciplinaires permettant de faire des liens globaux de causalité entre l'exposition aux pesticides et l'ensemble des perturbations observées dans un écosystème donné. Depuis plusieurs décennies, diverses approches multi-biomarqueurs ont été développées pour faciliter cette interprétation. Parmi ces méthodes, on retrouve les analyses statistiques multidimensionnelles, les systèmes experts, ainsi que les indices intégratifs (Amiard-Triquet et Berthet, 2017). Cependant, l'application de ces méthodes présente plusieurs défis en termes de faisabilité, de coûts et de complexité.

En effet, les analyses statistiques multidimensionnelles ne résolvent pas toujours le problème de l'interprétation de grandes quantités de données. L'interprétation reste souvent complexe et les incertitudes peuvent être élevées, particulièrement lorsqu'il y a un grand nombre de variables et que celles-ci sont analysées à différentes échelles (Amiard-Triquet et Berthet, 2017; Jackson, 2005; Ringnér, 2008). Les systèmes experts, tels que l'approche du poids de l'évidence, *Weight of Evidence* (WoE), requièrent une vaste gamme de données issues d'études les effets sur des biomarqueurs et des effets écotoxicologiques standards, en laboratoire et/ou *in situ*. Ces systèmes s'appuient également sur des données de contaminants chimiques relatifs au milieu environnant et à leur bioaccumulation dans les organismes.³ Chaque type de donnée constitue une ligne de preuve (LDP) ou ligne d'évidence impérative pour l'application de l'approche WoE (Amiard-Triquet et Berthet, 2017; Barjhoux et al., 2018). Cette complexité rend ces études particulièrement exigeantes, longues et coûteuses. Elles nécessitent l'utilisation de plusieurs organismes modèles et se révèlent inadaptées pour évaluer, à court et à moyen terme, les effets de la pollution diffuse saisonnière causée par des contaminants organiques faiblement bioaccumulables, tels que les pesticides. Certains indices intégratifs, bien que moins complexes que les systèmes experts, n'intègrent pas les données de contamination chimique dans leurs calculs et sont difficiles à appliquer dans un cas d'évaluation à moyen terme des effets de la pollution diffuse saisonnière par des pesticides. Ces indices requièrent des données telles que : des biomarqueurs histologiques et biochimiques chez des espèces spécifiques ; des indicateurs au niveaux des communautés d'espèces de taxons différents ; et un indice multidimensionnel tel que l'indice *multiple ecological level index* (Amiard-Triquet et Berthet, 2017). Contrairement à ces derniers indices,

³ Description de l'approche WoE en **Annexe E**.

l'IBR (*integrated biomarker response index*) est un indice intégratif assez simple à appliquer du fait qu'il intègre uniquement les données de biomarqueurs infra-individuels et individuels pour évaluer l'effet de la contamination d'un milieu sur un organisme relativement sédentaire⁴ (Amiard-Triquet et Berthet, 2017 ; Catteau et al., 2023). Bien que son application soit possible à court et à moyen terme, l'IBR, tout comme les autres indices intégratifs, n'intègre pas les données de contamination chimique dans ses calculs.

1.2 Approche méthodologique

1.2.1 Intérêt de l'étude

L'intérêt général de cette étude est d'évaluer le risque qu'encourent les moules d'eau douce dans des agroécosystème en Montérégie-Ouest à travers un diagnostic de la condition physiologique globale d'*E. complanata* dans des rivières plus ou moins soumises à la pollution par les pesticides. De cela découlent des intérêts spécifiques tels que, entre autres, l'étude de la toxicité des pesticides problématiques (seuls ou en mélange) détectés dans cette région. Les effets de certains de ces pesticides (thiaméthoxame, chlorantraniliprole, etc.) n'ont pas encore été étudiés avec l'approche des biomarqueurs biochimiques tels que La LPO, la VTG, l'AChE, la GST, etc., chez la moule *E. complanata*.

1.2.2 Choix des biomarqueurs, pesticides et rivières

Les biomarqueurs ont été sélectionnés en tenant compte de leur capacité à représenter différentes fonctions et systèmes biologiques. Ainsi, la peroxydation lipidique (LPO) a été retenue pour évaluer le stress oxydatif, la GST (glutathion S-transférase) pour le mécanisme de défense antioxydant, l'AChE (acétylcholinestérase) pour la neurotoxicité et la VTG (vitellogénine) pour le système reproducteur. Les taux de protéines et de lipides ont également été intégrés afin d'estimer les réserves énergétiques et de renseigner sur l'état du métabolisme global.

Stress oxydatif. Le stress oxydatif survient lorsqu'un déséquilibre s'installe entre les mécanismes pro-oxydants et antioxydants, pouvant causer des dommages sur diverses structures biologiques, notamment les lipides et les protéines. Les lipides jouent un rôle fondamental dans l'organisme, car ils constituent notamment les membranes cellulaires et organiques. En cas de stress oxydatif, une peroxydation lipidique peut survenir, entraînant une altération de la membrane (perte de fluidité, augmentation de la perméabilité, perte de l'intégrité membranaire ; Valavanidis et al., 2006). Étant donné que de nombreuses fonctions cellulaires dépendent de la stabilité de ces membranes phospholipidiques, il est essentiel de mesurer la LPO. Pour évaluer les dommages causés aux lipides par les pesticides, il est pertinent de quantifier la production

⁴ Description des concepts et de la méthode de calcul de l'IBR en **Annexe F**.

de malondialdéhyde (MDA), un sous-produit de la peroxydation lipidique. Le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) est largement utilisé à cette fin : la MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique en formant un complexe de couleur rouge (Valavanidis et al., 2006). Plusieurs études font état de dommages oxydatifs après une exposition aux pesticides (**Tableaux 1.3 et 1.4**). Ainsi, le recours au test TBARS et à la mesure de l'activité de la GST, une enzyme antioxydante secondaire, est justifié (Amiard et Amiard-Triquet, 2017).

Mécanisme de défense. En plus d'être une enzyme antioxydante, la GST participe à la biotransformation de composés endogènes issus des dommages métaboliques. Son rôle implique également la détoxification des composés exogènes en les conjuguant au glutathion, ce qui les rend hydrosoluble et facile à excréter (Jokanović, 2001). Impliquée dans l'élimination des contaminants, la GST constitue donc un indicateur utile du niveau d'activation du système de défense. Des études ont par ailleurs montré que son activité peut être altérée par certains contaminants organiques (Gowland et al., 2002).

Neurotoxicité. Concernant la neurotoxicité, l'étude de l'AChE est particulièrement pertinente. Bien que l'activité de cette enzyme puisse être affectée par plusieurs groupes de polluants, elle est souvent utilisée comme biomarqueur spécifique de la neurotoxicité des pesticides (Amiard et Amiard-Triquet, 2017). L'AChE assure la dégradation hydrolytique de l'acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel à la transmission nerveuse et à la contraction musculaire (Xuereb et al., 2009). Une baisse de l'activité de l'AChE peut entraîner une accumulation d'acétylcholine, se traduisant par une altération du fonctionnement neuromusculaire.

Système reproducteur. La VTG est une protéine clé dans la capacité reproductive des organismes ovipares. Précurseur du vitellus, elle fournit aux ovocytes les nutriments indispensables (calcium, phosphore, lipides, magnésium, zinc, etc.) au développement embryonnaire (Babin et al., 2007 ; Babin, 2008). En écotoxicologie, la mesure de la VTG dans le système reproducteur des bivalves est judicieuse pour évaluer l'effet d'éventuels composés œstrogéniques présents dans les effluents ou les pesticides, susceptibles d'affecter la vitellogenèse (Amiard et Amiard-Triquet, 2017 ; Flynn et al., 2013 ; Gagnaire et al., 2009 ; Matozzo, 2020).

Réserves énergétiques. Les bivalves emmagasinent essentiellement leurs lipides sous forme de triglycérides lors des périodes d'abondance alimentaire, afin de constituer des réserves énergétiques mobilisables lors de situations de stress environnemental (Giese, 1966 ; Bhalchandra et Lomte, 2004). L'évaluation des réserves de triglycérides constitue un indicateur pertinent de stress, car l'exposition aux pesticides peut perturber les processus métaboliques (Bhalchandra et Lomte, 2004 ; Smolders et al., 2004).

Les protéines, pour leur part, jouent un rôle crucial dans la reproduction, le développement et l'entretien des fonctions vitales, et peuvent également être considérées comme des réserves énergétiques. Leur concentration peut varier en présence de différents composés dont les pesticides, comme l'ont montré plusieurs travaux sur divers bivalves (Nandurkar et Zambare, 2010 ; Patil, 2011 ; Minakshi et al., 2013 ; Waykar et Shinde, 2019). Elles représentent donc des biomarqueurs potentiels des réserves énergétiques.

Indices sub-individuels. Afin d'obtenir une vision d'ensemble de l'état de santé et de l'intégrité gonadique, l'indice de condition (CI) et l'indice gonadosomatique (GSI) ont été mesurés. L'indice de condition de Fulton rend compte de la croissance et de la maturité sexuelle, et peut servir d'indicateur global de la santé métabolique (Fulton, 1904 ; Gagné et al., 2011c).

En résumé, les biomarqueurs retenus (LPO/TBARS, GST, AChE, VTG, lipides, triglycérides, protéines, CI et GSI) fournissent une gamme d'informations et leur intégration permet une meilleure compréhension des effets des pesticides sur la santé des moules, tant au niveau cellulaire que physiologique.

Pour évaluer l'effet des pesticides sur *E. complanata*, nous avons sélectionné, pour les expositions en laboratoire, des pesticides d'intérêt en fonction de leur usage et de leur présence dans les cours d'eau de la région d'étude. Les critères retenus incluaient les quantités vendues, la fréquence et l'ampleur de leur détection, ainsi que les dépassements de critères de qualité. Depuis 2018, l'atrazine, le chlorpyrifos et les néonicotinoïdes (thiaméthoxame, clothianidine, imidaclopride) exigent une prescription agricole, entraînant une baisse majeure de leurs ventes dès 2019 (Gouvernement du Québec, 2024). Parmi eux, la clothianidine (principal produit de transformation du thiaméthoxame, NCBI, 2024) a enregistré la plus forte diminution, alors que le thiaméthoxame est demeuré relativement stable. De son côté, le chlorantraniliprole, un nouvel insecticide remplaçant progressivement les néonicotinoïdes, prend de plus en plus d'ampleur (concentration, fréquence de détection et dépassement des CVAC) dans les cours d'eau de la Montérégie (Feng et al., 2024; Giroux, 2022, 2019). Par ailleurs, le glyphosate – dont les concentrations détectées restent parmi les plus élevées – demeure le pesticide le plus vendu, avec plus de 2 millions de kg écoulés en 2022 (Feng et al., 2024; Giroux, 2022, 2019; Gouvernement du Québec, 2024). À la lumière de ces observations, nous avons retenu le glyphosate, le chlorantraniliprole et le thiaméthoxame pour effectuer les expositions. Ces pesticides figurent d'ailleurs parmi les 55 substances jugées prioritaires par Pêches et Océans Canada (Anderson et al., 2022).

Pour l'évaluation des mélanges de pesticides *in situ*, nous avons sélectionné des sites d'encagement de moules deux rivières de l'Ouest de la Montérégie présentant différents niveaux de contamination : la rivière Châteauguay et la rivière des Anglais. Ces deux cours d'eau agricoles, ont été retenus en raison de

leur exposition à une contamination diffuse importante. La rivière Châteauguay, dont la partie amont est majoritairement forestière (aux États-Unis) et la partie aval agricole (au Québec), rejette près de 515 kg de pesticides par mois dans le fleuve Saint-Laurent (Feng et al., 2024). Elle reçoit également l'eau de la rivière Des Anglais, elle-même fortement contaminée. Environ 44 substances actives (herbicides, insecticides, fongicides) y ont été détectées, dont plusieurs présentent un haut risque pour la faune aquatique, particulièrement en aval de la rivière Des Anglais et de son affluent, le ruisseau Norton (Feng et al., 2024). Les sites d'expérimentation ont alors été choisis en amont et en aval des rivières Des Anglais et Châteauguay, où les gradients de contamination diffèrent.

1.2.3 Planification

Les travaux ont porté sur l'adaptation de biomarqueurs permettant d'évaluer les effets du glyphosate, du thiaméthoxame, du chlorantraniliprole et de leur mélange sur la moule *E. complanata*. Après avoir sélectionné les biomarqueurs, des tests ont été menés sur des organismes non exposés afin de confirmer que chaque biomarqueur est présent et fonctionnel chez l'espèce, et pour identifier les tissus les plus appropriés à leur mesure. Les essais sur des individus non exposés garantissent que les biomarqueurs choisis sont mesurables de façon fiable et sensible dans les tissus optimaux, avec des valeurs de fond bien caractérisées. Ils posent les bases d'une comparaison solide entre organismes exposés et non exposés, essentielle pour interpréter correctement l'impact des pesticides.

Le glyphosate, le thiaméthoxame et le chlorantraniliprole ont été utilisés, seuls (à des concentrations souvent inférieures aux CVAC et représentatives des agroécosystèmes) et en mélanges (combinant les mêmes concentrations), pour exposer les moules en laboratoire. D'autres moules ont été transplantées en milieu naturel, dans des cages installées dans les sites en amont et en aval des rivières choisies, ces dernières étant caractérisées sur le plan de leur contamination en pesticides. Les biomarqueurs biochimiques et sub-individuels ont ensuite été mesurés sur les moules immédiatement après chaque exposition.

Pour terminer, plusieurs indices ont été calculés afin d'évaluer le risque estimé à partir de la concentration des pesticides pris individuellement et celui calculé à partir des réponses des biomarqueurs. Un indice final, intégrant ces deux volets, a été calculé afin d'obtenir un diagnostic global du risque encouru par la moule dans les rivières étudiées.

1.2.4 Choix du modèle biologique

Les mollusques, reconnus comme organismes sentinelles de premier plan dans la surveillance de la pollution aquatique, offrent une fiabilité croissante pour les études de toxicité (Flynn et Spellman, 2009;

Narbonne et Michel, 1997). Ils sont faciles à manipuler, relativement simples d'observation et font l'objet de nombreuses recherches, comme en témoignent divers travaux scientifiques analysant leurs biomarqueurs (Campillo et al., 2015; Reyna et al., 2019). Par ailleurs, des programmes nationaux et internationaux, dont *Mussel Watch*, s'appuient sur les bivalves comme bioindicateurs pour évaluer la qualité de l'environnement, grâce à leur nature sédentaire, leur sensibilité générale aux polluants et leur capacité à les bioconcentrer (Rittschof et McClellan-Green, 2005). Au Québec, il existe une expérience acquise quant à l'utilisation d'*E. complanata* pour des études écotoxicologiques (Douvillat et al., 2009 ; Farcy et al., 2011 ; Flynn et Spellman, 2009 ; Flynn et al., 2013 ; Gagné et al., 2013), ainsi que Metcalfe et Charlton (1990). La vaste aire de répartition d'*E. complanata* permet des comparaisons entre différents sites, tandis que sa taille relativement grande et ses organes distincts facilitent sa manipulation. Ses caractéristiques (mode de vie, statut endémique et distribution) font de la moule un modèle de choix pour des expérimentations en laboratoire ou *in situ*. Cela justifie son utilisation dans le présent projet, où elle pourra être soumise à des mesures de réponses physiologiques et d'indices d'état sub-individuel consécutives à une exposition aux pesticides.

1.2.5 Acquisition, acclimatation et dépuration des moules

Les moules d'eau douce *E. complanata* ont été échantillonnées, en automne 2020 et 2021, dans le lac Bellevue pour les expérimentations en laboratoire, puis en juin 2021 dans les rivières Châteauguay et Des Anglais pour les expérimentations *in situ* (Permis scientifiques # : 2020-10-15-161-03-06-S-P-F et 2021-6-7-3064-03-16-S-P). Les moules *E. complanata* ont généralement deux cycles de reproduction qui s'étendent du début du mois mai à la fin du mois de juin à une température moyenne journalière de 19.1 °C; maintenir les individus à une température moyenne de 15 °C après le deuxième cycle empêche le déclenchement d'un nouveau cycle reproducteur (Price et Eads, 2011). Les moules ont alors été acclimatées et maintenues, selon le calendrier d'exposition, pendant un à trois mois à une température de 15 ± 3 °C dans des bassins pourvus d'un substrat sableux d'environ 10 cm et alimentés par un flux continu d'eau déchlorée à l'animalerie de l'UQAM. Elles également ont été nourries trois fois par semaine avec des concentrés de plancton Seachem® (Seachem Laboratories, Inc., Madison, GA, 30650, États-Unis) et avec la microalgue *Raphidocelis subcapitata* cultivée dans notre laboratoire. Le cycle lumineux était maintenu à 16 h de lumière pour 8 h d'obscurité, et les bassins étaient contrôlés trois fois par semaine pour mesurer des paramètres tels que le CaCO₃, le pH, les NO₃/NO₂, l'oxygène dissous ainsi que le NH₄/NH₃.

1.2.6 Exposition au laboratoire

Les trois pesticides (glyphosate, thiaméthoxame et chlorantraniliprole)⁵ ont été utilisés individuellement et en mélanges pour les expositions en laboratoire. En conservant les mêmes conditions que pendant la période d'acclimatation, 48 à 60 moules ont été utilisées pour les expositions. Les concentrations utilisées ont été choisies en fonction de celles relevées dans les suivis de la contamination agricole en Montérégie-Ouest: 50, 100 et 150 µg/L a.i. pour le glyphosate, 0,05, 0,5 et 5 µg/L a.i. pour le thiaméthoxame, 0,25, 0,5 et 0,75 µg/L a.i. pour le chlorantraniliprole, et trois mélanges correspondant aux faibles, moyennes et fortes concentrations de chacun de ces pesticides. Afin de comparer nos résultats aux données chimiques de terrain, nous avons uniquement utilisé les matières actives de chaque pesticide, à l'exception du glyphosate qui a été utilisé en formulation Credit Xtreme. Pour ce dernier, la formulation contenait 74 % de substance active répartie entre deux sels (isopropylamine et potassium). Les expositions ont été réalisées soit avec un pesticide à la fois, soit avec le mélange, dans un dispositif statique à renouvellements quotidiens, sur une durée de 21 jours, sans létalité constatée.

1.2.7 Encagement des moules sur les sites d'intérêt

L'exposition *In situ* avec de l'encagement permet de déterminer les effets de mélanges de contaminants dans un milieu naturel. Cette approche impliquant des mollusques en général ou des bivalves en particulier est déjà reconnue et utilisée en écotoxicologie (Lacaze et al., 2011 ; Pytharopoulou et al., 2008) et la moule d'eau douce *E. complanata* a déjà fait l'objet de plusieurs études du même genre (Bouchard et al., 2009 ; Day et al., 1990 ; Farcy et al., 2011 ; Gagné et al., 2012, 2007 2004, 2002, 2001a; Gagné et Blaise, 2003 ; Gagnon et al., 2006). Dans le cadre de ce projet, l'encagement a été fait dans les rivières agricoles choisies (Chateauguay et Des Anglais) à des sites présentant un gradient de contamination diffuse aux pesticides. Les moules ont été récoltées à des endroits très peu pollués de ces rivières et ont passé au moins un mois de dépuración à l'animalerie. Elles ont ensuite été encagées dans chaque site selon leur rivière d'origine. Elles ont été placées dans des cages expérimentales selon la méthode standard pour les essais biologiques *in situ* avec des bivalves en cage (Salazar et Salazar, 2001), généralement utilisée pour les mêmes sortes d'études. En bref, les moules ont été triées en fonction de leurs tailles avant de les immerger par groupe de 20 dans les cages. Les cages étaient de filets cylindriques en polypropylène d'un mètre carré attaché à 2 briques pour éviter qu'elles ne bougent. Les mailles du filet étaient assez petites de sorte à protéger les moules contre les prédateurs. Chaque rivière ayant 2 sites d'encagement, le nombre de cages était 4.

⁵ Détails physicochimiques des pesticides en **Annexe G**.

L'encagement a duré un mois pour respecter les durées d'exposition recommandée par le Conseil Canadien des Ministre de l'Environnement, pour les tests de toxicité chronique sur des invertébrés aquatiques à longue durée de vie (CCME, 2007).

Pendant la période d'encagement, des échantillons d'eau ont été prélevés à chaque site (amont et en aval des rivières Châteauguay et Des Anglais) à environ un mètre sous la surface, c'est-à-dire à la même profondeur que les cages. Un volume de 1 L a été recueilli à l'aide d'un échantillonneur (ex. Niskin-Go Flow), puis conservé dans des bouteilles en verre ambré à 4 °C jusqu'à l'arrivée au laboratoire, où les échantillons ont été stockés à -20 °C avant l'analyse. Les prélèvements d'eau ont été réalisés conformément au « Manuel des protocoles d'échantillonnage pour l'analyse de la qualité de l'eau au Canada » (CCME, 2011; Harris et al., 2008; Feng et al., 2024).

1.2.8 Mesures et analyses

L'analyse des échantillons d'eau a été faite à l'aide de méthodes analytiques adaptées à partir d'études récentes, pour atteindre des limites de détection assez faibles. Ces analyses ont eu lieu dans le laboratoire du professeur Sébastien Sauvé à l'Université de Montréal (Feng et al., 2024).

Les mesures de biomarqueurs ont eu lieu dans les laboratoires de Monique Boily à l'Université du Québec à Montréal (UQAM). Après les diverses expositions aux pesticides, une mesure des TBARS a été faite sur les branchies et la glande digestive de la moule, *E. complanata*, pour statuer des dommages (LPO) causés par le stress oxydant. Le test TBARS en microplaque a été adapté à notre modèle animal en s'appuyant sur l'une des méthodes décrites dans la littérature (**Tableau 1.3**). De plus, le test de TBARS étant une représentation de la LPO, les quantités de TBARS ont été normalisées à partir des lipides. Si un échantillon contient naturellement plus de lipides, il produira mécaniquement plus de TBARS, même en l'absence d'un stress oxydatif plus intense. En rapportant la concentration de TBARS à la quantité de lipides présentes, on neutralise cette variabilité de substrat et on compare vraiment l'intensité du stress oxydatif d'un échantillon à l'autre. La mesure de l'activité de la GST a été faite dans la glande digestive de la moule. Elle a été faite selon l'une des méthodes utilisées fréquemment par les pairs pour leurs études écotoxicologiques sur la moule *E. complanata* (**Tableau 1.3**). La mesure de l'activité de l'AcChE a également été adaptée et faite dans les branchies et le pied des moules, selon l'une des méthodes les plus efficacement utilisées dans la littérature (**Tableau 1.3**). Ensuite, la VTG, protéine essentielle dans la reproduction, a été mesurée dans les gonades de la moule, en s'appuyant sur la méthode indirecte *alkali labile phosphate* relevées dans la littérature (**Tableau 1.3**). L'extraction des lipides a été adaptée et effectuée à partir d'une méthode utilisant des solvants organiques et leur quantification, à partir de la technique sulfo-phospho-vanilline (SPV) toute

deux décrite dans la littérature et adaptée en microplaque. Le dosage des protéines totales a été fait selon la méthode de Bradford (1976). La mortalité des moules a été suivie et les biomarqueurs sub-individuels, tels que les indices CI et GSI, ont également été calculés selon des formules décrites dans la littérature.

1.3 Objectifs et hypothèses

1.3.1 But et objectifs

Dans l'optique de proposer une nouvelle avenue simple et opérationnelle dans l'évaluation de l'état de santé des milieux fortement influencés par la pollution diffuse par les pesticides, le but principale de cette thèse est l'élaboration d'outils d'évaluation du risque sur l'état de santé d'*Elliptio complanata*, une espèce de moule d'eau douce indigène au Québec et naturellement présente dans les cours d'eau en Montérégie. Ces outils pourront être adaptés pour une évaluation environnementale intégrée de l'effet des pesticides sur la santé des écosystèmes, et ce, en traduisant l'effet des pesticides d'un habitat sur la santé des organismes qui y vivent par le biais de biomarqueurs biochimiques et physiologiques. Cette thèse contribuera à documenter les effets des pesticides majeurs tels que le glyphosate, le thiaméthoxame, le chlorantraniliprole et leurs mélanges sur la moule, ainsi qu'à limiter l'utilisation des pesticides les plus nuisibles dans les tributaires agricoles du tronçon montréalais du fleuve Saint-Laurent en Montérégie-Ouest. Enfin, ce travail favorisera l'avancement des connaissances en écophysiologie, notamment sur *E. complanata*, une espèce faisant partie du groupe d'animaux les plus menacés en Amérique du Nord.

Le premier objectif général de cette thèse est de comprendre l'écophysiologie de la moule *E. complanata* en y adaptant des biomarqueurs pour évaluer la toxicité des pesticides majeurs et en déterminant des valeurs seuils de variation de ces biomarqueurs dans l'environnement. Le deuxième objectif général est d'évaluer et de suivre la contamination des rivières Des Anglais et Châteauguay, affluents agricoles du fleuve Saint-Laurent, ainsi que les impacts toxiques associés aux pesticides, au moyen d'expériences d'encagement.

Pour réaliser les essais biologiques pertinents et éclairés sur l'espèce sentinelle et pour développer, adapter ou utiliser de façon optimale des biomarqueurs à fonction écotoxicologique, il est crucial de connaître la biochimie, la physiologie et le comportement de cet organisme. En plus d'établir des seuils de variation naturel des biomarqueurs pour cette moule, ce projet permettra de mieux comprendre les réponses biologiques d'*E. complanata* aux pesticides majeurs du milieu. Les résultats de cette étude pourront être intégrés sous forme d'indice aidant au diagnostic du risque sur l'état de santé des moules dans le milieu aquatique de la zone d'étude. De façon politico-pratique, l'approche du diagnostic du risque sur l'état de santé de la moule dans le milieu peut-être très utile en tant qu'outil d'aide à la décision pour la protection

des milieux aquatiques et le maintien des usages de l'eau dans la grande région de Montréal. Par conséquent, le MELCC, Environnement Canada, le Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), etc., des institutions tels que le Centre Saint-Laurent, certaines chaires ou instituts de recherche en écotoxicologie, pourraient être intéressés par les résultats de ce projet. Enfin, et en générale, ce projet permettra l'avancement des connaissances scientifiques et contribuera à la protection de la biodiversité du fleuve Saint-Laurent et de ses affluents agricoles.

Les objectifs spécifiques découlant de nos objectifs généraux sont :

1. Mesurer les effets des pesticides sur les fonctions et systèmes biologiques d'*E. complanata*;
 - Évaluer les effets écotoxicologiques précoces des pesticides problématiques (glyphosate, thiaméthoxame et chlorantraniliprole) sur différents biomarqueurs d'*E. complanata* à des concentrations faibles (obj. 1a) ;
 - Évaluer les effets écotoxicologiques précoces de mélanges de glyphosate, thiaméthoxame et chlorantraniliprole sur différents biomarqueurs d'*E. complanata* (obj. 1b) et comparer aux effets observés avec les pesticides seuls (obj. 1c) ;
2. Diagnostiquer la condition physiologique globale d'*E. complanata* dans les rivières agricoles en Montérégie ;
 - a. Étudier les mêmes effets que ceux de l'objectif 1 sur *E. complanata* encagées dans les rivières et caractériser les pesticides aux points d'encagement (obj. 2a) ;
 - b. Comparer les réponses des biomarqueurs entre les sites en amont et en aval de chaque rivière (obj. 2b) ;
3. Déterminer les valeurs seuils de variation naturelle des biomarqueurs d'*E. complanata* et les intégrer en IBR-T avec les réponses des biomarqueurs pour comparer les effets entre les rivières (obj. 3) ;
4. Proposer un indice de risque global pour *E. complanata* dans les rivières en Montérégie ;
 - a. Déterminer un indice de risque des pesticides et un indice des réponses des biomarqueurs (obj. 4a) ;
 - b. Déterminer un indice intégrant les risques des pesticides et les réponses des biomarqueurs (obj. 4b).

1.3.2 Hypothèses

La première hypothèse principale est que les expositions en laboratoire aux pesticides (glyphosate, thiaméthoxame, chlorantraniliprole et leurs mélanges) mèneront à des effets significatifs, même à des

concentrations inférieures aux critères reconnus pour préserver la vie aquatique. Les moules exposées démontreront des changements dans la mesure des différents biomarqueurs lorsque comparées à leur groupe contrôle respectif. Chez les invertébrés aquatiques, l'exposition à certains pesticides, seuls ou en mélange, est susceptible de provoquer des altérations mesurables de la VTG, de la peroxydation des lipides (LPO), de l'activité de la GST et de l'AChE.

De cette hypothèse découlent les hypothèses spécifiques suivantes :

- Le glyphosate, qu'il soit utilisé seul ou sous forme de formulation commerciale telle que Roundup®, pourrait induire un stress oxydatif marqué, se traduisant par une augmentation de la LPO, une modulation dose- et temps-dépendante de la GST et une inhibition partielle de l'AChE perturbant la neurotransmission. La diminution attendue de la VTG résulterait d'une perturbation endocrinienne et d'un réacheminement des ressources énergétiques vers les mécanismes de défense. Ces effets sont cohérents avec les observations rapportées chez *Corbicula fluminea* et *Mytilus galloprovincialis*, où une LPO accrue, des modifications enzymatiques et une baisse de l'expression de la Vg ont été documentées (dos Santos & Martinez, 2014; Fabrello et al., 2020; Matozzo et al., 2020).
- Le thiaméthoxame, ciblant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, pourrait perturber directement la transmission nerveuse et inhiber indirectement l'AChE. Il est également attendu qu'il induise une activation initiale de la GST suivie d'une possible inhibition lors d'expositions prolongées, ainsi qu'une augmentation de la LPO. Une réduction de la VTG pourrait survenir par stress énergétique et déséquilibre hormonal. Ces effets ont déjà été décrits chez *Daphnia magna* ainsi que chez divers mollusques et poissons d'eau douce, avec modulation enzymatique et altération des paramètres de reproduction (Song et al., 2017; Minakshi et al., 2013; Kocamaz & Oruc, 2020; Mukherjee et al., 2022).
- Le mode d'action du chlorantraniliprole, impliquant l'activation des récepteurs ryanodine et le relargage massif de calcium intracellulaire, pourrait générer un stress oxydatif important (LPO accrue) et une stimulation transitoire de la GST. Les effets sur l'AChE seraient indirects, liés aux perturbations cellulaires, et une baisse de la VTG est anticipée en raison d'une allocation énergétique réduite à la reproduction. Des travaux sur *Daphnia magna* et *Chironomus riparius* ont confirmé une augmentation de la LPO, une induction de la GST et des effets négatifs sur la reproduction (Cui et al., 2017; Rodrigues et al., 2015; AlMisherfi et al., 2023; Bitschinski et al., 2024).

- L'exposition combinée de pesticides pourrait entraîner des effets cocktails, additifs, synergiques, entre autres. On s'attend à un stress oxydatif exacerbé (LPO nettement plus élevée que pour les expositions simples), une réponse GST initialement amplifiée suivie d'un possible effondrement, une inhibition plus prononcée de l'AChE et une réduction accrue de la VTG résultant de la combinaison des stress oxydatif, énergétique et hormonal. Les études sur *Corbicula fluminea*, *Daphnia magna* et divers poissons montrent que, dans bien des cas, les effets des mélanges dépassent la somme des effets individuels (dos Santos & Martinez, 2014; Song et al., 2017; Osuna-Flores et al., 2019; Wang et al., 2020; Marins et al., 2021).

E En ce qui concerne l'expérience in situ, notre deuxième hypothèse principale est que l'échantillonnage des cours d'eau à l'étude confirmera la présence de pesticides dans ces milieux, et que les moules qui y sont encagées présenteront des effets similaires à ceux observés en laboratoire. Plus spécifiquement :

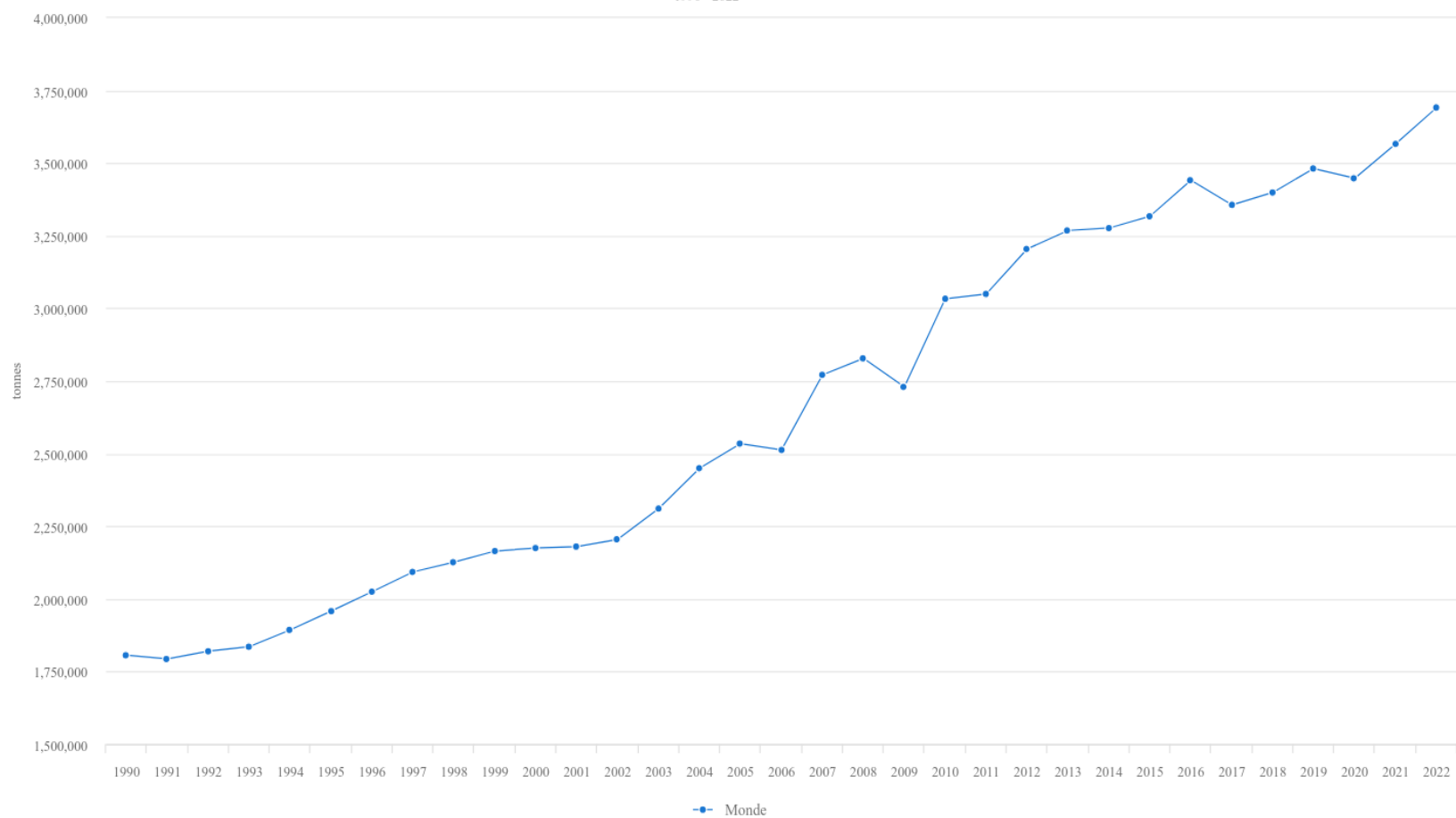
- Présence et gradients de pesticides : Étant donné les quantités de pesticides et les dépassements de critères de qualité rapportés dans la littérature (Tableau 1.1), nous anticipons que les concentrations mesurées dans nos échantillons d'eau seront comparables à celles observées par Feng et al. (2024) et Giroux et al. (2022). En caractérisant les rivières Des Anglais et Châteauguay, nous prévoyons que les sections en aval présenteront une contamination plus élevée que les sections en amont, tant en nombre qu'en concentration de pesticides et de leurs sous-produits. Ces observations devraient confirmer que les gradients de contamination sont liés à l'intensité des activités agricoles. Comme suggéré par les résultats des expositions en laboratoire, des perturbations significatives des biomarqueurs devraient également être observées le long de ces gradients.
- Réponses biologiques des moules : Les moules encagées dans les différents cours d'eau agricoles devraient montrer des altérations de la VTG, de la peroxydation des lipides (LPO), de l'activité de la GST et de l'AChE. Nous nous attendons aussi à ce que les individus encagés en aval des rivières agricoles présentent des perturbations plus marquées de leurs biomarqueurs comparativement à ceux encagés en amont.

Analyse intégrative des données : Enfin, grâce à des méthodes novatrices de traitement des données, nous pourrons analyser un large ensemble de mesures de biomarqueurs afin de déterminer leurs variations naturelles et de mettre en évidence des différences significatives entre les sites. L'intégration des données de biomarqueurs aux données de pesticides au moyen d'indices diagnostiques permettra d'obtenir une évaluation plus complète des impacts potentiels.

ANNEXES : DONNÉES SUR LA QUANTITÉ DE PESTICIDES UTILISÉE (1990-2022).

Pesticides (total) + (Total) - Utilisation à des fins agricoles (%)

1990 - 2022

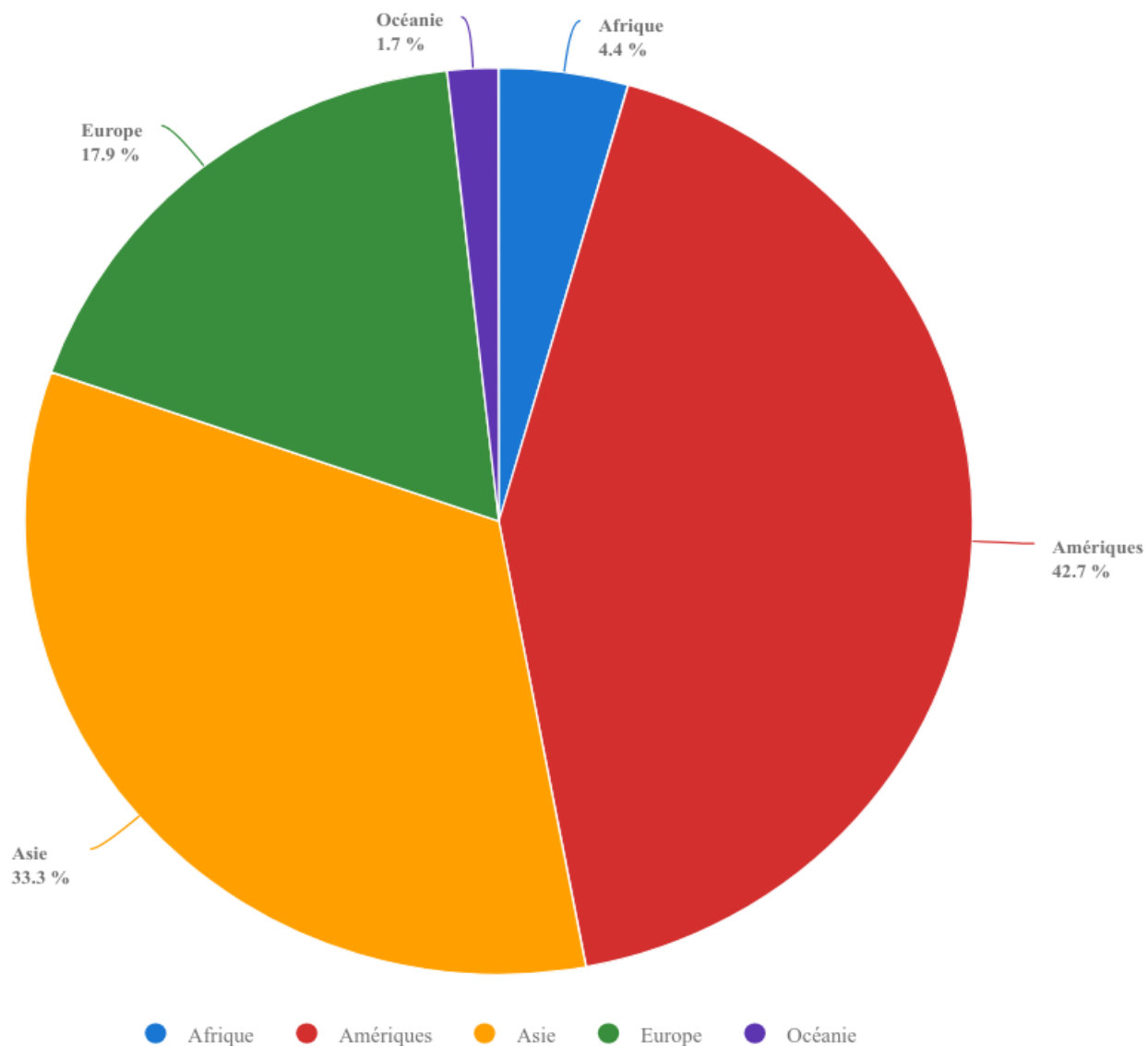


Source: FAOSTAT (2 janvier 2025)

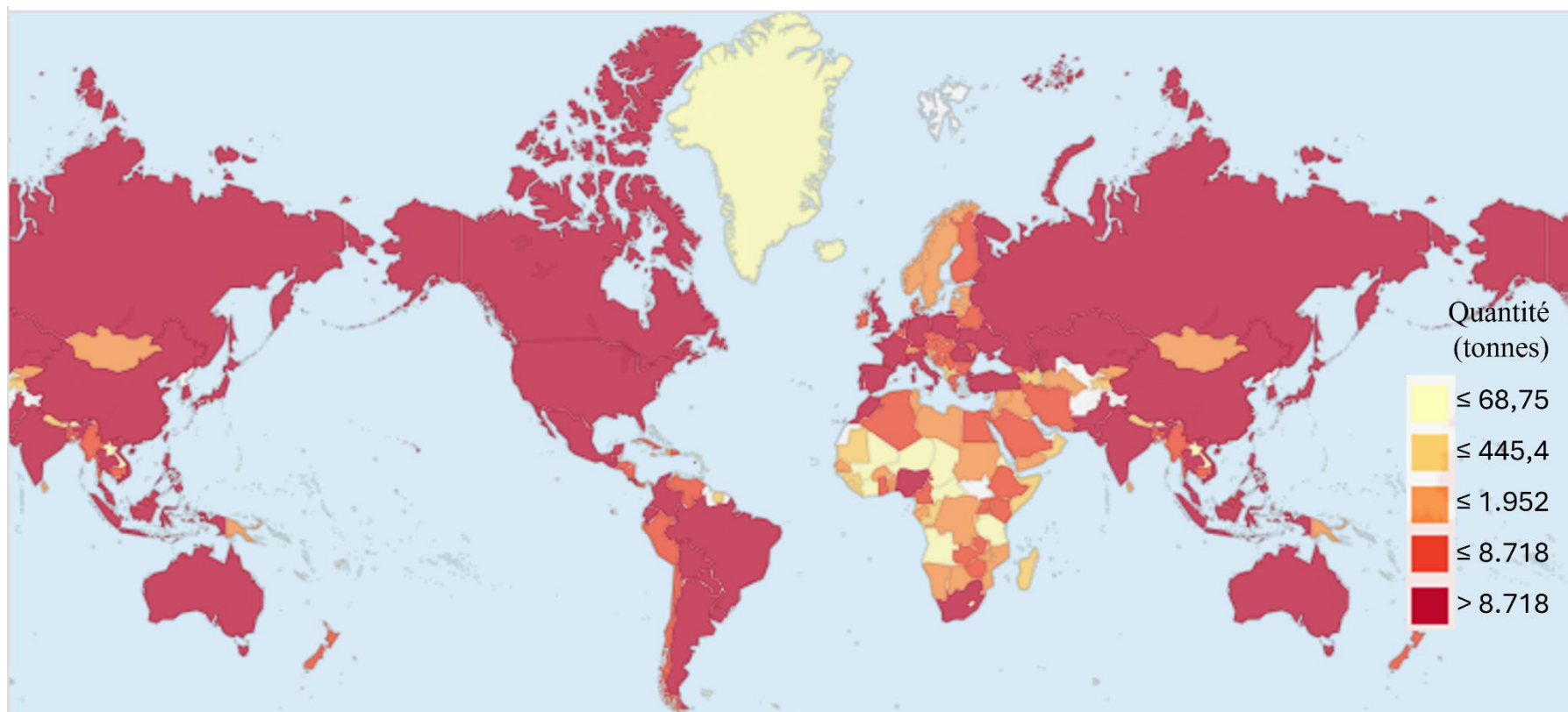
Annexe A. Variation annuelle de la quantité moyenne de pesticides utilisés dans le monde à des fins agricoles de 1990-2022 (FAO, 2024).

Pesticides (total) + (Total) par continent, Utilisation à des fins agricoles

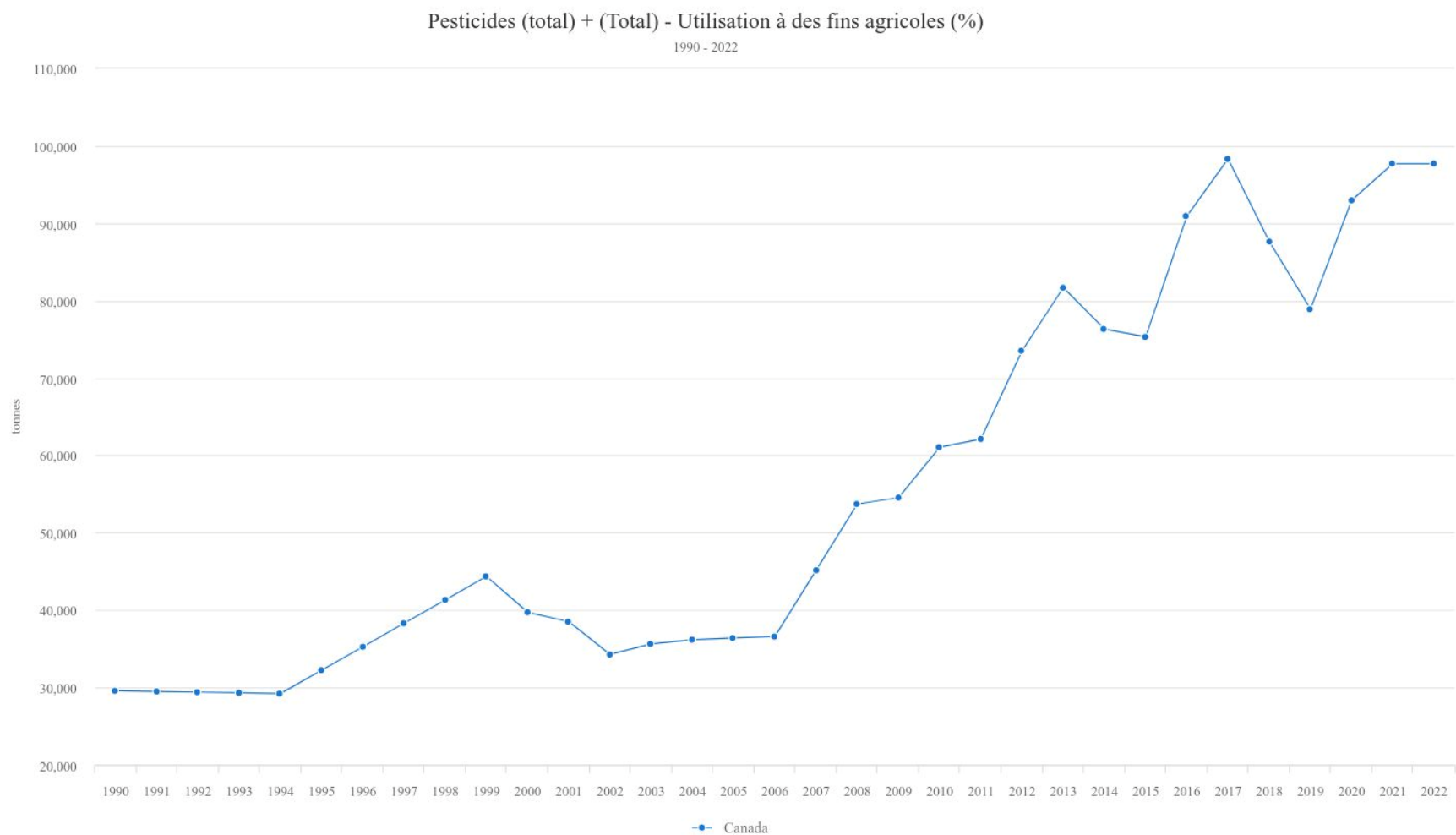
Moyenne 1990 - 2022



Annexe B. Diagramme de classement des pays par proportion de la quantité moyenne de pesticides utilisés à des fins agricoles dans le monde de 1990-2022 (FAO, 2024).



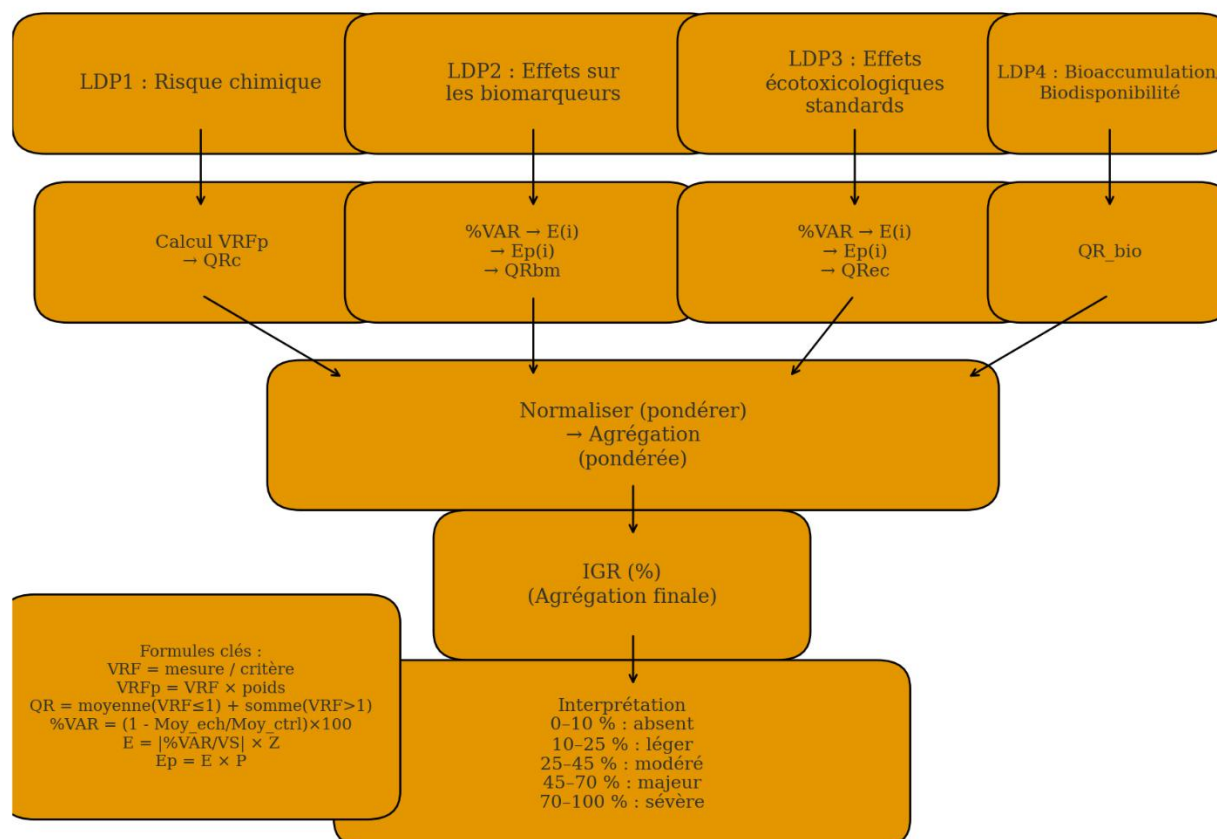
Annexe C. Carte de classement des pays par quantité moyenne de pesticides utilisés à des fins agricoles de 1990-2022 (FAO, 2024).



Source: FAOSTAT (2 janvier 2025)

Annexe D. Variation annuelle de la quantité moyenne de pesticides utilisés à des fins agricoles au Canada de 1990-2022 (FAO, 2024).

Annexe E : Description de l'approche du WoE (Barjhoux et al., 2018, Piva et al., 2011).



Sources : Piva et al. (2011) ; Barjhoux et al. (2018).

Légende :

LDP : Ligne de preuve (ou ligne d'évidence)

VRF : Valeur de Référence (ratio mesure/critère)

VRFp : VRF pondérée

QRc : Quotient de Risque chimique

QRbm : Quotient de Risque des biomarqueurs

QRec : Quotient de Risque des effets écotoxicologiques standards

QR_bio : Quotient de Risque lié à la bioaccumulation / biodisponibilité

IGR : Indice Global de Risque (agrégation finale, 0–100 %)

%VAR : Variation relative en pourcentage d'un biomarqueur par rapport au contrôle

VS : Valeur Seuil (pour biomarqueurs — définie à partir de la distribution de référence, ex. CI95% inférieur)

E(i) : Effet calculé pour le biomarqueur i

Ep(i) : Effet pondéré (E(i) multiplié par la pondération du biomarqueur)

P(i) : Pondération attribuée au biomarqueur i (généralement entre 1 et 3 selon la gravité/pertinence)

Z(i) : Facteur de correction appliqué selon l'amplitude relative de la variation

Annexe F : Démonstration mathématique de la simplification du calcul de l'IBRv2 (Catteau et al., 2023).

Calcul de la moyenne des biomarqueurs de chaque condition.

$$\overline{X_{j,k}} = \frac{\sum_{i=1}^n (X_{i,j,k})}{n}$$

Avec $X_{i,j,k}$ comme la mesures d'un biomarqueur j pour l'individu i ($i = 1, \dots, n$) issu de k condition ($k = 1, \dots, m$).

A, indice d'induction/inhibition ($\overline{Y_{j,k}}$) calculé par rapport à la valeur de référence ($\overline{X_{j,0}}$) d'un biomarker donné (ici k = 0 désigne la valeur de la condition de référence).

$$\overline{Y_{j,k}} = \log\left(\frac{\overline{X_{j,k}}}{\overline{X_{j,0}}}\right) \text{ and } \overline{Y_{j,0}} = \log\left(\frac{\overline{X_{j,0}}}{\overline{X_{j,0}}}\right) = 0$$

Calcul des moyennes et écarts-types des indices d'induction/inhibition tel que présenté dans Sanchez et al. (2013),

$$\overline{Y_j} = \frac{\sum_{k=1}^m (\overline{Y_{j,k}})}{m}$$

$$sd(Y_j) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\overline{Y_{j,k}} - \overline{Y_j})^2}{m}}$$

Puis, standardisation des indices d'induction/inhibition.

$$\overline{Z_{j,k}} = \frac{(\overline{Y_{j,k}} - \overline{Y_j})}{sd(Y_j)} \text{ and } \overline{Z_{j,0}} = \frac{(0 - \overline{Y_j})}{sd(Y_j)}$$

Finalement, le calcul des déviations d'indices :

$$A = \overline{Z_{j,k}} - \overline{Z_{j,0}} = \frac{(\overline{Y_{j,k}} - \overline{Y_j})}{sd(Y_j)} - \frac{(0 - \overline{Y_j})}{sd(Y_j)}$$

$$A = \frac{\overline{Y_{j,k}}}{sd(Y_j)}$$

Ainsi, par simplification du calcul, A représente l'indice d'induction/inhibition ($\overline{Y_{j,k}}$) sur l'écart-type global de Y ($sd(Y_j)$).

Annexe G. Tableau des caractéristiques physicochimiques du thiaméthoxame, glyphosate and chlorantraniliprole (NCBI, 2023,2024, 2025)

Pesticide	Formule	Masse molaire	Log Kow	Point de fusion	Pression de vapeur	Koc	Demi-vie	Volatilité (H)
Matière active	Brute	g/mol	LogP	°C	Pa	L/kg	Jour	atm.m ³ /mol
Thiaméthoxame	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291.71	-0.13	139	6.6×10 ⁻⁹	33–177	16.85	1,9×10 ⁻¹⁵
Glyphosate (acide)	C ₃ H ₈ NO ₅ P	169.07	-3.4 – -4	189–230	1.3×10 ⁻⁵	2600–4900	18.7	2,07×10 ⁻¹⁴
Chlorantraniliprole	C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂	483.15	2.7 - 2.9	209–225	6.3×10 ⁻¹²	153–526	178	10 ⁻⁹ à 10 ⁻¹¹

CHAPITRE II HEALTH EFFECTS OF A GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON *ELLIPTIO COMPLANATA*: MULTI-BIOMARKER APPROACH

Yannick Arnold Nombéré¹, Maxime Gauthier², Monique Boily¹, Lise Parent^{3,*}

1. Université du Québec à Montréal (UQAM), Département des sciences biologiques, 141, Avenue du Président-Kennedy, Montréal, Québec H2X 1Y4, Canada

2. Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 105 Rue McGill, Montréal, Québec H2Y 2E7, Canada

3. Université TÉLUQ, Département Science et Technologie, bureau 1105, 5800 Saint-Denis, Montréal, Québec H2S 3L4, Canada

* Corresponding author. E-mail: lise.parent@teluq.ca (L. Parent).

Research highlights:

- The freshwater mussel *Elliptio complanata* was exposed to a glyphosate-based herbicide Credit® Xtreme and biomarkers were examined.
- GBH causes oxidative damage, and neurotoxicity and modulates lipid metabolism in the mussels.
- The Integrated Biomarkers Response showed a decrease in the mussels' health condition as glyphosate goes up at concentrations found in agricultural rivers.

Article publié dans Journal of Environmental Science

RÉSUMÉ

L'ingrédient actif (a.i) des herbicides à base de glyphosate, le glyphosate, est fréquemment détecté dans les cours d'eau à des concentrations relativement élevées, posant un risque pour les organismes aquatiques, notamment les moules d'eau douce, le groupe animal le plus menacé en Amérique du Nord. Cette recherche vise à évaluer pour la première fois, l'effet d'un herbicide à base de glyphosate sur une moule d'eau douce (Unionid) en utilisant une batterie de biomarqueurs. La moule *Elliptio complanata* a été exposée pendant 21 jours au Credit® Xtreme (à 0, 50, 100 et 150 µg/L a.i. de glyphosate). Une réponse intégrée des biomarqueurs (IBRv2) a été utilisée afin de visualiser l'impact global de chaque concentration d'herbicide à base de glyphosate sur l'état de santé des moules. Les résultats des biomarqueurs ont montré que le glyphosate (utilisé à 100 µg/L et 150 µg/L) induisait une peroxydation lipidique dans les branchies et la glande digestive, et inhibait l'acétylcholinestérase dans le pied et les branchies, indiquant un stress oxydatif et une neurotoxicité. D'autres biomarqueurs ont été affectés à la plus faible concentration de glyphosate testée (50 µg/L) : les lipides (diminution), les triglycérides (augmentation) et, dans une moindre mesure, la vitellogénine (diminution). Pour ces derniers biomarqueurs, les sexes n'ont pas été touchés de la même manière, et ils ne se sont avérés sensibles qu'à 50 µg/L : seules les femelles ont montré une tendance à la diminution de la vitellogénine et des lipides. L'utilisation de l'IBRv2 a permis de distinguer des différences d'effets entre les concentrations. Les valeurs d'IBRv2 ont augmenté avec la concentration en glyphosate, attestant d'une détérioration de l'état de santé des moules (selon les biomarqueurs) lorsqu'elles étaient exposées au Credit® Xtreme à des concentrations réalistes de glyphosate retrouvées dans les rivières agricoles. Cette étude montre que les herbicides à base de glyphosate peuvent altérer la fonction neurologique, induire des dommages oxydatifs et modifier sélectivement le métabolisme d'*E. complanata* à des concentrations relativement faibles.

Mots clés:

Elliptio complanata

Herbicides à base de glyphosate

Biomarqueurs

Stress oxydatif

Neurotoxicité

Réponse intégrée de biomarqueurs

ABSTRACT

The active ingredient (a.i.) of glyphosate-based herbicides, the glyphosate, is frequently detected in waterways at relatively high concentrations, posing a risk to aquatic organisms including freshwater mussels, North America's most endangered animal group. This research aims to evaluate for the first time the effect of a glyphosate-based herbicide on a freshwater mussel (Unionid) using a battery of biomarkers. The mussel *Elliptio complanata* was exposed for 21 days to Credit® Xtreme (at 0, 50, 100, and 150 µg/L a.i. of glyphosate). An integrated biomarker response (IBRv2) was used to visualize the overall impact of each glyphosatebased herbicide concentration on mussels' health conditions. The biomarker results showed that glyphosate (used at 100 µg/L and 150 µg/L) induced lipid peroxidation in the gills and digestive gland and inhibited acetylcholinesterase in the foot and gills, indicating oxidative damage and neurotoxicity. Other biomarkers were influenced at the lowest concentration of glyphosate tested (50 µg/L): lipids (decrease), triglycerides (increase) and, to a lesser extent, vitellogenin (decrease). For the latter biomarkers, the sexes were not affected similarly, and they were only sensitive at 50 µg/L, only females showed a trend toward a decrease for vitellogenin and a decrease for lipids. Using IBRv2, we found a clear discrimination between concentrations, and the index values increased with glyphosate concentration, attesting to the deterioration in biomarker-defined mussel health when exposed to Credit® Xtreme at realistic glyphosate concentrations in agricultural rivers. This study shows that glyphosate-based herbicides can alter neurological function, induce oxidative damage, and selectively modify the *E. complanata* metabolism at relatively low concentrations.

Keywords:

Elliptio complanata

Glyphosate-based herbicides

Biomarkers

Oxidative stress

Neurotoxicity

Integrated biomarker response

INTRODUCTION

Pesticides have brought benefits and continue to be useful for many purposes, such as disease control, landscaping, crop pest control, and eliminating competition between crops. However, there is increasing evidence of their deleterious effects on non-target organisms (Mahmood et al., 2016). Herbicides, as the name suggests, are often used to control weeds in agricultural activities. Glyphosate (N (phosphonomethyl) glycine), a molecule used for this purpose, was first synthesized in 1950, and underwent considerable development in the 1970s and is now the world's most widely used herbicide (Duke, 2020; Hayes and Hansen, 2017). Glyphosate-based herbicides (GBH) are not only used in glyphosate-resistant crops but are also applied in non-resistant crops as well as vegetation control on roadsides, railroad sidings, sports turf installation landscaping, etc. (Duke, 2020). Despite its short half-life in freshwater ecosystems, glyphosate has frequently been detected at relatively high concentrations in surface water worldwide (especially near agricultural fields). For example, in Canada, France, Hungary, Brazil, Argentina, and China, glyphosate maximum concentrations reached 140, 165, 680, 1550, 1600, and 10,000 $\mu\text{g/L}$, respectively (Giroux, 2022; Trégouët and Nirascou, 2006). These values, respective to their country, sometimes exceed the surface water quality guidelines for the protection of aquatic life. Many countries have varying guidelines, which pose significant challenges for a comprehensive and global risk assessment and highlight the need for better documentation of toxic effects in different scenarios. For example, in France, the guideline for technical-grade glyphosate concentration (a.i) is 28 $\mu\text{g/L}$ for chronic exposure (INERIS, 2014), while the maximum concentration found in the country was 165 $\mu\text{g/L}$ (Trégouët and Nirascou, 2006). In Canada, the value is 800 $\mu\text{g/L}$, while maximum concentrations found in waterways are around 140 $\mu\text{g/L}$ (Giroux, 2022). It's worth noting that guideline concentrations are determined using different methods, data choices, and species specificity, as highlighted by CCME (2007) and the European Commission (2011). Concentrations below the guidelines are not necessarily harmless when organisms are chronically exposed (Matozzo et al., 2020), but concentrations above the guidelines imply the organisms could be at risk.

Despite the absence of the shikimate metabolic pathway in most animal species, initially designated as the exclusive target of glyphosate (Cerdeira and Duke, 2006), several effects have been reported in aquatic animals exposed to technical-grade glyphosate (Matozzo et al., 2020). In the smooth scallop (*Flexopecten glaber*) exposed to 10, 100, and 1000 $\mu\text{g/L}$ a.i. of glyphosate, Telahigue et al. (2022) found oxidative damage (increasing the

concentration of hydrogen peroxide, protein carbonyls and malondialdehyde/lipid peroxidation) and effects on fatty acid profile, neurological and antioxidant defense systems (reduced glutathione – GSH content and superoxide dismutase – SOD activity). Using similar concentrations to expose *Mytilus galloprovincialis*, Matozzo et al. (2018) reported effects on the immune system (lysozyme and acid phosphatase activities), neurological system (acetylcholinesterase – AChE) as well as antioxidant enzymes (SOD and catalase – CAT). Both technical-grade glyphosate and a commercial formulation (RoundUp® Plus) induced oxidative stress in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Telahigue et al., 2021). In this study, the commercial formulation was the most toxic, producing more oxidative damage (malonaldehyde, H₂O₂, lipid peroxidation – LPO, and advanced oxidation protein products) and reduced activities of antioxidant enzymes (glutathione-S-transferase – GST, glutathione peroxidase – GPx and CAT) as well as non-enzymatic antioxidant defenses such as ascorbic acid and GSH levels.

Mollusks, especially bivalves, are often organisms of choice for monitoring aquatic pollution because they are filter feeders, and given their relatively long exposure, they are likely to bioconcentrate pollutants and testify the exposure to contaminants found in their environment (Flynn and Spellman, 2009; Narbonne and Michel, 1997). Easy to collect, they can be used as bioindicators and are being studied for the adaptation, development, and use of several biomarkers for an early response of disturbance when exposed to contaminants (Campillo et al., 2015; Reyna et al., 2019). According to Martel et al. (2010), freshwater mussels are the most threatened group of animals in North America. In Canada, they have suffered a drastic decline over the past two centuries. Certainly, the authors report on the causes and consequences of the dramatic decline of freshwater mussel populations in various regions, especially in human populated areas in Canada. Many mussel species are at risk, and one has already disappeared due to invasive species, such as the zebra and quagga mussels, and human activities, such as dams, forestry, and agriculture. Unique species such as *Lampsilis cariosa*, and *Alasmodonta varicosa* are listed as species of special concern, and *Alasmodonta heterodon* as completely extinct from the country (Martel et al., 2010). Agriculture has been recognized as one of the main sources of pesticides in aquatic ecosystems, and along with habitat degradation (Nobles and Zhang, 2011), it exerts important pressure on the mussel populations. To better contribute to the conservation and restoration of freshwater mussel biodiversity, we need to assess the risk of mussel habitat being polluted by pesticides. Thus, *Elliptio complanata*, an Unionid, offers great monitoring potential for the status of pesticide contamination or GBH toxicity since it is widely distributed in the eastern North America area and a Quebec native species (Martel et al., 2010) widely used for biomonitoring or to compare native populations with sites upstream and downstream of an urban wastewater treatment plant (Bouchard et al., 2009; Farcy et al., 2011). *E. complanata* can be found in conventional agriculture areas, consequently exposed to pesticides and almost certainly to GBH, the most used herbicide in North America. However, no *in vivo* studies documenting the effects of glyphosate or its formulations on *Elliptio spp.* have been published. In this study, our goal was to document the

effects of a glyphosate formulation (Credit® Xtreme) on *E. complanata*, using a battery of biomarkers targeting different physiological functions or systems.

When an organism's defense system becomes overwhelmed by oxidative conditions, oxidative stress occurs, which can result in the oxidation of various biological constituents such as proteins, lipids, etc. Because several studies reported oxidative damages following exposures to glyphosate, we used the thiobarbituric reactive substance test (TBARS) to assess the LPO and the GSTs to monitor the antioxidant status. The GSTs are phase II biotransformation enzymes for endogenous compounds such as oxidative damages, but they can also detoxify exogenous toxic compounds by conjugation with glutathione (Jokanović, 2001). The digestive gland and the gills of mussels are both sensitive target organs for oxidative stress as they are exposed to high concentrations of oxygen and pollutants due to their role in digestion, detoxification, gas exchange, and osmoregulation. Indeed, the gills have direct contact with the external contaminated environment (Almeida et al., 2005), and the digestive gland is the main site of xenobiotics biotransformation by antioxidant enzymes (Livingstone et al., 1992). In addition, we measured the total lipids, triglycerides, and protein contents. Indeed, the bivalves primarily store lipids as triglycerides during high food availability periods to serve as energy reserves. In times of need, such as environmental stress, they can maintain metabolism and initiate reproduction (Bhalchandra and Lomte, 2004; Giese, 1966). Energy-reserve compounds such as triglycerides and lipids are good stress indicators in mollusks. It has been shown that organophosphorus pesticides can modulate their concentration. The carbamate, pyrethroid, and organochlorine pesticides can have similar effects in the freshwater bivalve (*Parreysia cylindrica*) (Bhalchandra and Lomte, 2004). The gills and digestive gland can also be affected by lipid peroxidation which can, therefore, impair the energy reserves in lipid forms. Proteins are important food materials used for reproduction, development, and life maintenance. Some protein contents can also be considered as energy reserves. They are known to respond to drugs, metals, and pesticides in different organs of bivalves such as *Lamellidens marginalis*, *Parreysia cylindrica*, and *Corbicula striatella* (Nandurkar and Zambare, 2010; Patil, 2011; Minakshi, et al., 2013; Waykar and Shinde, 2019). They can therefore be used as probable biomarkers for energy reserves in bivalves exposed to glyphosate.

Neurological effects were explored by assessing the AChE activities in the gills and the foot. The AChE is an enzyme involved in synaptic signal transmission, and therefore responsible for the hydrolytic degradation of acetylcholine, which is an important neurotransmitter involved in nerve signalling and muscle contraction (Xuereb et al., 2009). A decrease in the AChE level can reflect acetylcholine accumulation and neuromuscular function impairment. Because the gills are directly at the base of the gas exchange with the contaminated water, they are commonly used to measure AChE activities on bivalves (Gagné et al., 2007 and 2011b; Matozzo et al., 2018). Some freshwater mussels including *E. complanata* possess a powerful muscular foot (Martel et al., 2010). Given the presence of numerous neuromuscular junctions, it seemed essential to measure AChE activity in this organ.

Vitellogenin (VTG) is an important protein in oviparous reproductive capability. It is indeed a key precursor of the egg yolk, crucial for healthy growth and development of oocytes. It provides nutrients the embryo needs to survive (calcium, phosphorus, lipids, magnesium, zinc, etc.). In summary, VTG plays a vital role in supporting embryonic development and ensuring successful reproduction (Babin et al., 2007; Babin, 2008). We choose to quantify VTG in the gonads because it is the principal reproductive site for oocyte maturation and has been the main target for the VTG assay on bivalves in the ecotoxicology context (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2011c). To gain insight into the health and the gonadal integrity, we recorded the condition index (CI) and gonadosomatic index (GSI). Fulton's CI is an expression of growth and sexual maturity and can be used as a general indicator of animal health related to their overall metabolic condition (Fulton, 1902).

Finally, we wanted to diagnose the relative health effect of glyphosate on *E. complanata* through an integrated biomarker response index. In environmental monitoring, biomarkers are particularly difficult to integrate and interpret ecologically by environmental managers, policymakers, and non-specialists. To summarize the response of a set of biomarkers into a single value, we selected the Integrated Biomarker Response (IBRv2) as proposed by Sanchez et al. (2013), and used in field studies (Catteau et al., 2020). The approach was used by Sanchez et al. (2013) to get a clear discrimination of sampling sites such as several streams characterized by various contamination levels, and by Catteau et al. (2020) to assess the positive effect of an artificial wetland on wastewater. Following the deployment of caged *Gasterosteus aculeatus in situ*, the authors were able to integrate the overall biomarkers response of the fish and distinguish the general effects of each site by comparing the IBRv2 among them.

2.1 Materials and methods

2.1.1 Chemicals

Credit® Xtreme (isopropylamine salt - 30.94%, potassium salt - 22.99%, equivalent to 540 g/L glyphosate acid) in the form of isopropylamine and potassium salt, was purchased from Les Moulins Mondou (Mirabel, QC, Canada). Tris(hydroxymethyl)aminomethane and Bradford's reagent were from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Richmond, CA, USA.) The phosphorus standard, vanillin, cholesterol standard, L-ascorbate sodium, and 2-thiobarbituric acid were from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada). The EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit (catalogue No. ETGA-200) was from Cedarlane Co. (Burlington, ON, Canada). The reduced glutathione (GSH) was from Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada). The 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), and the 1,1,3,3-tetramethoxypropane were purchased from Merck KGaA Millipore Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The sulfuric, phosphoric, L-ascorbic, and trichloroacetic acid (TCA), Tek-Select Diff-Stain Kit (catalogue No. K7128), sodium deoxycholate (DOC), bovine serum albumin, and NaOH were purchased from Thermo Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada).

The ethanol was purchased from Greenfield Global – Les Alcools De Commerce Inc. (Boucherville, QC, Canada). The solvents, cyclohexane and isopropanol were acquired from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).

2.1.2 Mussel's handling and exposure

The sampling of freshwater mussels *E. complanata* was held in October 2020 at Lac Bellevue (Réserve faunique de Portneuf, 47°11'30.8"N and 72°13'47.9"W), a wildlife reserve exempt from any agricultural exploitation over a radius of several hundreds of kilometers. Briefly, 125 adults (>5 cm, according to Martel et al., 2010), were collected with a gripper stick, and an underwater bag was used to keep them in the water until they were transferred in polypropylene bags filled with the lake water (7-10 °C). The bags were placed in coolers with bubblers and transported to the aquatic laboratory (UQAM, Montréal, QC, CAN). During the transportation, the temperature was maintained under 10 °C. Mussels were acclimatized according to the methods described by Flynn and Spellman (2009) and Farcy et al. (2011) with slight modifications. The temperature was increased gradually to 15 °C $\pm$ 3.0 °C and the type of water changed progressively from lake water to dechlorinated tap water. The acclimation period was 30 days (relevant depuration time) in a 200 L tank containing 10 cm of a sandy substrate. Animals were fed 3 times a week with Seachem® plankton concentrates (5 mL per 190 L of water) from Seachem Laboratories, Inc. (Madison, GA, USA) and *Raphidocelis subcapitata* microalgae concentrate (50 mL per 190 L of water) grown in our laboratory in standardized algal assay procedure medium (USEPA, 1994). A continuous water flow-through was sustained after each feeding session to maintain sufficient water quality. Before adding the food, the water was monitored for general hardness (75-170 mg/L), carbonate hardness (40-80 mg/L), pH (6.4-6.8), NO₃/NO₂ (0/0 mg/L), dissolved oxygen (DO = 92%-100%), NH₄ (0-0.08 mg/L) and NH₃ (0-0.1 mg/L). The light/dark cycle was 16/8 h.

Mussels were randomly separated into groups of 12 individuals and placed in 20 L aquariums filled with 10 L of dechlorinated tap water. One of the groups was the control and the others were exposed to Credit® Xtreme (50, 100, and 150 µg/L a.i. of glyphosate). Our experiment was done in a large flow through containers (600 L) of multiple 20 L aquariums immersed as deep as their filling level. This design was meant to keep the aquariums in the same rigorous experimental condition to lower the risk of random effect. Credit® Xtreme stock solutions were prepared once a week with nanopure water so that the daily addition of 10 mL to aquariums resulted in nominal concentrations of 50, 100, and 150 µg/L a.i. The aqueous media was renewed every 24 h in freshly washed aquariums. Every stock solution was freshly made weekly. The concentrations selected for the present study represent realistic environmental exposures in agricultural rivers based on previous reports by the Quebec government (Giroux, 2022) and the French Environmental Institute (Trégouët and Nirascou, 2006). The light/dark cycle was 16/8 h and the physicochemical parameters such as CaCO₃, pH, NO₃/NO₂, DO and NH₃ were monitored daily before feeding the mussels and renewing the water. The exposure of mussels lasted for 21 days to meet the

chronic exposure duration requirement of the Canadian Council of Ministers of Environment for freshwater bivalves (CCME, 2011).

2.1.3 Chemical analysis and sample preparation

Credit® Xtreme was sampled and stored at -20 °C until chemical analysis for glyphosate, aminomethylphosphonic acid (AMPA), and metal content (**Appendix A Table S2.1**). After adding the stock solution, 20 mL of the aqueous media was directly sampled (Time = 0 h), 12 h and 24 h after, and stored at -20 °C until chemical analyses to determine the degradation of glyphosate. The 0 h sample was taken once a week (day 1, 8 and 15). The 12 h and 24 h samples were only taken once, the first day to monitor glyphosate degradation. Chemical analysis of the commercial formulation and aqueous media were both performed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) as described by Feng et al. (2024). To ensure the accuracy of the method (between 70% and 130%), quality control (QC) was done by including a spiked sample to a specific level in each analytical batch and then calculating the accuracy (calculated concentration/theoretical concentration). When quantifying pesticides, the ratio between the concentration derived from the calibration curve was calculated and the theoretical concentration to obtain the QC value. The present method QCs were 90% for glyphosate and 102% for AMPA. The concentrations of glyphosate were 43.96 ± 10.7 , 74.50 ± 16.9 , and 164.46 ± 10.7 µg a.i /L (Time = 0 h), proven to be in the same range as the nominal ones (50, 100, and 150 µg/L a.i, respectively – **Table 2.1**). The nominal concentrations were used throughout this article for ease of reading, graphical representation and to avoid confusion. The bioaccumulative potential of glyphosate was not evaluated in our study as this compound neither bioaccumulates nor biomagnifies in aquatic organisms (Gonçalves, et al., 2019; Solomon and Thompson, 2003).

After 21 days, the mussels were dissected on ice, and sexed by observing spermatozoa or oocytes on fresh gonad smears using the Tek-Select Diff-Stain Kit. A few individuals could not be sexed due to the lack of gametes. They were labeled and used in statistical analyses only when biomarkers were not influenced by sex. The gills, digestive gland, gonads, and foot were collected, weighed, and stored at -80 °C. Before analyses, thawed tissues were homogenized on ice in PBS buffer (containing 0.1% L-ascorbic acid) with a Kinematica Polytron PT 1600 E homogenizer (Kinematica AG, Bohemia, NY) using a 5 mm PT-DA 05/2EC-E85 disperser for 20s. The homogenates were stored in 1.5 mL tubes at -80 °C until biomarker analysis.

2.1.4 Biomarkers assays

Oxidative damage

The oxidative damages were analyzed using the thiobarbituric acid reactive substance test (TBARS) as described by Hanna et al. (2022). The homogenates of mussel gills and digestive glands were thawed on ice and centrifuged

(4 °C, 10 min) at 9000 ×g. A volume of 200 µL of supernatant was collected in a 0.5 mL tube and treated with sodium deoxycholate (DOC, to disrupt and dissociate protein interactions) and trichloroacetic acid (TCA) to precipitate protein and neutralize DOC, then centrifuged for a second time. The remaining supernatant was stored at -80°C for triglycerides determination. In parallel, a standard curve of 1,1,3,3,-tetramethoxypropane diluted in saline phosphate buffer (PBS) with 0.1% ascorbic acid was prepared (from 0 nmol/mL to 7.3 nmol/mL). As well as the sample supernatant, 65 µL of the different concentrations of the standard curve were transferred to a 96-well microplate in triplicate, followed by 75 µL of 2-thiobarbituric acid and 50 µL of TCA. The microplate was incubated at 60 °C in the dark for 2 h. After the incubation, the microplate was chilled on ice for 10 min and read using the Varioskan Lux Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). The readout wavelengths were 530 nm and 650 nm for TBARS quantification and turbidity correction, respectively. Results for TBARS are expressed in nmol/mg of lipids.

Acetylcholinesterase activity (AChE)

The measurements of AChE activity were performed in the gills and foot of each mussel. The method was the same as described by Boily et al. (2013), except that the gill and foot homogenates were centrifuged at 112,000 ×g (4 °C, 1 h) with an Optima ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA). AChE activity levels are expressed in nmol/(mg·min) of protein.

Glutathione-S-transferase activity (GST)

The GST constitutes the measurement of the molecular response linked to this enzyme in the mechanisms of detoxification. This assay was done according to Gagné et al. (2015) method, based on the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene to reduced glutathione (GSH) to produce a compound with optical density measured at 340 nm (Boryslawskyj et al., 1988). Digestive gland sample homogenates were centrifuged at 20,000 ×g (4 °C, 15 min). In a 96-well microplate, 200 µL of a reaction solution (1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2-4-dinitrobenzene, 125 mM NaCl, in 10 mM Hepes buffer, pH 6.5) were added to 50 µL of digestive gland supernatant. A kinetic measurement of the microplate absorbance was performed with a Varioskan Lux spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) for 30 min with 2 min intervals, and GST was calculated and expressed in µmol/(mg·min) of protein.

Vitellogenin content (VTG)

The determination of VTG in gonad samples was based on the indirect alkali labile phosphate (ALP) method of Gagnaire et al. (2009). The assay is based on the principle of colorimetric determination of inorganic phosphate such as Stanton's (1968) phosphomolybdenum method (Gagnaire et al., 2009). In our study, the gonads samples were centrifuged at 20,000 ×g (4 °C, 15 min) instead of 15,000 ×g. The optical density was read at 815 nm and

444 nm with a Varioskan Lux spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Vitellogenin indirectly measured by ALP was expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein.

Triglycerides (TGLs), lipid, and proteins contents

Gills and digestive gland triglycerides were assayed with the *EnzyChromTM* kit using 10 μL of the supernatant from TBARS assay. The lipid content was determined to normalize TBARS values. Total lipid extraction was performed using a mix of isopropanol:cyclohexane:water (8:10:11) because they are “non-chlorinated solvents with low toxicity, non-olfactory, non-explosive properties and at low cost” (Smedes, 1999). Samples (220 μL) were transferred in 1.5 mL tubes, 360 μL isopropanol:cyclohexane (8:10) were added, vortexed for about 30 s, incubated for 30 min, and centrifuged at $3000 \times g$ (5 min). The upper organic phase (cyclohexane 150 μL) was transferred in a glass tube (13 mm $\times$ 100 mm) for lipid determination. The method was adapted in microplate from the microcolorimetric Sulfo-Phospho-Vanillin technique from Lu et al., (2008). The tubes were placed in a dry bath to evaporate (95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min), then 200 μL of sulfuric acid (95%) was added and returned to the dry bath for 10 min. The tubes were cooled down on ice, and 3 mL of vanillin-phosphoric acid reagent (0.2 mg/mL vanillin, 4% ethanol) was added. Each tube was vortexed and placed in darkness for 10 min. A volume of 200 μL of each standard or sample was transferred onto a 96-microplate, and the optical density was read at 536 nm with a Varioskan Lux spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). A standard curve was made with the cholesterol standard in cyclohexane. The concentrations of lipids and triglycerides are expressed as mg/g tissue and $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue, respectively. Protein concentration was assayed with supernatants from homogenates according to the Bradford (1976) method. The protein content was used to normalize the values of ALP/VTG, AChE, and GST activities.

Non-biochemical biomarkers

The gonadosomatic index (GSI) is the ratio of the gonads in the soft tissues of the mussel (Gagné et al., 2011c). The condition index (CI) equals “K” which is Fulton’s condition index (Fulton, 1902). They were determined by the following formulas:

$$GSI = \frac{GW}{SW} ; CI = \frac{W}{L^3} \times 100$$

Where: GW (mg) is the gonad weight, SW (mg) is the soft tissues’ total weight, W (mg) is the whole animal weight, and L (cm) is the animal length.

2.1.5 Data processing

Statistical analyses

The values were subjected to statistical analysis for all biomarkers. Data were tested for the normality of distribution (Shapiro-Wilk’s test) and the homogeneity of variance (Levene’s test). For each biomarker, we compared the

treatment groups with the control group using a one-way analysis of variance (1W-ANOVA: treatment) test followed by a Dunnett test to compare the treatment groups to the control and correct the p -values for multiple comparisons. When the proportion of males and females in a group allowed it, we subjected data to a two-way analysis of variance (2W-ANOVA: treatment, sex, and the interaction term treatment $\times$ sex). The mussels that could not be sexed were kept for biomarkers uninfluenced by sex. Therefore, the sex factor (1) and the degree of freedom (40) differed because the ANOVA attributed *NA* (not available) to non-sexed individuals. In case of non-normality or skewed distribution of data, a transformation in the log was applied to meet the normality and homoscedasticity requirement. If the log-transformed data did not fulfill the statistical requirement, we used a Kruskal-Wallis rank sum test (K-W) followed by Dunn's many-to-one test with Bonferroni correction to compare the groups and provide adjusted p -values. Correlations between biomarkers were performed using Pearson's product-moment correlation coefficient test and the principal component procedure, respectively. As Pearson's product-moment correlation matrix contains a lot of comparisons (each biomarker for 48 mussels), Holm's correction was applied to the test. The statistical significance of all tests was set at $p < 0.05$ ($n = 12$ for each treatment). R software (version 4.2.1) was used to perform the statistical tests.

Integrative Biomarker Response (IBRv2) computation

Biomarkers influenced by the treatment were subjected to IBRv2, an index used to assess the general health of mussels well described by Sanchez et al. (2013). We determine a deviation index (A_i) of each experimental condition by applying the following equation:

$$A_i = \frac{\log(\frac{X_i}{X_0})}{S}$$

where X_i is the average value for each biomarker/treatment, X_0 is the reference (control) value, and S is the general standard deviation of the equation numerator.

The A values represent the deviation of each biomarker from the reference value and are displayed in a star plot to visualize the scope of the general difference between the treatments and the control. A negative result for A means that the biomarker value decreased, while a positive one is an increase. As suggested by Catteau et al. (2020), the IBRv2 index is finally determined by the following equation:

$$IBRv2 = \sum_i |A_i|$$

Microsoft Excel (version 2307 Build 16.0.16626.20170) was used to compute the data with the latter formulas and generate the IBRv2 plots.

2.2 Results and discussion

Agriculture contributes to the lower quality of natural habitat for indigenous species. Freshwater mussel populations have been declining over the past centuries, partly due to agricultural activities. Glyphosate-based herbicides (GBHs) are the most widely used pesticides globally and have been detected at relatively high concentrations in agroecosystems that are habitats for indigenous freshwater mussels like *Elliptio complanata*. Our study aims to document the sublethal effects of Credit® Xtreme on *E. complanata* using a suite of biomarkers and to assess the relative health impact through the Integrated Biomarker Response (IBRv2) index. The evaluated effects encompass oxidative stress, neurotoxicity, phase II detoxification and antioxidant mechanisms, reproductive toxicity, and impact on energy reserves and metabolism. Before calculating the IBRv2 index, we analyzed these effects individually to provide an understanding of Credit® Xtreme GBH's impact on specific biomarkers in *E. complanata*.

2.2.1 Exposure environment

The concentrations of glyphosate and some trace metal elements in the commercial formulation Credit® Xtreme were measured. The glyphosate concentration was somewhat higher than the one registered for this product (740 vs. 540 g/L). Also, 13 different heavy metals and metalloids were quantified in the GBH (**Appendix A Table S2.1**). Commercial pesticide formulations sometimes contain metals that can cause oxidative stress. Since we wanted to measure oxidative damage, we wanted to ensure that glyphosate, and not metals, was responsible for the effects observed. However, when Credit® Xtreme was diluted for the present experiment, the concentrations of these metals were negligible and were below the limit of detection (LOD) values.

To determine the glyphosate degradation, glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) concentrations were measured in the exposure media during 24 h (**Table 2.1**). Samples for these analyses were collected during the exposure period, and therefore were from the aquarium containing the mussels (**Table 2.1**). All solutions showed some degradation compared to their nominal concentrations. At Time = 0 h, the concentration of 100 µg/L was 27% lower. At 12 h, the concentrations of 50 µg/L and 100 µg/L decreased by 50% while the concentration of 150 µg/L was 22% lower. The concentrations remain relatively stable until 24 h. This can be attributed to two main factors: the mussel's absorption of the molecule and its subsequent breakdown into transformation products. These processes are influenced by the varying levels of mussel activity and the presence of microorganisms, which fluctuate between day and night.

Table 2. 1 Nominal and measured concentrations of glyphosate and AMPA in the water used for mussels' exposure, collected from 0 h-24 h.

Time (h)	[Nominal glyphosate] (µg/L)	[Measured glyphosate] (µg/L – QC = 90%)	[Measured AMPA] (µg/L – QC = 102%)	Relative difference ^a (%)
0	Ctrl	< LOD	-	-
	50	55.0	0.18	10 ^b
	100	73.1	0.13	27
	150	167	0.48	12 ^b
12	Ctrl	< LOD	-	-
	50	25.8	0.17	48
	100	48.5	0.34	52
	150	117	0.68	22
24	Ctrl	< LOD	-	-
	50	28.7	0.32	43
	100	50.5	0.50	50
	150	110	1.29	29

LOD: Limit of detection; QC: Quality control.

^a Relative difference: the difference between measured and nominal concentration.

^b The relative difference was positive because the measured concentration was greater than the nominal one.

“-”: not measured.

The AMPA being the principal transformation product of glyphosate, its concentration increased as the glyphosate concentration decreased, suggesting the degradation of glyphosate over time in each aquarium. However, the decrease of the glyphosate concentration does not match the increasing concentration of AMPA. We hypothesize that this could be explained by glyphosate degradation into transformation products other than AMPA or by the bioconcentration of some of them in the mussels. During the whole experiment, the physicochemical parameters of the exposition water remained stable and there was no mortality in any treatment.

2.2.2 Biomarkers responses

In this study, we evaluated for the first time, the effects of one of the commercial formulations of glyphosate (Credit® Xtreme) on physiological functions and systems of *E. complanata*. The relevant biomarkers' response values are presented in the figures and those with no statistical significance are summarised in **Appendix A Table S2.2**. The details of the statistical treatments result are consigned in supplementary data (**Appendix A Table S2.3**). Post-hoc the statistical models, Dunn and Dunnett tests' results, showing significant differences in biomarker responses that were recorded between treated, and the control mussels are indicated by asterisks in the figures.

Oxidative damages

After 21 days of exposure, the oxidative damages were measured in the digestive gland and the gills of the mussels. In the digestive gland, we found no significant difference between sexes (2W-ANOVA, $p > 0.05$, $F_{3,38}=0.16$) but a significant result with the treatment (2W-ANOVA, $p < 0.05$, $F_{3,38} = 3.85$) and only for the concentration 150 µg/L (**Fig. 2.1a**). In the gills, a significant effect of glyphosate on *E. complanata* (2W-ANOVA, $p < 0.05$, $F_{3,38} = 3.06$,) and a slight significance (tendency) between the sexes (2W-ANOVA, $p < 0.1$, $F_{2,38} = 2.91$) were revealed. We further investigated whether any notable differences could be seen by sex, but the results were not conclusive; in females, a slight increase (tendency) at 150 µg/L (**Fig. 2.1b**), and in males, a higher TBARS value at 100 µg/L (**Fig. 2.1c**) were noted. At the concentration of 100 µg/L, the thiobarbituric reactive substances (TBARS) values for males were higher than those of the females, suggesting a possible higher sensitivity of males regarding oxidative damage. It should be noted that for the 50 µg/L treatment, there were not enough males to include them in the statistical treatment as the ANOVAs or the Kruskal-Wallis tests need at least 3 individuals to be performed. Several studies have found increasing oxidative damage in the gills of freshwater bivalves exposed to atrazine, deltamethrin, cypermethrin, monocrotophos (dos Santos and Martinez, 2014; Köprücü et al., 2008; Mundhe and Pandit, 2014), municipal effluents (Gagné et al., 2004, 2011a, 2011c), or GBH, Roundup and Glifosato ATANOR (dos Santos and Martinez, 2014; Iummato et al., 2013, 2024). However, in those studies, freshwater bivalves like *Limnoperna fortunei*, *Diplodon chilensis*, and *Corbicula manilensis* exhibited oxidative stress at much higher glyphosate concentrations (3, 4, 6, and 10 g/L) than in the present study (Iummato et al., 2013, 2024; dos Santos and Martinez, 2014). This suggests that *E. complanata* is more sensitive than these species. Moreover, oxidative stress was

observed with *M. galloprovincialis* exposed glyphosate concentrations similar to those in our study (Wided et al., 2021). According to our results, both sexes are susceptible to oxidative damage at the glyphosate concentrations (representative of the agricultural environment). The TBARS test reflects the free radical-induced oxidative damage to cells due to the peroxidizing lipids of the membrane. Subsequent effects could be the loss of membrane integrity, permeability, and fluidity, therefore affecting the gas exchange ability of the gills and the digestive gland's nutrient absorption and detoxification abilities (Abidli et al., 2021).

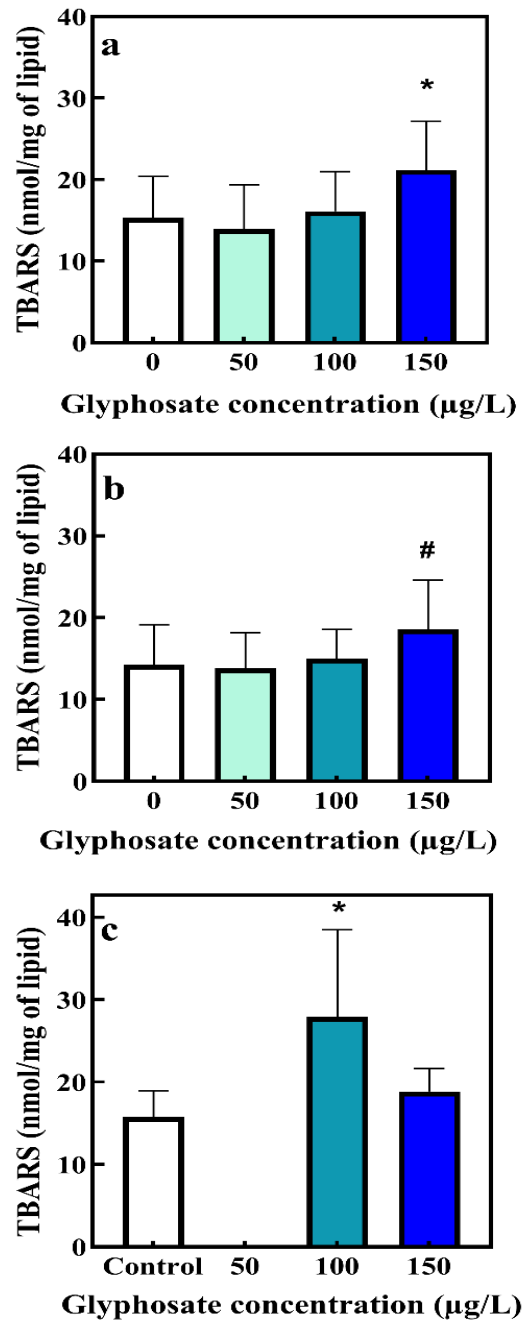


Figure 2. 1 Oxidative damages in *E. complanata* exposed to glyphosate. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in *E. complanata* digestive gland (a) and gills of females (b) and males (c) following exposure to glyphosate. The values are means $\pm$ SD ($n = 12$) and were compared between treatments and the control by Dunnett's test. The dash indicates a tendency and the asterisk statistically significant difference: # $p < 0.1$, * $p < 0.05$.

Neurological effect

In the present study, we found that glyphosate significantly decreased *E. complanata*'s acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills (2W-ANOVA, $F_{3,38} = 6.70$, $p < 0.001$) and the foot (2W-ANOVA, $p < 0.001$, $F_{3,38} = 11.8$) (**Fig. 2.2a and b**) at the two highest concentrations. The enzyme was 63% down at 100 µg/L and 60.6% down at 150 µg/L (**Fig. 2.2a**) compared to the control. AChE activity in the foot decreased significantly at 150 µg/L (by 29%, $p < 0.05$) and very significantly at 100 µg/L (by 48%, $p < 0.001$, **Fig. 2.2b**). Significant inhibitions of AChE activity have also been found in *F. glaber* to 100 µg/L and *M. galloprovincialis* to 50 µg/L and 100 µg/L technical grade glyphosate (Thelahigue et al., 2022; Wided et al., 2021). The inhibition of the AChE activity by organophosphorus pesticides is well known for several animal species including freshwater bivalves (Mundhe and Pandit, 2014). There are also several examples of decreased AChE activity in *E. complanata* following exposure to certain municipal effluents (Gagné et al., 2007; 2011b). Even if glyphosate is not an organophosphorus compound, it has been shown that the technical grade and some GBHs can be neurotoxic to bivalves such as *F. glaber* (Thelahigue et al., 2022), *M. galloprovincialis* (Matozzo et al. 2018) and *Perna perna* (Sandrini, 2013). Just as in our experiment with *E. complanata*, the AChE inhibition was observed at comparable glyphosate concentrations in *F. glaber* and *M. galloprovincialis*, suggesting that *E. complanata* is as sensitive to the neurotoxic effects of glyphosate as these other bivalve species. More importantly, our results demonstrate that this GBH can strongly decrease AChE in the gills and foot of a freshwater mussel at concentrations realistic in agroecosystems. A lower AChE activity can affect oxygen exchange in the gills and accentuate oxidative damage (Chen et al., 2022) and, consequently, can alter respiratory and osmoregulatory functions. The foot is part of some of *E. complanata*'s prime functions. Indeed, the mussel population aggregation varies over the seasons, closely linked to reproduction due to the clumping of the mussels during the spawning season (Flynn and Spellman, 2009; Martel et al., 2010). Also, *E. complanata* burrowing depth into the sediment is sexually dimorphic; females burrowed significantly deeper than males (Flynn et al., 2013). In the wild, a decreased AChE activity in the foot could then negatively alter the *E. complanata* reproduction cycle.

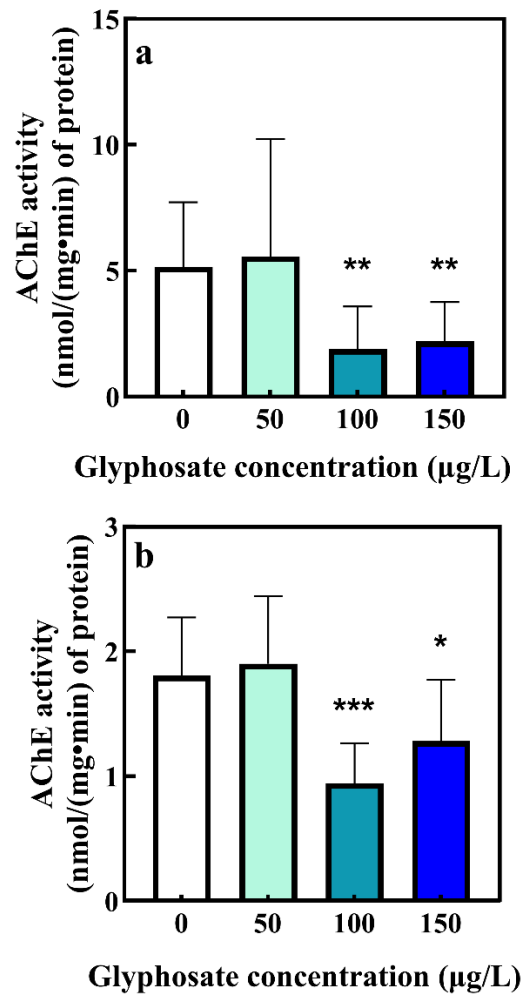


Figure 2. 2 Acetylcholinesterase (AChE) in *E. complanata* exposed to glyphosate. AChE activity in *E. complanata* gills (a), and foot (b). The values are mean $\pm$ SD (n = 12). The asterisks indicate statistically significant differences compared to controls by Dunnett's test: * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001.

Phase II detoxification and antioxidant mechanism effect

In the present study, glutathione-S-transferase (GST) activity remained the same at each of the concentrations tested compared with the control, after 21 days of exposure (2W-ANOVA, $p > 0.05$, $F_{3,38}=0.26$ – **Appendix A Tables S2 and S3**). However, this does not appear to be the case since oxidative stress products in the digestive gland of bivalves can trigger a higher GST activity as observed in *Limnoperna fortunei* exposed to 6 mg/L of glyphosate (Iummato et al., 2013). dos Santos and Martinez (2014) also found no change in GST activity in the digestive gland of *Corbicula manilensis* when exposed to 2 mg/L and 10 mg/L of glyphosate for 96h. Iummato et al. (2024) observed an increase in *Diplodon chilensis* GST activity at a glyphosate concentration of 4 mg/L after 7 days of exposure. However, this effect disappeared after 14 days. Significant variations in primary antioxidant status were also noted, with an increase in SOD activity (dos Santos and Martinez, 2014; Iummato et al., 2024) and a decrease in CAT activity (dos Santos and Martinez, 2014). Moreover, *M. galloprovincialis* was the most sensitive species at concentrations like those we used in our study. Their GST activity increased on the 4th day but decreased on the 7th, while CAT activity increased on both days (Wided et al., 2021). In our study, the role of antioxidant enzymes should be considered the main reason for the lack of change in GST activity. When assessing the impact of glyphosate on *E. complanata*'s antioxidant status in the digestive gland, it is important to consider primary antioxidant enzymes. However, GST remains significant in biomonitoring as it is a non-selective detoxification enzyme. Thus, the fact that GST is a phase II biotransformation enzyme may play a role in his activation latency. This is particularly relevant because Mottier et al. (2014) found an increase in GST gene expression without any impairment of GST activity when *Crassostrea gigas* was exposed to glyphosate up to 100 µg/L for 56 days.

Vitellogenin (VTG), gonadosomatic index (GSI), and condition index (CI)

Our results show that the VTG concentration was significantly different between the sexes (2W-ANOVA, $p < 0.05$, $F_{2,38}=4.91$; **Fig. 2.3**) and the glyphosate exposure (2W-ANOVA, $p < 0.05$, $F_{3,38}=3.93$) according to the two-way ANOVA (**Appendix A Table S2.3**). However, subsequent analysis on males (minus the 50 µg/L group with too few individuals) proved to be non-significant (1W-ANOVA, $p > 0.05$, $F_{2,9}=0.07$) while a significant model was found for females (1W-ANOVA, $p < 0.05$, $F_{3,28}=3.28$) but only the dose 50 µg/L showed a tendency to be different from the control group (**Fig. 2.3b**). These results, although non-significant, would merit further investigation as this non-monotonic effect is suspected of being an endocrine disruption result led by the presence of xenoestrogens (Bouchard et al., 2009). Vandenberg et al. (2012) stated that non-monotonic effects and low-dose responses are commonly observed in endocrine disruptors studies. These phenomena exhibit a nonlinear relationship between dose and effect, where the slope of the response curve changes sign within the examined dose range. When non-monotonic concentration-response curves are present, the effects observed at high concentrations cannot reliably predict the effects at low concentrations (Vandenberg et al., 2012). Furthermore, Defarge et al. (2018) demonstrated

that glyphosate and its commercial formulations can disrupt the endocrine system. Therefore, our results may be a consequence of endocrine disruption caused by Credit® Xtreme. Moreover, studies with *E. complanata* have shown that complex urban effluents strongly increase VTG, leading to the feminization of males and, consequently, an altered GSI (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2011c). These results shed light on the presence of oestrogenic compounds in urban effluents and their effects on mussels. Technical-grade glyphosate also increases the VTG in the gonads of the freshwater mussel (*L. fortunei*) exposed to relatively high concentrations (3 mg/L and 6 mg/L) for 26 days (Iummato et al., 2013). Roundup can modulate VTG in *M. galloprovincialis* gonads exposed to 100 µg/L and 1000 µg/L; in males, VTG concentration decreased on the 7th day and strongly increased on the 21st day, while in females, a significant decrease was observed on the 21st day (Fabrello et al., 2020). This suggests that *E. complanata* is less sensitive than *M. galloprovincialis*.

Furthermore, glyphosate (Credit® Xtreme) had no significant effects on the GSI and CI of mussels (**Appendix A Tables S2 and S3**). However, we found a difference in the GSI between sexes (2W-ANOVA, $p < 0.01$, $F_{2,38}=5.8535$), but it was only 11% for all the mussels used in the experiment. CI is known to be modulated along with reproductive parameters such as spawning, VTG, or GSI, and when animals are exposed to environmental stress such as contaminants, overcrowding, and starvation (Farcy et al., 2011; Peddicord, 1977). In our study, *E. complanata* was not spawning and we showed that VTG and GSI were insignificantly affected during the whole experiment. If the CI was to be affected, it would have been attributed to the glyphosate. However, CI does not always respond to contaminants, as Roesijadi and Anderson (1979) showed in their study. The authors exposed *Macoma inquinata* to oil-contaminated sediments in 2 experiments and 33% of the treatment group from the first experiment died after 38 days, although their CI was not significantly different from the control group.

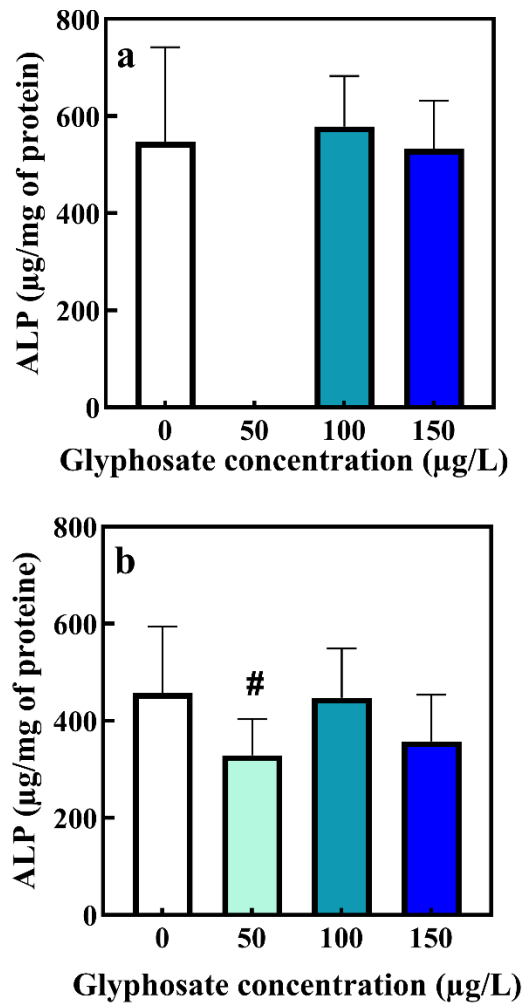


Figure 2. 3 Vitellogenin – indirectly measured by alkali-labile phosphate (ALP) technique – in *E. complanata* males' (a) and females' (b) gonads, expressed in ALP µg/mg of protein. The values are mean + SD (n = 12). The dash indicates a tendency compared to controls by Dunnett's test: # $p < 0.1$.

Energy reserves and their metabolism

In our experiment, mussels exposed to increasing concentrations of glyphosate did not demonstrate changes in triglyceride (TGL) concentrations in the digestive gland. However, we found a very highly significant model for the gills (2W-ANOVA, $p < 0.001$, $F_{3,38}=9.88$). The Dunnett comparison test reported a very significant increase ($p < 0.01$) of TGLs for the 50 $\mu\text{g/L}$ treatment (**Fig. 2.4a**). Unlike the TGLs, lipids showed no significant difference at any concentration in the gills. Lipids of the digestive gland prove to be different between sexes (2W-ANOVA, $p < 0.01$, $F_{3,38}=6.92$) and strongly influenced by the glyphosate (2W-ANOVA, $p < 0.001$, $F_{2,38}=9.09$) with a significant interaction term between sex and glyphosate (2W-ANOVA, $p < 0.001$, $F_{4,38}=7.68$). When the data were tested within their respective sex, we found no significant change for the male group, but the female one showed a very significant model (1W-ANOVA, $p \leq 0.01$, $F_{3,28}=6.56$) with a decrease of lipids at 50 $\mu\text{g/L}$ (**Fig. 2.4b**). We also measured total proteins in the digestive gland, gills, gonads, and foot of the mussels and found no significant change related to glyphosate exposure in our experiment (K-W: $\chi^2_3 = 4.08$; $\chi^2_3 = 0.99$, $F_{3,38} = 2.64$, and $F_{3,38} = 1.92$, respectively; $p > 0.05$; **Appendix A Tables S2 and S3**).

Given that TGLs are primarily stored as energy reserves in bivalves, their impairment can affect *E. complanata* metabolism, or reproduction, etc., during times of stress (Bhalchandra and Lomte, 2004; De Zwaan and Mathieu, 1992; Giese, 1966). Bhalchandra and Lomte (2004) had some observations with different pesticides and species that can partially explain the mechanism behind these results. They recorded an increase of lipids in the mantle, foot, gills, digestive gland, and the whole soft tissues of *P. cylindrica* when exposed to carbamate, pyrethroid, and organochlorine pesticides. They hypothesized that a glycogen transformation into fatty acids and TGLs followed the exposure of bivalves to pesticides. They also proposed lipase activity inhibition and a shift in carbohydrate and protein metabolism to lipogenesis. Although the results were not concentration-dependent, the increase in TGLs may be linked to low concentrations of glyphosate. That might be the result of a perturbation of lipid metabolism either enhancing or lessening the TGL synthesis or metabolization, respectively. As of today, we have no current evidence to support this interpretation, and further studies on the lipid metabolism in gills will be needed to comprehend the effect of glyphosate on *E. complanata* at low concentrations.

Frontera et al. (2014) showed a decrease in the metabolic rate and an increase in glycemia in crayfish *Procambarus clarkii* exposed chronically to glyphosate (22.5 mg/L). It was also recorded that glyphosate can lower the energy reserve (glycogen and lipid) in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Frontera et al., 2011). Secondly, it is known that some ethoxylated surfactants can induce TGLs accumulation or preadipocyte proliferation in 3T3-L1 cells (Kassotis et al., 2017). Therefore, as many commercial formulations, Credit® Xtreme active ingredient might be responsible for lipid metabolism disturbances and may contain surfactants that could promote TGLs accumulation. We observed modulation only at the lower concentration which means that glyphosate

can disturb *E. complanata* metabolism or energy reserve at low concentrations relative to agricultural environment. However, our responses were non-monotonic similar to our VTG results. This type of response could be linked to endocrine disruption (Vandenberg et al., 2012) caused either by the a.i. glyphosate or the commercial formulation (Defarge et al., 2018), as previously suspected for VTG. However, further studies are needed to confirm our suspicion.

Moreover, our result can be interpreted at individual or population level. First, *E. complanata* is a short-term brooder and its reproduction occurs only in the summer when the water temperature increases. We collected our mussels in autumn, which means they had already released their glochidium larvae long ago and the females had already started accumulating lipids for the next spawning season (Martel et al., 2010). That can explain the sexual dimorphism in the lipids content for the species. Secondly, the low concentration of glyphosate can cause a lipid content impairment in the digestive gland of the mussels. And finally, all the statistical model results, including the interaction between glyphosate and sex, mean that low concentration of glyphosate (50 µg/L) disrupted lipid intake/storage in females during non-reproductive periods. All things considered; the digestive gland lipid content can be relevant complementing *E. complanata* reproductive health assessments *in situ* biomonitoring.

Protein contents may also be part of the energy reserve of an animal because, during toxic stress, proteins can be needed to meet the energy demand (Lomte and Alam, 1982). Similar to our results, Matozzo et al. (2018) reported unchanged protein content in the digestive gland and gills of *M. galloprovincialis* when exposed to glyphosate at 10, 100, and 1000 µg/L. However, high glyphosate concentration (22.5 mg/L) decreased *C. quadricarinatus* muscle protein levels (Frontera et al., 2011). Other pesticides have caused the depletion of freshwater mussels' protein contents in different tissues. Indeed, indoxacarb (0.08 mg/L and 0.39 mg/L), thiamethoxam (2.58 mg/L and 12.89 mg/L), and triazophos (0.73 mg/L and 3.67 mg/L) caused a significant decrease in protein contents in the gills, gonads, mantle, digestive gland, and foot of *Lamellidens marginalis* and *Parreysia cylindrica* (Mahajan, and Zambare, 2013; Patil, 2011). Toxic stress can increase the proteolytic activity and metabolic utilization of proteins, explaining the protein level in the latter studies (Neelamegam et al., 2006). In our study, low concentrations of glyphosate prevented fluctuations in mussel protein reserves. This result is even more important as several of our biomarkers are normalized by the protein concentrations in the tissues. To further evaluate the effects of glyphosate on the energy metabolism of *E. complanata*, the cellular energy allocation could have been measured as proposed by De Coen and Janssen (2003). The authors described the latter biomarker as the ratio between the energy reserves (protein, and lipid contents, glycogen, and glucose) and the energy consumption at the mitochondrial level (with the electron transport system activity as a biomarker – De Coen and Janssen, 2003).

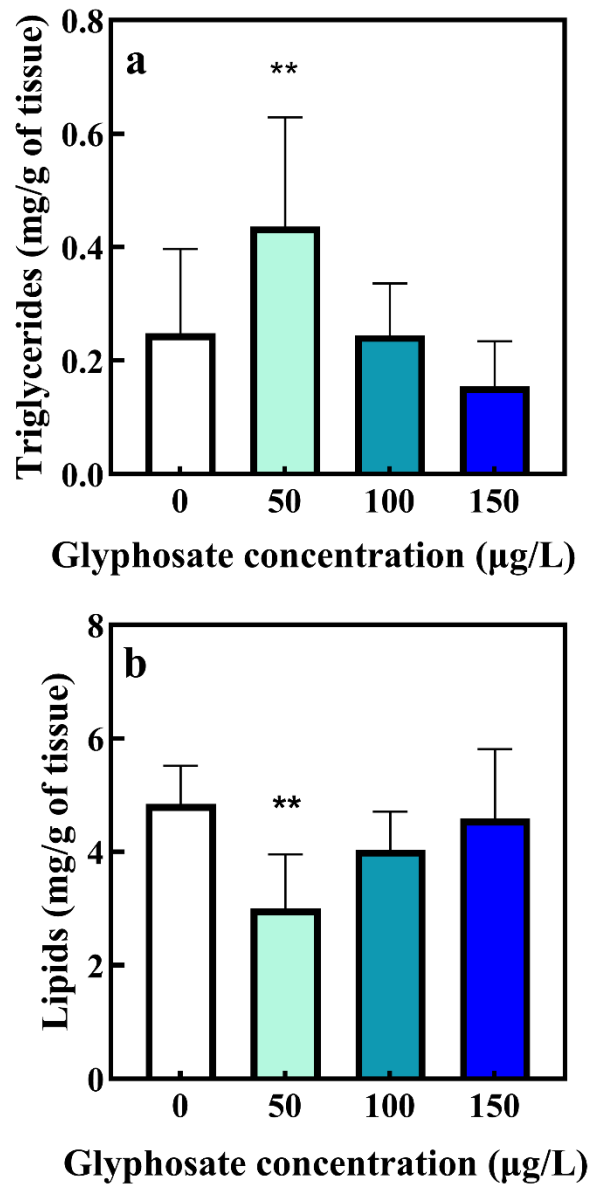


Figure 2. 4 Triglycerides concentration in the gills (a) and lipids content in females' digestive gland (b). The values are mean $\pm$ SD (n = 12). The asterisks indicate statistically significant differences compared to controls by Dunnett's test: ** $p < 0.01$.

Correlations between biomarkers

On completion of the various biomarker assays, we expected to find correlations between some of them, as in several studies in which *E. complanata* was exposed to municipal effluents, either in the laboratory or in situ (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2004, 2007, 2011a, 2011c). The Pearson product-moment correlation coefficient test only illustrated positive correlations after applying Holm's correction. In the digestive gland, correlations were found between the TBARS and triglycerides, the GST, and the proteins ($p < 0.01$). Proteins and lipids were both strongly correlated with the triglycerides ($p < 0.0001$). In the gills, the lipids were correlated with the proteins ($p < 0.01$). For biomarkers in different organs, only the gonads' proteins were correlated to the digestive gland's triglycerides (The corrected p -values are reported in **Appendix A Table S2.4**). These correlations were also visible in the PCA, where the PC1 and the PC2 explained respectively 22.4% and 15.6% of the variance (**Fig. 2.5**). Several studies have demonstrated correlations between different biomarkers, including those that are the subject of this article. Indeed, after exposure of the mussel *E. complanata* to municipal effluents, the level of VTG was correlated with the TBARS (Gagné et al., 2011c) and the GSI (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2007). The TBARS were correlated with the GSI (Gagné et al., 2004) and significantly correlated with AChE activity (Gagné et al., 2007). For another bivalve (*Unio elongatulus eucirrus*) exposed to deltamethrin, the researchers found that there was a negative correlation between TBARS and glutathione (Köprücü et al., 2008). However, in our study, the correlations were different. The positive correlation between TBARS and triglycerides, and proteins in the digestive gland can be explained by the fact that triglycerides and proteins are not the main target of reactive oxygen species which mainly attack membrane phospholipids containing unsaturated fatty acids (Girrotti, 1985). The positive correlation between GST and TBARS is biologically relevant because GST is an antioxidant enzyme. Indeed, GST being a nonselective detoxification enzyme, plays a role in the biotransformation of reactive oxygen species and oxidative stress products (Jokanović, 2001). Therefore, given that GST activity and TBARS are both implicated in the oxidative stress response, a positive correlation between these two markers is to be expected in organisms exposed or not to contaminants. To further understand this relationship, an investigation of GST gene expression and its correlation with oxidative stress may be needed.

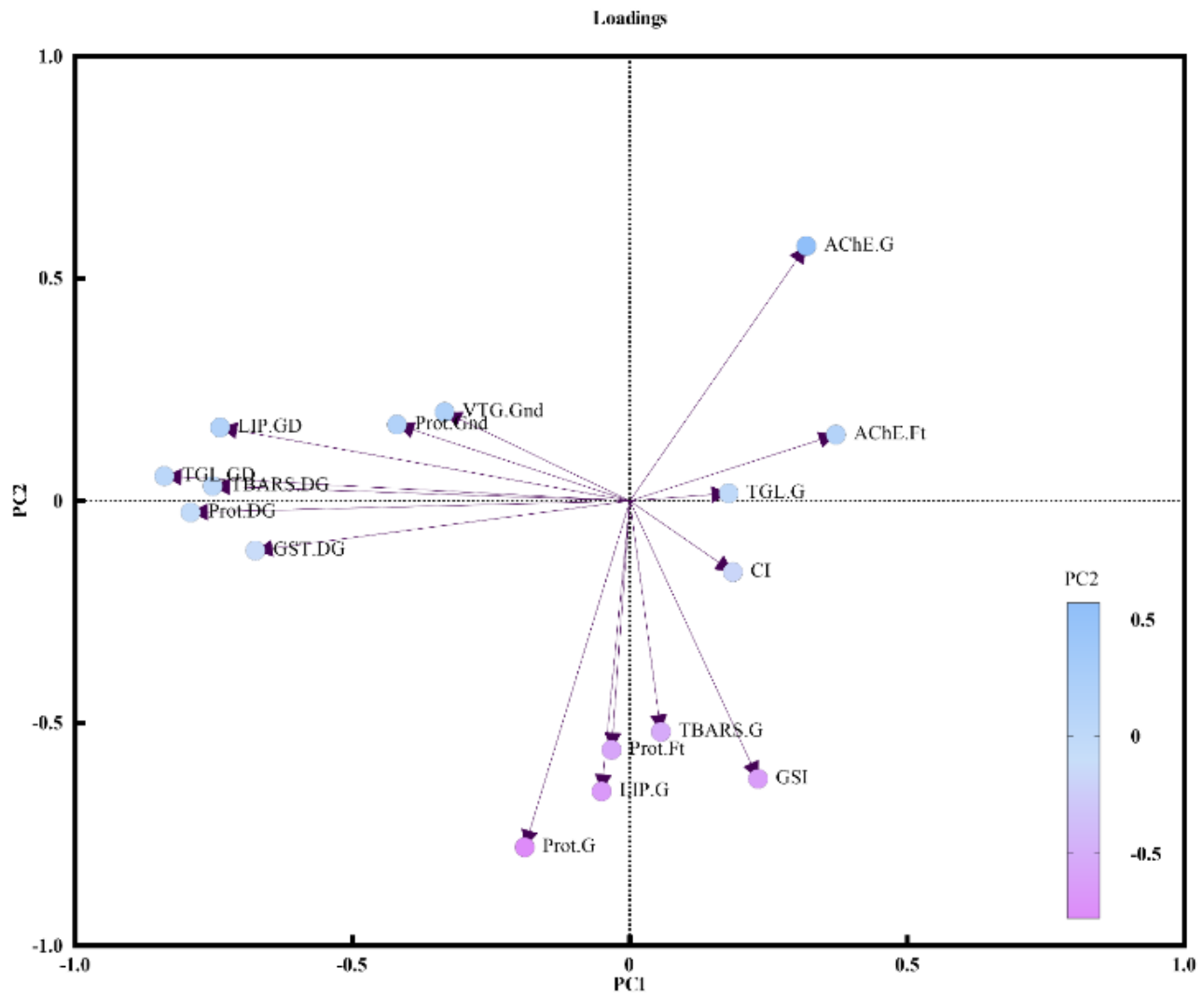


Figure 2. 5 Principal component analysis (PC1 and 2). TBARS (thiobarbituric acid reactive substances); AChE (acetylcholinesterase activity); GST (Glutathione-S-transferase); VTG (vitellogenin content); CI (condition index; G (Gills); DG (digestive gland); G (gills); Ft (foot); Gnd (gonads); LIP (lipids); TGL (triglycerides); Prot (proteins).

Relative effect on the general health of *E. complanata*

Finally, biomarker modulations are represented by the deviation from the control baseline in the star charts (**Fig. 2.6**). Overall, a clear discrimination is made between mussels exposed to glyphosate, and the calculated IBRv2 scores are concentration-dependent. More precisely, the lowest concentration (50 µg/L) has a score of 6.61, while the intermediate concentration (100 µg/L) and the highest (150 µg/L) have scores of 7.60 and 9.92, respectively. The IBRv2 index is often used to integrate biomarker responses for environmental monitoring. This index does not provide information on the health status of an organism, but it is helpful to report an integrated and coherent level of sub-lethal effects. In our study, it allowed us to discriminate the effects of increasing concentrations of a GBH. Indeed, the concurrent augmentation in the IBRv2 values with the glyphosate concentrations simply shows the increasing influence of this GBH on physiological functions and systems of *E. complanata*. Therefore, we hypothesize that GBH contributes to the global health deterioration of this mussel in agroecosystems. To better understand the extent of GBH influence on this mussels' health, an ecophysiological dimension is crucial to consider. Indeed, biomarker levels can fluctuate naturally *in situ* as a response to multiple variables (e.g., geographical distribution, site, season, age, sex, temperature), influence the IBRv2 reference level, and the final index score (Catteau et al., 2023). Relying on a statistical methodology, Leprêtre et al. (2022) were able to calculate threshold values that allowed the distinction of abnormal from natural fluctuations and to assess the global health of aquatic organisms (*Dreissena polymorpha* and *Gammarus fossarum*). This improvement, which consists in looking at the biomarker responses in the light of ecophysiological variation, represents a promising avenue to better assess the health status of freshwater mussels.

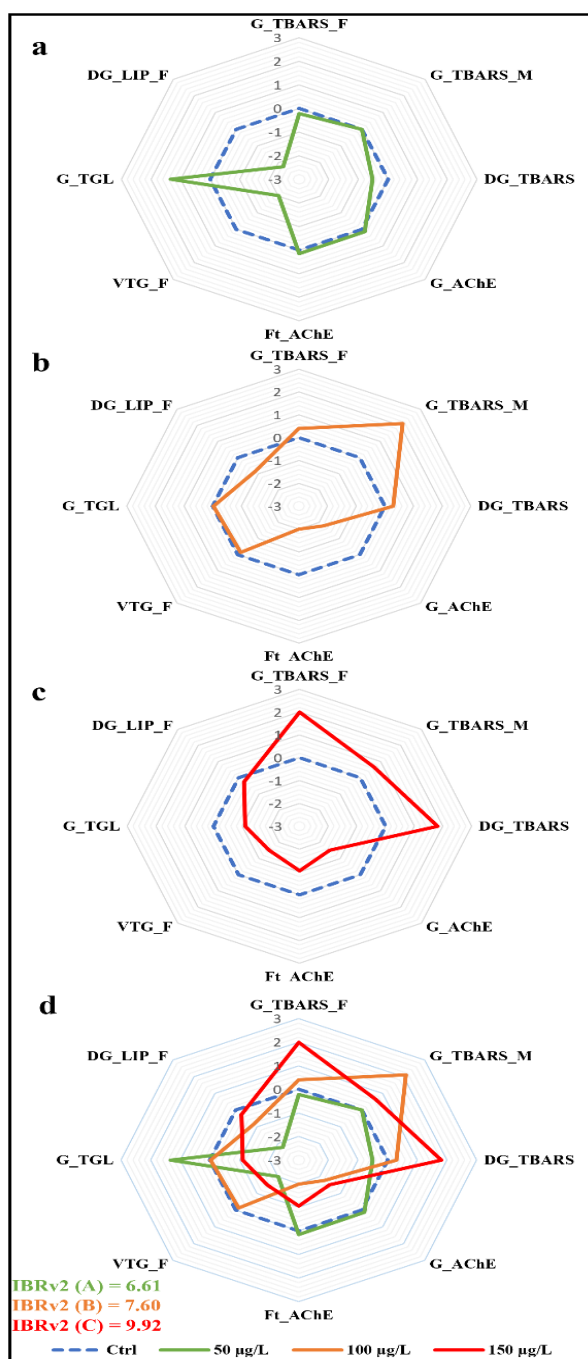


Figure 2. 6 Integrated biomarker responses (IBRv2). Deviation index from the control for a (50 µg/L); b (100 µg/L) and c (150 µg/L). d represent the superposition of all the deviation index from the control. G_TBARS_F (females gills thiobarbituric acid reactive substances content); G_TBARS_M (males gills thiobarbituric acid reactive substances content); DG_TBARS (digestive gland thiobarbituric acid reactive substances content); G_AChE (gills acetylcholinesterase activity); Ft_AChE (foot acetylcholinesterase activity); VTG_F (female gonads vitellogenin content); G_TGL (gills triglycerides); and DG_LIP (digestive gland lipid content). The blue, green, orange, and red lines are respectively the control, 50 µg/L, 100 µg/L, and 150 µg/L.

2.3 Conclusions

In this study, and for the first time, we investigated the effects of glyphosate concentrations relevant to aquatic habitats in agroecosystems on the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Among the biomarkers tested, we observed significant effects in various tissues. AChE activity was notably reduced, and lipid peroxidation was significantly elevated compared to control groups. Additionally, vitellogenin content, total lipids, and triglyceride reserves were depleted but to lesser extents.

We demonstrated that glyphosate concentrations, representative of agricultural environments and below regulatory guidelines in some countries, induced oxidative damage, neurological perturbations, and altered energy metabolism in the mussels. The study highlights a pressing need for more extensive ecotoxicological research on how glyphosate affects bivalves' vitellogenin, lipids and triglycerides to enhance our understanding. The observed effects have critical implications for the mussel's respiration, nutrient uptake, and reproduction. The most prominent highlight of our study was the neurological effect of GBH, notably contributing to the pressure on mussels' health.

Applying the IBRv2 index to the biomarker dataset proved valuable, offering an overall comprehensive view of glyphosate's impact on mussels' health. It helped emphasize that even glyphosate concentrations below certain countries (e.g. Canada) regulatory guidelines can insidiously affect organisms' global health status. To avoid long-term population-level effects, we believe that pesticide toxicity guidelines for chronic exposure should be established using ecologically relevant biomarkers measured in sensitive species that are coherent with the biodiversity of the selected territory.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors express sincere thanks to Annie Paquet from “Ministère de l’Environnement de la Lutte contre les Changements Climatiques de la Faune et des Parcs” for mussels sampling. The authors are thankful to the UQAM Aquatic facilities for the maintenance of the mussels during the experiments. They also thank Carla Mahé and Charlotte Lassere for laboratory work, and Xiameng Feng from the Laboratory of Analytical Chemistry of “Université de Montréal” for the pesticide analyses. They acknowledge the help from Lytana Lécuyer, Divia Patel, and Louis-Philippe Toupin for the statistical treatment and R coding language. Finally, they thank Chantale André and Catherine Jumarie for technical support, Philippe Juneau for providing *P. subcapitata* inoculum, and Alain Geffard, Iris Barjhoux, and Audrey Catteau for their advice about data integration technique.

This project was funded by Environment and Climate Change Canada (Fonds pour dommages à l’environnement) under a grant given to L. Vandelac and L. Parent. The authors would like to thank the Fondation UQAM (2020 to 2022), the Collectif de recherche Écosanté sur les pesticides, les politiques et les alternatives (CREPPA), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under a grant given to M. Boily (No. RGPIN-2016–05142), the Centre de recherche en écotoxicologie du Québec (EcotoQ) and the Centre interdisciplinaire de recherche en opérationnalisation du développement durable (CIRODD) for scholarships attributed to Y. Nombé.

Appendix A Supplementary data

Table S2. 1 Concentrations of glyphosate, AMPA and trace metal elements in the commercial herbicide formulation Credit® Xtreme

	Gly	AMPA	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Ag	Cd	Pb	Si	Ti
Conc. (mg/L)	74x10 ⁴	1.85	0.17	0.04	2.51	0.01	0.13	0.31	0.20	0.14	<LOD	<0.2x10 ⁻³	0.02	9.38	0.34
LOD (mg/L)	2x10 ⁻⁶	2x10 ⁻⁶	3.1x10 ⁻⁶	0.4x10 ⁻⁶	7.7x10 ⁻⁶	0.4x10 ⁻⁶	1.1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶	14.7x10 ⁻⁶	1.1x10 ⁻⁶	0.2x10 ⁻⁶	0.2x10 ⁻⁶	0.6x10 ⁻⁶	81x10 ⁻⁶	7.1x10 ⁻⁶
QC (%)	90	102	98	97	98	100	97	99	95	100	101	99	102	136	101
SWQG (mg/L)	65 x10 ⁻³	-	11 x10 ⁻³	0.47	1.3	0.1	13x10 ⁻³	2.4x10 ⁻³	31x10 ⁻³	0.15	0.1x10 ⁻³	0.08x10 ⁻³	0.41x10 ⁻⁶	-	1.08

1. Most of the metals' concentrations were at least a thousand time below the SWQG for aquatic life when diluted for the present experiment purpose

Method: UHPLC-HRMS for glyphosate and AMPA and ICP-MS for the trace metal elements

QC: Quality control, SWQG: Surface water quality guideline for chronic exposure (Dong et al., 1993; MELCCFP, 2023)

Table S2. 2 Biomarkers (means $\pm$ SD) with no statistical significance, measured in different tissues of *E. Complanata*.

Tissue	Biomarkers	Glyphosate concentration ($\mu\text{g/L}$)			
		0	50	100	150
Gills	Lipids (mg/g of tissue)	2.50 ± 0.48	2.28 ± 0.38	2.39 ± 0.37	2.30 ± 0.31
	Proteins (mg/g of tissue)	6.07 ± 0.83	5.56 ± 1.11	5.90 ± 0.93	6.06 ± 0.87
Digestive gland	Lipids (mg/g of tissue) - Males	3.42 ± 1.11	3.78^a	2.38 ± 0.62	4.65 ± 2.56
	Triglycerides (mg/g of tissue)	69.5 ± 21.1	95.6 ± 40.7	84.7 ± 19.8	81.9 ± 21.7
	GST ($\mu\text{mol/min/mg}$ of protein)	29.5 ± 7.23	27.6 ± 4.25	31.2 ± 0.05	30.1 ± 5.73
	Proteins (mg/g of tissue)	11.9 ± 4.44	9.9 ± 1.96	11.6 ± 2.33	11.6 ± 1.57
	Proteins (mg/g of tissue)	37.3 ± 6.81	36.0 ± 4.36	38.2 ± 4.90	41.0 ± 5.28
Gonads	Proteins (mg/g of tissue)	31.2 ± 8.79	35.2 ± 7.06	33.1 ± 5.29	36.9 ± 8.70
Whole organism	GSI - Males	0.19 ± 0.06	0.24^a	0.18 ± 0.06	0.19 ± 0.03
	GSI - Females	0.18 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.04
	CI (Fulton)	13.7 ± 4.43	15.9 ± 3.84	16.0 ± 3.70	15.6 ± 3.57

a. Only one male was present in this group. GST (Glutathione-S-transferase), CI (condition index), and GSI (gonadosomatic index).

Table S2. 3 Two-way ANOVA and Kruskal-Wallis analysis results.

Biomarkers and normalization proteins	Factors or variables	<i>F</i> values	<i>p</i> -values
TBARS.G (log)	GLY	3.06	0.040
	Sex	2.91	0.067
	GLY*Sex	1.36	0.266
TBARS.DG (log)	GLY	3.85	0.017
	Sex	0.16	0.857
	GLY*Sex	0.58	0.682
AChE.G (log)	GLY	6.70	<0.001
	Sex	0.90	0.41
	GLY*Sex	0.55	0.70
AChE.F	GLY	11.79	<0.001
	Sex	2.57	0.090
	GLY*Sex	0.48	0.754
GST (log)	GLY	0.26	0.852
	Sex	0.18	0.834
	GLY*Sex	0.16	0.956
VTG	GLY	3.93	0.015
	Sex	4.91	0.013
	GLY*Sex	0.22	0.925
GSI	GLY	0.28	0.842
	Sex	5.85	0.006
	GLY*Sex	1.69	0.173
CI	GLY	0.87	0.464
	Sex	0.42	0.660
	GLY*Sex	0.74	0.572
Prot.Ft	GLY	1.92	0.143
	Sex	2.07	0.140
	GLY*Sex	0.92	0.461
Prot.G	GLY	0.99 ^a	0.804
	GLY~female	4.21 ^a	0.240
	GLY~male	0.38	0.693
Prot.DG	GLY	4.08 ^a	0.253
TGL.G (log)	GLY	9.9	<0.001

	Sex	1.31	0.184
	GLY*Sex	0.21	0.933
TGL.DG (log)	GLY	2.33	0.090
	Sex	4.70	0.015
	GLY*Sex	1.50	0.222
LIP.G	GLY	0.65	0.585
	Sex	0.51	0.604
	GLY*Sex	0.87	0.489
LIP.DG	GLY	9.09	<0.001
	Sex	6.92	0.003
	GLY*Sex	7.68	<0.001
Prot.Gnd	GLY	2.64	0.064
	Sex	24.3	<0.001
	GLY*Sex	1.11	0.364

F and *p* values are reported, and significant results are in bold. Abbreviations: TBARS (thiobarbituric acid reactive substances content); AChE (acetylcholinesterase activity); GST (Glutathione-*S*-transferase); VTG (vitellogenin content); CI (condition index), DG (digestive gland); G (gills); Ft (foot); GLY (glyphosate); Gnd (gonads); LIP (lipids); TGL (triglycerides); Prot (proteins). Symbols: a (Chi-squared); *(interaction); ~ (function).

Table S2. 4 Pearson's product-moment correlation p-values corrected by Holm's method. Bold values indicate a statistical significance ranging from $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, to $p < 0.0001$

	TBARS G	TBARS DG	VTG Gnd	CI	GSI	GST DG	AChE Ft	AChE G	Prot Ft	Prot G	Prot DG	Prot Gnd	LIP DG	LIP G	TGL DG
TBARS.G															
TBARS.DG	1.000														
CVTG.Gnd	1.000	1.000													
CI	1.000	1.000	1.000												
GSI	1.000	1.000	1.000	1.000											
GST.DG	1.000	0.008	1.000	1.000	1.000										
AChE.Ft	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000									
AChE.G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000								
Prot.Ft	0.529	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000							
Prot.G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.957	1.000						
Prot.DG	1.000	0.008	1.000	1.000	1.000	<0.0001	1.000	1.000	1.000	1.000					
Prot.Gnd	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000				
LIP.DG	1.000	0.171	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
LIP.G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.001	1.000	1.000	1.000		
TGL.DG	1.000	0.009	1.000	1.000	1.000	0.346	1.000	1.000	1.000	1.000	<0.0001	0.021	<0.0001	1.000	
TGL.G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.682	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

TBARS (thiobarbituric acid reactive substances content); AChE (acetylcholinesterase activity); GST (Glutathione-S-transferase); VTG (vitellogenin content); CI (condition index), DG (digestive gland); G (gills); Ft (foot); GLY (glyphosate); Gnd (gonads); LIP (lipids); TGL (triglycerides); Prot (proteins).

CHAPITRE III EFFECTS OF TWO INSECTICIDES AND THEIR MIXTURES WITH A
GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON *ELLIPTIO COMPLANATA*: SIMULATION OF
AGROECOSYSTEM MIXTURE CONCENTRATIONS

Yannick Arnold Nombéré¹, Maxime Gauthier², Monique Boily¹, Lise Parent^{3*}

1. Université du Québec à Montréal (UQAM), Département des sciences biologiques, 141, Avenue du
Président-Kennedy, Montréal, Québec, H2X 1Y4, Canada

2. Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 105 Rue McGill, Montréal, Québec, H2Y 2E7, Canada

3. Université TÉLUQ, Département Science et Technologie, bureau 1105, 5800 Saint-Denis, Montréal,
Québec, H2S 3L4, Canada

Auteur responsable de la correspondance. E-mail : lise.parent@teluq.ca (L. Parent).

Article en préparation pour être soumis à la revue Journal of Hazardous Materials

RÉSUMÉ

L'impact écologique des pesticides sur les organismes non ciblés, en particulier les néonicotinoïdes, les insecticides de type diamide et les herbicides à base de glyphosate, constitue un domaine d'étude crucial. Cette recherche examine les effets physiologiques du thiaméthoxame (0,05, 0,5 et 5 µg/L), du chlorantraniliprole (0,25, 0,5 et 0,75 µg/L) et de leur mélange avec Credit® Xtreme (50, 100 et 150 µg/L de glyphosate) sur *Elliptio complanata*, une moule d'eau douce. À l'aide de scénarios d'exposition environnementale (faibles, moyennes et fortes concentrations), nous avons évalué leurs impacts sur des systèmes physiologiques clés. Une approche multi-biomarqueurs a été utilisée pour évaluer le stress oxydatif, les mécanismes de détoxification, les systèmes nerveux et reproducteur, les réserves énergétiques ainsi que l'état physiologique global. De plus, des valeurs seuils pour les réponses des biomarqueurs ont été établies en conditions de laboratoire, permettant de comparer les effets des pesticides entre différentes expériences. L'étude a révélé une augmentation significative des substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans les branchies pour toutes les concentrations de thiaméthoxame et pour tous les traitements en mélange, avec des effets amplifiés dans l'expérience de mélange. Le chlorantraniliprole a significativement augmenté l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans les branchies à des concentrations moyennes et élevées, tandis que le thiaméthoxame n'a exercé aucun effet notable. À l'inverse, le mélange a inhibé l'activité de l'AChE dans les branchies à toutes les concentrations et dans le pied à la concentration la plus élevée. Le thiaméthoxame a entraîné une augmentation significative de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) à forte concentration, indiquant une réponse de détoxification accrue. En revanche, le chlorantraniliprole et le mélange n'ont eu aucun impact sur l'activité GST. Les niveaux de vitellogénine (VTG) ont été réduits exclusivement par le mélange, suggérant une perturbation endocrinienne. Le thiaméthoxame et le mélange ont tous deux épuisé les réserves énergétiques, notamment les protéines, les lipides et les triglycérides, dans le pied, la glande digestive et les branchies. Les niveaux de protéines ont montré des réponses variables, avec des diminutions significatives dans les branchies et des augmentations dans le pied lors de l'exposition au mélange à forte concentration. Pour la première fois, des valeurs seuils reflétant la variabilité en conditions de laboratoire pour les biomarqueurs chez *E. complanata* ont été définies. Ces seuils ont permis des comparaisons robustes entre diverses expositions aux pesticides, améliorant notre compréhension des impacts sur la santé de cette espèce sentinelle lors

d'expositions individuelles ou en mélange. Dans l'expérience de mélange, les seuils ont été systématiquement dépassés ou non atteints, indiquant une toxicité amplifiée par rapport aux pesticides pris individuellement. Les niveaux de TBARS ont dépassé les seuils d'induction uniquement lors de l'expérience de mélange, tandis que les activités de l'AChE et de la GST sont restées en dessous des seuils d'inhibition dans plusieurs scénarios. Ces résultats soulignent l'importance de valeurs seuils standardisées pour comprendre l'écophysiologie des espèces sentinelles et la nécessité d'analyses spécifiques à chaque tissu dans les évaluations chroniques des risques posés par les mélanges de pesticides à faibles concentrations. Enfin, les résultats mettent en évidence l'importance de prendre en compte les risques liés aux mélanges de pesticides dans les cadres réglementaires, afin de mettre en place des politiques plus efficaces pour protéger les écosystèmes aquatiques.

Mots-clés :

Elliptio complanata

Herbicides à base de glyphosate

Biomarqueurs

Thiaméthoxame

Chlorantraniliprole

Mélange de pesticides

Valeurs seuils

ABSTRACT

The ecological impact of pesticides on non-target organisms, particularly neonicotinoids, diamide-type insecticides, and glyphosate-based herbicides, is a critical area of study. This research examines the physiological effects of thiamethoxam (0.05, 0.5 and 5 $\mu\text{g/L}$), chlorantraniliprole (0.25, 0.5 and 0.75 $\mu\text{g/L}$), and their mixture with Credit[®] Xtreme (50, 100 and 150 $\mu\text{g/L}$ of glyphosate) on *Elliptio complanata*, a freshwater mussel. Using environmental exposure scenarios (low, medium, and high concentrations), we assessed their impacts on physiological systems and functions. A multi-biomarker approach was employed to evaluate oxidative stress, detoxification mechanisms, nervous and reproductive systems, energy reserves, and overall physiological condition. Additionally, threshold values for biomarker responses were established under laboratory conditions, enabling comparisons of pesticide effects across experiments. The study revealed significant increases in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the gills for all thiamethoxam and mixture concentrations, with effects amplified in the mixture experiment. Chlorantraniliprole significantly increased acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills at medium and high concentrations, while thiamethoxam had no significant effect. Conversely, the mixture inhibited AChE activity in the gills at all concentrations and in the foot at the highest concentration. Thiamethoxam significantly increased glutathione-S-transferase (GST) activity at high concentrations, indicating an activated detoxification response. However, chlorantraniliprole and the mixture had no impact on GST activity. Vitellogenin (VTG) levels were reduced exclusively by the mixture, signaling endocrine disruption. Both thiamethoxam and the mixture depleted energy reserves, including proteins, lipids, and triglycerides, across the foot, digestive gland, and gills. Protein levels exhibited mixed responses, with significant reductions in the gills and increases in the foot under high-concentration mixture exposure. Threshold values representing the variability in laboratory conditions for *E. complanata* biomarkers, were defined for the first time. These thresholds enabled robust comparisons across pesticide exposures, enhancing our understanding of the health impacts of individual and mixed pesticides on this sentinel species. The mixture experiment consistently exceeded or fell below these thresholds, indicating amplified toxicity compared to single pesticides. TBARS levels surpassed induction thresholds only in the mixture

experiment, while AChE and GST activities fell below inhibition thresholds across multiple scenarios. These findings emphasize the importance of establishing standardized threshold values to understand the ecophysiology of sentinel species. They also highlight the necessity of tissue-specific analyses for chronic risk assessments of pesticide mixtures at low concentrations. Lastly, the results underscore the critical need to account for the risks of pesticide mixtures in regulatory frameworks, ensuring more effective policies to protect aquatic ecosystems.

Keywords:

Elliptio complanata

Glyphosate-based herbicides

Biomarkers

Thiamethoxam

Chlorantraniliprole

Pesticides mixture

Threshold values

INTRODUCTION

The agricultural and non-agricultural use of pesticides has ecotoxicological effects on non-target organisms (Johnson et al., 2020). Since their introduction in pest control, some pesticides have caused concern due to their undesirable presence and impacts on ecosystems. Some of the most widely used class of insecticides worldwide are the neonicotinoids. Since 2008, in Canada, imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam are the main neonics approved for soy and corn seed treatment (Stehle et al., 2023). Neonicotinoids act selectively by binding to nicotinic receptors of the neurotransmitter acetylcholine in the insect nervous system, causing overstimulation of nerve cells, paralysis, and eventual death (Stehle et al., 2023; Thompson et al., 2020). Despite their selective mode of action, studies have shown their toxic effect on nontarget species, especially on pollinators (Stehle et al., 2023). Therefore, the European Union banned their usage in fields, and other countries such as Canada and the USA are re-evaluating their approval (Stehle et al., 2023). Among those neonics, thiamethoxam, also known as the mother molecule of clothianidin, drew considerable scientific attention due to its potential aquatic toxicity (Uddin et al., 2023). A wealth of research has explored its impact on various aquatic organisms, uncovering several effects (Uddin et al., 2023). Notably, fish, bivalves and crustaceans have shown increased vulnerability to the toxic effects of thiamethoxam, which include inhibited growth and reproductive issues (Stara et al., 2020; Uddin et al., 2023). At the molecular level, thiamethoxam has been found to induce oxidative damage, alter antioxidant systems, and exert neurotoxic effects in fish and mollusks including bivalves (Alak et al., 2024; El-Gendy et al., 2019; Mukherjee et al., 2022; Stara et al., 2020; Veedu et al., 2022).

Since the ban of neonics in certain countries and their re-evaluation in others, independent scientific experts have explored alternatives and diamide insecticides were considered as options (Jactel et al., 2019). Chlorantraniliprole, an anthranilic diamide insecticide that induces the activation of ryanodine receptor which causes muscle contraction, paralysis and ultimately death of insects, has been synthesized and approved as one of the alternatives to neonics or in combination with them to enhance their effectiveness (Giroux, 2022; Thompson et al., 2020; Wakil et al., 2023). However, chlorantraniliprole has become a rising ecotoxicological concern due to its low solubility in water (0.9-1.0 mg/L at 20 °C, pH 7; NCBI,

2024), which affects its distribution and persistence in aquatic environments. It has been shown to significantly affect aquatic vertebrates and invertebrates. Acute toxicity effects have been recorded for daphnids, insects, crayfish, and fish exposed to chlorantraniliprole. Sublethal effects, including behavioral, developmental, histopathological, and biochemical changes, have also been observed in planarians, daphnids, chironomids, insects, crayfish, and fish (AlMisherfi et al., 2023; Cui et al., 2017; Liu et al., 2024; Moustafa et al., 2023; Nogueira et al., 2024; Rodrigues et al., 2015, 2016, 2017; Yin et al., 2023). Whether chlorantraniliprole is used alone or in combination with neonicotinoids, it is frequently detected in recent Canadian studies alongside other neonicotinoids and herbicides like thiamethoxam and glyphosate respectively (Feng et al., 2024; Giroux, 2022). Before chlorantraniliprole became an ecotoxicological concern, thiamethoxam and glyphosate were already being detected in the same samples (Giroux, 2014; Lalonde and Garron, 2020; Montiel-León et al., 2019).

Glyphosate, the supposed active ingredient in glyphosate-based herbicides (GBH), is globally recognized as the most widely used herbicide, applied to over 100 crops in more than 130 countries (Matozzo et al., 2020). In 2014, a staggering 800 million kilograms of glyphosate (as the active ingredient) were utilized worldwide, with projections indicating an increase to 900 million kilograms by 2025 (Matozzo et al., 2020). The glyphosate molecule, functioning as a non-selective defoliant, targets the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) within the shikimate metabolic pathway (Cerdeira and Duke, 2006). Based on the absence of this pathway in most animal species, glyphosate has long been regarded as non-toxic to animals, including humans. However, the scientific research has revealed adverse physiological effects in aquatic animals, emphasizing that GBH formulations pose a greater risk than pure technical-grade glyphosate (Matozzo et al., 2020). Studies have shown that exposure to glyphosate can cause oxidative damage, neurological effects, fatty acid profile depletion, and alter antioxidant defence systems in different species of mollusks including freshwater and marine bivalves (Matozzo et al., 2020; Matozzo et al., 2018; Nombé et al., 2025; Telahigue et al., 2021; Telahigue et al., 2022).

Glyphosate, thiamethoxam and chlorantraniliprole have been frequently detected either alone or together in more than half (52-100%) of the samples, in various countries' agroecosystems and sometimes exceeding guidelines for aquatic life (Giroux, 2022; INERIS, 2014; Lalonde and Garron, 2020; Matozzo et al., 2020; Stinson et al., 2022; Yang et al., 2023a and 2023b). In agroecosystems' surface water, thiamethoxam reached maximum concentrations of 8.93 µg/L in the USA, 2.82 µg/L in Germany, 4.5 µg/L in Canada, and 225 µg/L in the Netherlands (Giroux, 2022; Yang et al., 2023a and 2023b) while maximum concentrations of chlorantraniliprole were 0.94 µg/L in Canada, and 10.2 µg/L in the USA (Giroux, 2022;

Stinson et al., 2022). Glyphosate, despite its short half-life, is frequently detected at high concentrations in surface waters within agroecosystems worldwide, with maximum levels ranging from 140 µg/L in Canada to 10,000 µg/L in China, including 165 µg/L in France, 680 µg/L in Hungary, 1,550 µg/L in Brazil, and 1600 µg/L in Argentina (Giroux, 2022; Trégouët and Nirascou, 2006). The omnipresence and the guidelines exceedance of those pesticides imply that they can individually pose a risk for aquatic life considering that these three pesticides are often applied on the same crops (Giroux, 2022), using single-molecule guidelines to interpret their toxicity in the natural environment may be a misinterpretation.

As of today, most of the laboratory research investigating the effect of thiamethoxam on aquatic organisms, was conducted on fish, crustaceans and insects (Uddin et al., 2023). Bioassays of thiamethoxam on bivalves are scarce. If not the only studies, we found only two that evaluated thiamethoxam effect on the multixenobiotic resistance mechanism of *Dreissena bugensis* (Vehovszky et al., 2018) and protein contents of *Lamellidens marginalis* (Minakshi et al., 2013). For chlorantraniliprole toxicity to aquatic species, there is only a few studies done in the last 15 years. To our knowledge, no study on chlorantraniliprole toxicity has been done on bivalves despite their ability to fulfill nearly all criteria of an effective bioindicator model species (Drewek et al., 2024). Glyphosate, on the other hand, has been extensively studied for its toxicity in aquatic organisms, including hydra, arthropods, rotifers, snails, trematodes, echinoderms, and bivalves (Klátyik et al., 2024; Matozzo et al., 2020). Recently published data from our laboratory showed that glyphosate can affect different physiological functions and systems of *Elliptio complanata* at concentrations realistic of agroecosystems. The biomarkers altered in that study were lipid peroxidation, glutathione-S-transferase, acetylcholinesterase, lipids and proteins (Nombré et al., 2025). Additionally, to knowledge gap for chlorantraniliprole and thiamethoxam toxicity on bivalves, no *in vivo* toxicity studies have been conducted with their mixture with glyphosate, despite mussels being excellent bioindicators for monitoring anthropogenic pollution trends and the most at-risk animal group in North America with a substantial decrease of their population in Canada over the past 200 years (Drewek et al., 2024; Martel et al., 2010). Assessing the physiological effects of these pesticides and their mixtures on freshwater mussels is crucial for understanding their ecological risks and developing effective mitigation strategies.

In this context, the goal of our study was to document the effects of thiamethoxam, chlorantraniliprole and their mixtures with glyphosate on *Elliptio complanata* a bivalve sentinel following two main objectives. Our first objective was to assess the effects of thiamethoxam and chlorantraniliprole on a suite of biomarkers following chronic exposure at concentrations representative of those found in real-world

agroecosystems. An underlying idea was to highlight the respective targeted systems and to gain insights on the extent of their responses. Does thiamethoxam or chlorantraniliprole exert a molecular impact on the physiology of *Elliptio complanata* at concentrations susceptible of being measured in agricultural streams? Our second objective was to document the effect of a mixture of all three pesticides in different environmental pressure scenarios (low, medium and high). If the individual pesticides do have an effect, does a mixture of chlorantraniliprole, thiamethoxam, and glyphosate result in similar or distinct impact on the physiological systems of *Elliptio complanata*? In this study, a multi-biomarker approach was used. We selected various biomarkers related to the nervous (acetylcholinesterase activity) and reproductive (vitellogenin concentration and gonadosomatic index) systems, the oxidative stress (thiobarbituric acid reactive substances), xenobiotic detoxification (glutathione-S-transferase) energy metabolism (proteins, triglycerides and lipids) and overall physiological condition (Fulton condition index). Following these analyses, we calculated inhibition and induction thresholds as well as the reference values based on the method developed by Besse et al. (2013) and later perfected by Leprêtre et al. (2022) and Catteau et al. (2023). This method is based on a statistical approach applied to a large dataset of organisms' biomarkers from laboratory and various habitats more or less polluted and presumes that the intrinsic variability of a biomarker in organisms inhabiting an unpolluted, healthy environment, combined with stochastic noise, would conform to a normal distribution (Besse et al., 2013; Catteau et al., 2023; Leprêtre et al., 2022). Applying this approach for the first time in a laboratory context would help determine the variation thresholds of biomarkers for *E. Complanata*.

3.1 Materials and methods

3.1.1 Chemicals

The technical grade insecticides (chlorantraniliprole and thiamethoxam) were purchased from Sigma-Aldrich Co., (Oakville, ON, Canada). Credit® Xtreme (containing 30.94% isopropylamine salt and 22.99% potassium salt, equivalent to 540 g/L of glyphosate acid) was purchased from Les Moulins Mondou (Mirabel, QC, Canada). The Bradford's reagent and the Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Richmond, CA, USA). Phosphorus standard, vanillin, cholesterol standard, L-ascorbate sodium, and 2-thiobarbituric acid (TBA) were purchased at Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada). The EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit (catalog No. ETGA-200) was obtained from Cedarlane Co. (Burlington, ON, Canada) while reduced glutathione was from Bio Basic Inc. (Markham, ON, Canada). We purchased 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TTMP) from Merck KgaA Millipore Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The

sulfuric acid, phosphoric acid, L-ascorbic acid, trichloroacetic acid (TCA), Tek-Select Diff-Stain Kit (catalog No. K7128), sodium deoxycholate (DOC), bovine serum albumin (BSA), and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Thermo Fisher Scientific in Montréal, QC, Canada. The solvents cyclohexane and isopropanol were acquired from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).

3.1.2 Mussel's sampling and exposure

Freshwater mussels *E. complanata* were sampled in October 2020 for chlorantraniliprole exposure and in September 2021 for thiamethoxam and mixed pesticide exposures. The collection of mussels took place at Bellevue Lake (Réserve faunique de Portneuf, 47°11'30.8" N, 72°13'47.9" W), a wildlife reserve free from any agricultural exploitation within a radius of several hundred kilometers in the province of Québec, Canada. Briefly, 125 mussels over 5 cm (adults according to Martel et al., 2010), were collected with a gripper stick, and an underwater bag was used to keep them in the water until they were transferred in polypropylene bags filled with the lake water (7-10 °C). The bags were placed in coolers with bubblers and transported to the aquatic laboratory (UQAM, Montréal, QC, CAN). During the transportation, the temperature was maintained at 10°C ± 2°C. Mussels were acclimatized according to the methods described by Flynn and Spellman (2009) and Farcy et al. (2011) with slight modifications. The temperature was increased gradually from 10°C to 15°C ± 3.0°C along with the type of water (from lake water to dechlorinated tap water). Mussels were then acclimatized over in a 200 L tank containing 10 cm of a prewashed sandy substrate from a hardware store. Animals were fed 3 times a week with Seachem® plankton concentrates (5 mL per 190 L of water) from Seachem Laboratories, Inc. (Madison, GA, USA) and *Raphidocelis subcapitata* microalgae concentrate (50 mL per 190 L of water) grown in our laboratory in standardized algal assay procedure medium (USEPA, 1994). The light/dark cycle was 16/8 h and the water tank was monitored three times a week for general hardness for Ca²⁺ and Mg²⁺ (75-170 mg/L), CaCO₃ (40-80 mg/L), pH (6.4-6.8), NO₃/NO₂ (0/0 mg/L), dissolved oxygen (92-100%), NH₄ (0-0.08 mg/L) and NH₃ (0-0.1 mg/L).

For each experiment, we randomly assigned 12 mussels per 20 L aquarium (containing 10 L of dechlorinated tap water). Aquariums were allocated as follows for pesticide exposure: 4 aquarium (ntot = 48 mussels) were used for thiamethoxam (nominal concentrations: CTRL, 0.05, 0.5, 5 µg/L), 5 aquariums (ntot = 60 mussels) were used for chlorantraniliprole (nominal concentrations: CTRL, acetone CTRL, 0.25, 0.5, 0.75 µg/L) and 5 aquariums (ntot = 60 mussels) were used for the pesticide mixture (see **Table 3.1** for nominal concentrations). The selected concentrations for the pesticide mixtures were considered low, medium, and high to simulate the window of concentrations likely found in agroecosystems in certain

regions worldwide. Indeed, all the exposure concentrations of the pesticides selected for the present study represent realistic environmental concentrations in agricultural watersheds based on previous reports by the Quebec government (Giroux, 2022) and the French Environmental Institute (Trégouët and Nirascou, 2006).

Table 3. 1 Nominal concentrations used in the mixture experiment.

Mixture	Glyphosate ($\mu\text{g/L}$)	Thiamethoxam ($\mu\text{g/L}$)	Chlorantraniliprole ($\mu\text{g/L}$)
Low	50	0.05	0.25
Medium	100	0.5	0.5
High	150	5.0	0.75

The pesticide stock solutions were prepared once a week, and 10 mL were added to aquariums daily. For thiamethoxam and glyphosate, nanopure water was used as the solvent. Because of the low solubility of chlorantraniliprole in water, and because it exhibits one of its highest solubility rates in acetone (3.4 g/L, NCBI, 2024), acetone was used as a vehicle. Consequently, a solvent control group was added as a solvent control for the chlorantraniliprole and the mixture exposure. Based on the chlorantraniliprole's solubility in various solvents, and to minimize the presence of acetone in aquariums, 10 mL acetone per 10 L water (0.1%) was used throughout our study. The aqueous media was renewed every 24h in freshly washed aquariums. The exposure of mussels lasted for 21 days to meet the exposure duration requirement of the Canadian Council of Ministers of Environment for freshwater bivalves (CCME, 2011).

3.1.3 Chemical analysis and sample preparation

Exposure media were sampled in amber glass bottles and stored at -20 °C until chemical analysis for pesticides (thiamethoxam, chlorantraniliprole and glyphosate) and for transformation products (aminomethylphosphonic acid – AMPA) and clothianidin. The exposure media was sampled directly after the addition of pesticides (T0), at 12h (T12) and again at 24h (T24) post-addition. Chemical analyses performed using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) following the method described by Feng et al. (2024). The accuracy of the measurement method was explained in a previous study by the quality control (QC) process and results (Nombré et al., 2025). In this study, QCs were 97% for thiamethoxam, 86% for chlorantraniliprole, 90% for glyphosate, 102% for AMPA and 90% for clothianidin. Most of the pesticide concentrations were in the

same range as the nominal ones at T0 (**Appendix A Table S3.1 and S3.2**). For the sake of simplicity in reading, the nominal concentrations were used throughout this article.

After 21 days of exposure, the mussels were dissected on ice and sexed by observing spermatozoa or oocytes on fresh gonad smears using the Tek-Select Diff-Stain Kit. A few individuals could not be sexed due to the absence of gametes. These individuals were recorded and included in statistical analyses only when biomarkers were not influenced by sex. The gills, digestive gland, gonads, and foot were collected, weighed, and stored at -80 °C. Before analyses, thawed tissues were homogenized on ice in a PBS buffer (containing 0.1% L-ascorbic acid) using a Kinematica Polytron PT 1600 E homogenizer (Kinematica AG, Bohemia, NY) with a 5 mm PT-DA 05/2EC-E85 disperser for 20 seconds. The homogenates (ratio: 1g of tissue for 3 mL buffer) were stored in 1.5 mL tubes at -80 °C until the time of biomarker analysis.

3.1.4 Biomarkers assays

Oxidative damage

The oxidative damages were analyzed using the TBARS test as described by Hanna et al. (2022). The homogenates of mussel gills and digestive glands were thawed on ice and centrifuged (4 °C, 10 min) at 9000 ×g. A volume of 200 µL of supernatant was collected in a 0.5 mL tube and treated with DOC (0.15%) to disrupt and dissociate protein interactions and TCA (50%) to precipitate protein and neutralize DOC. The resulting product was then centrifuged for a second time (4 °C, 15 min) at 9000 ×g. A volume of 65 µL of the supernatant was used and the remaining was stored at -80 °C for triglycerides determination. In parallel, a standard curve of TTMP (1,1,3,3,-tetramethoxypropane) diluted in PBS with 0.1 % ascorbic acid was prepared (range: 0 nmol/mL to 7.3 nmol/mL). As well as the sample supernatant, 65 µL of the different concentrations of the standard curve were transferred to a 96-well microplate in triplicate, followed by 75 µL of TBA (1.3% in 0.3% NaOH) and 50 µL of TCA (Hanna et al., 2022). The microplate was incubated at 60 °C in the dark for 2 h. After incubation, the microplate was chilled on ice for 10 min and read using the Varioskan Lux Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). The readout wavelengths were 530 nm and 650 nm for TBARS quantification and turbidity correction, respectively. Results for TBARS are expressed in nmol/mg of lipids.

Glutathione-S-transferase activity

The GST is an enzyme traditionally involved in the detoxification of xenobiotics. Measurements of its activity was done according to a method perfected by Gagné et al. (2015), based on the conjugation of 1 chloro-2,4-dinitrobenzene to GSH to produce a compound with optical density measured at 340 nm

(Boryslawskyj et al., 1988; Gagné et al., 2015). Digestive gland sample homogenates were thawed and centrifuged at 20,000 $\times g$ (4 °C, 15 min). In a 96-well microplate, 200 μl of a reaction solution (1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2-4-dinitrobenzene, 125 mM NaCl, in 10 mM Hepes buffer, pH 6.5) were added to 50 μl of digestive gland supernatant. A kinetic measurement of the absorbance was performed with a Varioskan Lux spectrophotometer for 30 min with 2 min intervals, and the activity of GST was calculated and expressed in $\mu mol/min/mg$ of protein.

Acetylcholinesterase activity

The measurements of AChE activity were performed in the gills and the foot of each mussel. The method was the same as described by Boily et al. (2013), except that the gill and foot homogenates were thawed and centrifuged at 112, 000 $\times g$ (4 °C, 1 h). The AChE activity is expressed in nmol/min/mg of protein (Boily et al., 2013).

Vitellogenin content

The determination of the content of VTG in gonad samples was based on the indirect alkali labile phosphate method of Gagnaire et al. (2009). This assay is based on the principle of colorimetric determination of inorganic phosphate such as Stanton's phosphomolybdenum method (Gagnaire et al., 2009). In our study, the gonads homogenates were thawed and centrifuged at 20, 000 $\times g$ (4 °C, 15 min) instead of 15 000 $\times g$. The optical density was read at 815 nm and 444 nm.

Energy reserves: triglycerides, lipid, and proteins contents

Gills and digestive gland triglycerides were assayed with the *EnzyChrom™* kit using 10 μL of the supernatant from LPO assay. The lipid content was determined to normalize TBARS values. Total lipid extraction on thawed homogenates was performed using a mix of isopropanol:cyclohexane:water (8:10:11) as proposed by Smedes, (1999) and adapt to *E. complanata* by Nombré et al. (2025). After the extraction, the total lipid was determined by the microcolorimetric Sulfo-Phospho-Vanillin (SPV) technique from Lu et al. (2008) and adapted in microplate with a cholesterol standard diluted in cyclohexane as described by Nombré et al. (2025). The concentrations of triglycerides and total lipid are expressed as $\mu g/mg$ tissue and mg/g tissue, respectively. Protein concentration was assayed with supernatants from homogenates according to the Bradford (1976) method. The protein content was used to normalize the values of VTG, AChE, and GST activities.

Non-biochemical biomarkers

The GSI is the ratio of the gonads in the soft tissues of the mussel (Gagné et al., 2011). The CI equals “K” which is Fulton's condition index (Fulton, 1904). They were determined by the following formulas:

$$GSI = \frac{GW}{SW} ; CI = \frac{W}{L^3} \times 100$$

Where GW is the gonad weight, SW is the soft tissues' total weight, W is the whole animal weight, and L is the animal length.

3.1.5 Threshold values definition

To be able to have a robust comparison between experiments, we applied a novel method to define the variation threshold values of *E. complanata*'s biomarkers. The threshold value calculation was first described by Besse et al. (2013) for contaminant bioavailability assessment on *Gammarus fossarum*. The method has been bootstrapped and adapted by Leprêtre et al. (2022) to determine threshold values for *Dreissena polymorpha*, *G. fossarum* biomarkers level. More recently, Catteau et al. (2023) bootstrapped the latter version of the method to calculate more efficient threshold and added reference value calculation for biomarkers. The final method is based on a statistical approach applied to a large dataset of organisms' biomarkers from various habitats more or less unpolluted and presumes that the intrinsic variability of a biomarker in organisms inhabiting an unpolluted, healthy environment, combined with stochastic noise, would conform to a normal distribution (Besse et al., 2013; Catteau et al., 2023; Leprêtre et al., 2022). This method has only been applied in natural environment, so biomarkers influenced by confounding factors (such as temperature, etc.) were not included in the values determination (Leprêtre et al., 2022). However, in a laboratory case, these factors should not be a problem if all experiments have the same exact experimental conditions. Applying this approach for the first time in a laboratory context would help determine the variation thresholds of biomarkers for *E. complanata* without confounding factors. Therefore, this would allow data from different experiments to be visualized on a different angle and enable comparison between experiments. This will facilitate comparison between our single pesticide and their mixture experiments regarding the physiological condition and welfare of *E. complanata*.

3.1.6 Data processing

Statistical analyses

For comparison purposes within each experiment (thiamethoxam, chlorantraniliprole and mixture), TBARS, AChE, GST, VTG, protein content, triglycerides, lipids, GSI, and CI were subjected to statistical analysis. Each variable was tested for the normality of distribution (Shapiro-Wilk's test) and the homogeneity of variance (Levene test). For each biomarker, we compared the treatment groups with the control group using a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by a Dunnett test. When the

proportion of males and females in a group allowed it, we subjected data to a two-way ANOVA ([treatment], [sex], and the interaction term [treatment * sex]). In case of non-normality or skewed distribution of data, a log-transformation was applied to meet the normality and homoscedasticity requirement. If the log-transformed data did not fulfill the statistical requirement, we used a Kruskal-Wallis rank sum test (K-W) followed by Dunn's many-to-one test to compare the groups. Only significant results from treatment, sex and interaction will be presented in the result and discussion section. Correlations between biomarkers were performed using Pearson's product-moment correlation coefficient test and the principal component procedure. As Pearson's product-moment correlation matrix contains a lot of comparisons (each biomarker for 48 to 60 mussels), Holm's correction was applied to the test. The statistical significance of all tests was set at $p < 0.05$ ($n=12$ for each treatment). The R software (version 4.4) was used to perform the statistical tests, and the graphs were made by GraphPad Prism (version 10.2.3)

Threshold and reference values computing

To enable the integration of biomarker data for comparison across experiments, we used the latest version of the threshold value calculation methodology (Catteau et al., 2023; Leprêtre et al., 2022) with slight modifications. This method requires a large dataset for a given biomarker, which led us to use data from 60 to 72 mussels maintained in contamination-free aquariums. For each biomarker measured under laboratory conditions, samples were collected in sets of 12 at 5 to 6 different time points (months). We then checked the Gaussian distribution of the dataset by applying a Shapiro-Wilks test and removed an extreme value when the normality was not met. According to Leprêtre et al. (2022), this step is essential because biomarkers data exploited should represent a continuous dataset following a Gaussian distribution (with a p -value > 0.05). The normality of each biomarker data would only be tempered by the presence of extreme biomarker values. The removed value was the highest of the dataset for induced biomarkers and the lowest for inhibited biomarkers. We did this process iteratively until normality was achieved, the threshold values were defined as the 95th percentile of the Gaussian distribution. As Catteau et al. (2023) and Leprêtre et al. (2022) did to obtain a solid and robust threshold, we randomly selected 30 biomarker values 1,000 times to generate 1,000 different threshold and reference values and by calculating the arithmetic mean of these values we determined the final thresholds. As recommended by Catteau et al. (2023), for a biomarker that can be induced and inhibited, we sorted the data from the highest to the lowest, constituting sub-datasets for induced and inhibited biomarkers separately. For more robustness, the sub-datasets were the 65th% highest values of induced biomarkers dataset and the 65th% lowest values of the inhibited biomarkers dataset. Even for biomarkers that are exclusively inducible or solely inhibitable, the reference values

estimated from the induction dataset closely matched those from the inhibition dataset (**Table 3.2**). This consistency confirmed the robustness of the estimates, as described by Catteau et al. (2023). These values will be integrated in plots for comparison with the biomarker data (mean $\pm$ SD) from the pesticides experiment. Biomarker modulations are represented by the deviation from the threshold values in the plots. To be more conservative in the comparison, only the biomarker means values distant from the threshold and those with standard deviations that do not cross the thresholds were considered influenced by the pesticides. The R software (version 4.4) was used to sort the dataset, constitute sub-datasets and perform the iterative tests to obtain reference and threshold values. The graphs were Then made by GraphPad Prism (version 10.2.3).

3.2 Results and discussion

Globally, our study goal is to document the effects of thiamethoxam, chlorantraniliprole, and their mixtures with glyphosate on *Elliptio complanata*. For the first time, we exposed *E. complanata* to these pesticides at concentrations found near agricultural areas and assessed their impact using a multi-biomarker approach. The concentrations used in our experiments were among the lowest ever used to expose a freshwater mussel. First, we aimed to present and discuss the biomarker responses per experiment to understand the impact of each pesticide alone and in combination. Secondly, integrating our data with threshold values determined through a novel statistical approach, we aimed to present a different perspective of biomonitoring by presenting the biomarker results in light of their normal variability in laboratory condition (laboratory thresholds – **Table 3.2**). This also allows comparison between all the experiments.

Table 3. 2 Threshold and reference values of biomarkers measured on *Elliptio complanata* by tissue.

Tissue	Biomarkers	Units	Induction Thresholds	Inhibition Thresholds	Reference Values
Gills	TBARS	nmol/mg lipid	35.8	-	23.1
	AChE	nmol/(mg·min) protein	2.59	1.48	1.52
	TGL	mg/g tissue	0.30	0.21	0.22
	Lipid	mg/g tissue	-	1.73	1.84
	Protein	mg/g tissue	-	11.2	11.5
Digestive gland	TBARS	nmol/mg lipid	32.0	-	23.6
	GST	μmol/(mg·min) protein	29.4	21.1	21.9
	TGL	mg/g tissue	0.57	0.32	0.35
	Lipid	mg/g tissue	-	2.78	2.8
	Protein	mg/g tissue	-	23.3	24.7
Foot	AChE	nmol/(mg·min) protein	1.65	1.13	1.15
	Protein	mg/g tissue	-	34.9	36.6
Gonads	VTG	μg/mg protein	671	494	496
	Protein	mg/g tissue	-	29.6	30.6
Hole	CI	-	-	10.2	10.2
organism	GSI	-	-	0.19	0.20

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AChE: acetylcholinesterase; TGL: triglycerides; GST: glutathione-S-transferase; VTG: vitellogenin; GSI: gonado-somatic index and CI: condition index.

“-”: not defined

3.2.1 Pesticides concentrations

Chemical analyses of pesticides revealed that in all the experiments (thiamethoxam, chlorantraniliprole and mixture), the experimental concentrations stayed relatively stable or slightly decrease from 0 to 24h (**Table 3.3**), except for glyphosate in the high mixture concentration. Almost the third of the glyphosate concentration was degraded at the high concentration after 12 h and 24 h (**Table 3.4**). When comparing the experimental concentrations to the theoretical ones, we observed relatively equal or lower experimental concentrations for all products (**Appendix A, Table S3.1, and S3.2**) except for the medium and high concentration of chlorantraniliprole experiment. These concentrations of chlorantraniliprole appeared to be much less than the nominal ones at 0 h (**Appendix A, table S3.2**). This discrepancy might be due to the hydrophobic property of chlorantraniliprole ($\text{LogP} \sim 2.96$), which can slow down the aqueous mixing process. The degradation of pesticides could then be attributed to the water's condition or the mussels' metabolism and shell (Di Fiori et al., 2012). However, mixing pesticides could complexify the compounds' dynamic by adsorption competition or the degradation delay (Garcia-Muñoz et al., 2020; Schaeffer and Wijntjes, 2022).

Table 3. 3 Degradation of pesticides over 24h: nominal and measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of thiamethoxam, chlorantraniliprole and the transformation product clothianidin, in the water used for mussels' exposure, collected from 0h-24h in the single pesticide experiment.

Time (h)	Nominal concentrations		Measured concentrations		
	[THX]	[CAP]	[THX]	[CAP]	[CLO]
0	Ctrl	Ctrl	-	-	-
	0.05	0.25	0.06	0.21	<LOD
	0.5	0.50	0.39	0.39	<LOD
	5	0.75	3.88	0.41	0.003
12	Ctrl	Ctrl	-	-	-
	0.05	0.25	0.06	0.23	<LOD
	0.5	0.50	0.38	0.37	<LOD
	5	0.75	3.64	0.53	0.003
24	Ctrl	Ctrl	-	-	-
	0.05	0.25	0.04	0.22	<LOD
	0.5	0.5	0.39	0.38	<LOD
	5	0.75	3.50	0.52	0.003

LOD: Limit of detection; THX: thiamethoxam; CAP: chlorantraniliprole; CLO: clothianidin.

“-”: not detected

Table 3. 4 Monitoring the degradation of pesticides: nominal and measured concentrations ($\mu\text{g/L}$) of glyphosate, thiamethoxam, chlorantraniliprole and the transformation products AMPA and clothianidin in the mixture used for mussels' exposure, collected from 0h-24h.

Time (h)	Nominal concentrations		Measured concentrations			
	GLY + THX + CAP	GLY	THX	CAP	AMPA	CLO
0	Ctrl	-	-	-	-	-
	50 + 0.05 + 0.25	36.0	0.04	0.32	1.1	<LOD
	100 + 0.5 + 0.5	87.1	0.39	0.57	0.90	<LOD
	150 + 5 + 0.75	151	3.8	0.78	1.4	0.002
12	Ctrl	-	-	-	-	-
	50 + 0.05 + 0.25	53.8	0.04	0.29	1.0	<LOD
	100 + 0.5 + 0.5	83.3	0.40	0.61	1.4	<LOD
	150 + 5 + 0.75	109	3.7	0.76	1.3	0.004
24	Ctrl	-	-	-	-	-
	50 + 0.05 + 0.25	34.6	0.04	0.29	0.9	<LOD
	100 + 0.5 + 0.5	84.3	0.41	0.62	1.3	<LOD
	150 + 5 + 0.75	108	3.8	0.78	1.4	0.003

LOD: Limit of detection; GLY: glyphosate; THX: thiamethoxam; CAP: chlorantraniliprole; AMPA: aminomethylphosphonic acid; and CLO: clothianidin;

“-”: not detected

3.2.2 Biomarker responses

Oxidative damages

The oxidative damages were measured in the digestive gland and the gills of the mussels. In the experiment with thiamethoxam, a highly significant difference in TBARS concentration was observed in the gills (ANOVA: $F_{3,40} = 7.62$, $p < 0.001$). The Dunnett test showed a concentration-dependant increase at 0.05 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.05$), 0.5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.01$) and 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.001$) (**Fig. 3.1 a**). However, thiamethoxam did not influence the TBARS concentration in the digestive gland. In the case of chlorantraniliprole exposure, the ANOVA showed a significant effect in the gills ($F_{4,50} = 6.947$, $p < 0.001$). As per the post hoc (Dunnett test), only the concentration of 0.25 $\mu\text{g/L}$ influenced an increase in the gill's TBARS values ($p < 0.001$) (**Fig. 3.2 a**). In the digestive gland, there was a significant effect (ANOVA: $F_{4,50} = 5.4452$, $p < 0.01$) and only the concentration of 0.5 $\mu\text{g/L}$ led to a significant increase ($p < 0.01$) (**Fig. 3.2 b**). With the combination of pesticides, similar to the thiamethoxam experiment, TBARS values showed a significant effect (ANOVA: $F_{3,50} = 14.3$, $p < 0.001$) in the gills. Thus, the Dunnett test showed a concentration-dependant increase at low ($p < 0.05$), medium ($p < 0.001$) and high ($p < 0.001$) concentrations (**Fig. 3.3 a**). The effect was more pronounced in the mixture experiment than the thiamethoxam's. After the integration with the threshold values, the gills' TBARS were below the induction threshold for each condition in every pesticide experiment but the mixture (**Fig. 3.4 a**). In the digestive gland, the TBARS values crossed the induction threshold at some concentrations in thiamethoxam and the mixture experiments (**Fig. 3.4 b**), but they were not considered effectively induced as they were close to the threshold, or their SD crossed the threshold far below. The integrated data for induction allows us to see compare lipid peroxidation in the gills and digestive gland between the experiments.

Particularly, these findings suggest that thiamethoxam and the mixture with chlorantraniliprole and glyphosate are particularly harmful to gills, while chlorantraniliprole's impact is less consistent in both the gills and digestive glands. These results have been recorded in a lot of studies for *Daphnia magna*, *Corbicula fluminea*, *Limnoperna fortunei*, *Unio elongatulus eucirrus*, *Lamellidens marginalis*, *Dreissena polymorpha*, *Eriocheir sinensis*, exposed to a.i. such as chlorantraniliprole, glyphosate, thiamethoxam, and other pesticides (Cui et al., 2017; dos Santos and Martinez, 2014; Iummato et al., 2013; Köprücü et al., 2008; Köprücü et al., 2010; Mundhe and Pandit, 2014; Serdar et al., 2023; Yang et al., 2023b), or commercial formulations such as Roundup and Glifosato ATANOR (dos Santos and Martinez, 2014; Iummato et al., 2024). Indeed, thiamethoxam chronically (28 days) caused oxidative stress to *E. sinensis*

by significantly activating the primary and secondary antioxidant enzymes and increasing oxidative damage at concentrations (0.5 µg/L, 5 µg/L and 50 µg/L) similar and higher than ours (Yang et al., 2023b). Chlorantraniliprole on the other hand had mixed effects on the antioxidant system of *D. magna* when exposed 24 h and 48 h at 1.08 µg/L, 2.11 µg/L and 4.07 µg/L. Indeed, it increased reactive oxygen species and catalase activity and decreased superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities (Cui et al., 2017). In contrast, *C. riparius* did not show any lipid peroxidation at a 24 h exposition to 0.6 µg/L, 2.5 µg/L and 9.6 µg/L of chlorantraniliprole, but catalase activity was decreased at 9.6 µg/L (Rodrigues et al., 2015). We also observed in our results that the mixture amplifies the oxidative damage seen with individual pesticides. Although there is no study in the literature exposing organisms to the same mixture, there are studies with thiamethoxam, chlorantraniliprole and glyphosate combined with other pesticides. Thiamethoxam in combination with λ cyhalothrin or myclobutanil showed greater oxidative stress than each pesticide alone (Kocamaz and Oruc, 2020; Shen et al., 2021). Odetti et al. (2023), exposed a crocodilian (*Caiman latirostris*) to chlorantraniliprole, glyphosate, 2,4-D and imidacloprid (3.9 mg/kg, 148.8 mg/kg, 31 mg/kg and 25.6 mg/kg respectively) alone as well as in 3 different combinations, and found that all the mixtures had greater TBARS than the pesticides alone.

The data integration with the TBARS induction threshold aligns the mixtures' effectiveness in causing greater oxidative damage in the gills at all concentrations. Additionally, the mixture concentrations caused oxidative damage beyond normal TBARS laboratory thresholds. Moreover, it has been frequently reported that different classes of pesticide mixtures containing at least one neonicotinoid can lead to a cocktail effect such as potentiated, additive, antagonistic or synergetic oxidative stress and that the effect is greater in most cases (Kocamaz and Oruc, 2020; Odetti et al., 2023; Shen et al., 2021; Zhao et al., 2020). In our study, the gill was the most affected tissue in case of oxidative stress. It is well known that different classes of pesticides can cause oxidative stress in the gills of bivalves. Indeed, numerous studies have reported elevated oxidative stress in various species when exposed to different pesticides. For instance, *Unio tigris* exhibited increased Catalase activity and malondialdehyde concentration when exposed to chlorpyrifos (Hanna and Shekha, 2024). Similarly, *Unio tumidus* and *Anodonta imbecilis* showed increases in superoxide dismutase enzymatic activity when exposed to glyphosate (Drewek et al., 2024). Studies on *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* reported oxidative stress with TBARS increased upon exposure to tributyltin (Berezina et al., 2024). Elevated lipid peroxidation was also observed in *Corbicula manilensis* exposed to atrazine and glyphosate (dos Santos and Martinez, 2014), *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate (Iummato et al., 2013), *Lamellidens marginalis* exposed to monocrotophos

(Mundhe and Pandit, 2014), and *Unio elongatulus eucirrus* exposed to deltamethrin (Köprücü et al., 2008), among others.

Glutathione-S-transferase (GST)

Among all exposure conditions, only 5 µg/L of thiamethoxam increased the GST activity in the digestive gland. While this concentration differed from the control group, the initial ANOVA was marginally significant (ANOVA: $F_{3,40} = 2.59$, $p < 0.1$). Even though this was a trend, the subsequent Dunnett's test revealed a statistically significant augmentation ($p < 0.05$) in GST activity at the peak concentration, relative to the control group (**Fig. 3.1 d**). In contrast to the thiamethoxam, chlorantraniliprole, and the mixture did not exhibit any discernible impact on the GST activity in the digestive glands of the mussels. Recent studies have shown that chlorantraniliprole and thiamethoxam can alter detoxification enzymes in aquatic invertebrates. Indeed, GST activity was decreased in 10 days of exposure to chlorantraniliprole, in *Chironomus kiiensis* (1.66 mg/L and 2.98 mg/L) and *Chironomus javanus* (0.26 mg/L, 0.54 mg/L) and the concentrations were very much higher than those used in our experiments (Lu et al, 2023) and increased by thiamethoxam in the Chinese mitten crab (*E. sinensis*) at 28 days exposure 0, 0.5, 5 and 50 µg/L (Yang et al., 2023b). These studies align with our result of the thiamethoxam experiment as the effective concentrations are similar. On the other hand, the chlorantraniliprole concentrations used in our study were at least a thousand times lower than the effective concentrations that caused a GST decrease in chironomids. The absence of effects on the GST activity following to the exposure with the mixture could be explained by an antagonistic interaction. The effect of thiamethoxam effect could have been suppressed by the influence of chlorantraniliprole and/or glyphosate.

Moreover, the difference between experiments was clear as the data integration with the GST induction and inhibition thresholds showed that GST activity – in the digestive gland of *E. complanata* – was below its laboratory thresholds only for the mixture (**Fig. 3.4 f**). This suggests a cocktail effect because the individual pesticides' GST was in the range of the biomarker laboratory thresholds (**Fig. 3.4 f**). This means that ineffective concentrations of thiamethoxam, chlorantraniliprole and glyphosate became effective in inhibiting GST activity once put in mixtures representing environmental scenarios. Indeed, different low concentrations of single pesticide ineffectiveness become effective by decreasing GST activity in mixtures of the same concentrations. This was the case with honeybees when fed for 4 h with a sublethal dose of thiamethoxam (0.30 mg/L). It only decreases the GST activity when mixed with λ-cyhalothrin (26.4 mg/L) and abamectin (0.033 mg/L) (Wang et al. 2020). The decrease in GST activity may be due to its inactivation related to an overwhelming production of reactive oxygen species in the digestive

gland of bivalves (Abidli et al., 2021). However, in our study, there were no significant products of oxidative damage observed in the digestive gland (**Fig. 3.4 b**). Abidli et al. (2021) suggested that GST inactivation could also be due to its activation in another tissue. Considering the significant oxidative damage that occurred in the gills, GST activity might have been activated/increased in that tissue and therefore inactivated in the digestive gland. Consequently, these linked effects of the mixtures could lead to adverse effects at individual level. Indeed, oxidative stress and detoxification mechanisms can compromise membrane integrity, alter its permeability, and change its fluidity and, can therefore impact the gas exchange capacity of the gills and the nutrient absorption and detoxification abilities of the digestive gland in bivalves (Livingstone et al., 1992; Almeida et al., 2005 and Abidli et al., 2021).

Our results also highlight the importance of using specific tissues to evaluate pesticides toxicity instead of the whole-body. For example, gills and digestive glands are primary sites of interaction with contaminants. Testing these organs can reveal biochemical changes that might be diluted or undetectable in whole-body analyses. Since different organs perform specialized functions and may respond uniquely to toxic substances, focusing on specific organs allows to detect organ-specific effects and better understand the contaminant toxicity. Additionally, some biomarkers are only present, or more pronounced, in specific tissues. Analyzing whole-body samples could mask these localized biomarkers, leading to less accurate assessments.

Acetylcholinesterase activity

No significant impact of thiamethoxam on the AChE activity was observed in the foot and gills. For the exposure to chlorantraniliprole, the two-way ANOVA indicated only a tendency to a higher AChE activity ($F_{4,48} = 2.34, p < 0.1$) in the gills but a significant interaction between chlorantraniliprole and sex ($F_{4,48} = 2.84, p < 0.05$). We then analyzed the data by sex and found a highly significant increase of the AChE activity following exposure to chlorantraniliprole in females (ANOVA: $F_{4,33} = 3.975, p < 0.01$) at 0.5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.01$) and 0.75 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.01$) (**Fig. 3.2 c**). In the gills, no significant effect was observed for males, and in the foot, no significant effect was observed for both sexes. However, the mixture of pesticides led to a highly significant difference in the gills' AChE activity ($F_{4,49} = 5.91, p < 0.001$). As per the post hoc test, there was an inhibition at low and medium concentrations ($p < 0.05$) and more pronounced at the high concentration ($p < 0.01$) (**Fig. 3.3 b**). In the foot, the AChE activity was found to be highly significantly decreased by the pesticides' mixture ($F_{4,50} = 5.22, p < 0.01$) and only the high concentration group was affected ($p < 0.01$) (**Fig. 3.3 c**). The integration of AChE data with the threshold values to compare the experiments showed a greater effect of the thiamethoxam and the mixture experiments on the foot and gills'

AChE. Additionally, the gills' AChE was below its laboratory thresholds at the medium and high concentrations of thiamethoxam and all the concentrations of the mixture (**Fig. 3.4 c**). This was also the case in the foot at all the concentrations of all the experiments but the medium and high concentrations of chlorantraniliprole (**Fig. 3.4 d**).

For several animal species including bivalves, pesticides neurotoxicity has been demonstrated and the enzyme AChE activity is known to be mainly inhibited by organophosphorus pesticides as well as many other classes such as neonicotinoids, carbamates, organophosphonate, among others (Ewere et al., 2021; Nombé et al., 2025; Pundir and Chauhan, 2012) but also increased temporarily by diamides (AlMisherfi et al., 2023). Thiamethoxam has also been found to decrease AChE activity in aquatic invertebrates (*Eriocheir sinensis*) at concentrations much higher than those in our study or different exposition duration (50 for 28 days $\mu\text{g/L}$ and 300 $\mu\text{g/L}$, for 96 h) (Yang et al., 2023a and 2023b). On the other hand, when compared with the control alone, chlorantraniliprole increased AChE activity, which was not peculiar because it has also been the case in previous studies with *Eisenia fetida* (Hackenberger et al., 2018), and *Oreochromis niloticus* (AlMisherfi et al., 2023), but the effect was just temporary in both studies. In spite of that, mechanistically speaking, chlorantraniliprole is not an anticholinergic agent (AlMisherfi et al., 2023), and AChE inhibition was not anticipated as chlorantraniliprole is known to target the ryanodine receptors by depleting intracellular calcium level in muscle fibres (Ye et al., 2023). This AChE activity observed by some authors following exposure to chlorantraniliprole is not well understood but it could be a marker for apoptosis-inducing substances as the apoptosis is caused by oxidative stress and intracellular ion depletion (Hackenberger et al., 2018). Ye et al. (2023) demonstrated that exposing *Bombyx mori* to chlorantraniliprole (10 $\mu\text{g/L}$ for 72 h) leads to inhibition of the oxidative phosphorylation pathway, resulting in mitochondrial dysfunction, which subsequently induces autophagy and apoptosis.

Although chlorantraniliprole has an increasing effect, and thiamethoxam did not show any effect on AChE activity, their mixture with glyphosate inhibited its activity in the gills and the foot. Glyphosate in Credit® Xtreme formulation is already known to inhibit AChE activity in the gills and foot of *E. complanata* at conditions (100 $\mu\text{g/L}$ and 150 $\mu\text{g/L}$ for 21 days) similar to our mixture experiments' (Nombé et al., 2024). Since the mixture experiment is a simulation of what concentrations can be found in an agroecosystem, it is difficult to speculate whether the pesticides had antagonistic, synergetic, additive or potentiating effects on the enzyme activity. However, Zhu et al. (2017) have shown that AChE activity can be suppressed on *Apis mellifera* following 48h exposure to a neonicotinoid (58.6 mg/L of imidacloprid) in combination with another insecticide (88.3 mg/L of acephate), or fungicide, herbicide and insecticide

together (62.2 mg/L of cyhalothrin, 512.5 mg/L of tetraconazole, 58.5 mg/L of sulfoxaflor, 68 mg/L of oxamyl, 9.4 mg/L of clothianidin, 1217.5 mg/L of glyphosate and 88.3 mg/L of acephate).

An important result in our study is the demonstration of the mixture's effectiveness in inhibiting AChE activity in the gills and foot of a freshwater mussel at pesticide concentrations representative of those found in real-world agroecosystems. The fact that there was AChE inhibition in the previous Credit® Xtreme study with *E. complanata* (Nombré et al., 2025), and increase with chlorantraniliprole in the present study, the effect of the mixture cannot be qualified as a cocktail effect. It might only be due to glyphosate contribution. More specifically, in the meaning of inhibited AChE activity, we can highlight the disruption of the respiratory and osmoregulatory functions in the gills of the mussels (Chen et al., 2022). Thus, inhibited AChE activity in the foot could adversely affect the *E. Complanata* reproduction cycle in the wild as the foot is essential for locomotion and, consequently for the mussel behavior in spawning time (Nombré et al., 2025).

Vitellogenin

There was no significant influence of thiamethoxam on the concentration of VTG in the gonads. However, a significant disparity was observed between the sexes regarding VTG (ANOVA: $F_{1,40} = 8.675$, $p < 0.01$). In the context of chlorantraniliprole, we did not discern an impact of the insecticide on the concentrations of gonadal VTG. Nevertheless, we did observe a significant disparity in VTG levels between the sexes (ANOVA: $F_{1,50} = 5.917$, $p < 0.05$). In the mixture experiment, the two-way ANOVA unveiled a trend towards a disparity in VTG concentration between the sexes ($F_{3,30} = 2.868$, $p < 0.1$) and a highly significant effect on gonadal VTG levels ($F_{3,30} = 2.308$, $p < 0.01$). The post hoc Dunnett's test indicated a trend towards a decrease ($p < 0.1$) at low and high mixture concentrations, and a significant reduction ($p < 0.05$) at medium mixture concentration (**Fig. 3.3 d**). The VTG data integration with the threshold values, allowed to compare different experiment and only the mixture experiment was different from the others with lower VTG levels at all concentration. Additionally, in all the mixture concentrations, the VTG levels were below the laboratory thresholds (**Fig. 3.4 e**).

As the precursor protein of egg-yolk in oviparous organisms, VTG is regulated by the estrogen receptor and is important for embryogenesis (Gagné et al. 2001). During gametogenesis, oocytes secrete estradiol-17 β targeting the receptor in the gonads (in case of some invertebrates) to activate vitellogenesis, under natural conditions (Gagné et al., 2001). Therefore, VTG can reflect estrogenic effects of contaminants on the mussel's reproductive system. Although thiamethoxam can form hydrogen bonds with sexual hormone receptors (in a docking experiment in vitro), similar and higher concentrations to our experiment

(0.5, 5 and 50 µg/L) were not able to alter nor plasma VTG or oestrogen levels in fish (*Gobiocypris rarus*) in 90 days exposure (Zhu et al., 2019). However, in a recent study, thiamethoxam has estradiol-17β and VTG reduction on another fish (*Danio rerio*) when exposed to 0.5 µg/L and 0.05 and 0.5 µg/L respectively (Zhang et al., 2023). Chlorantraniliprole is not currently known to interact with the endocrine system even though there was a study that showed evidence of thyroid hormones depletion at (2g/kg bw) in rats (Hassan et al., 2021). Indeed, when exposed to 300 µg/L of chlorantraniliprole for 60 days, adult fish (*Danio rerio*) did not show any estradiol-17β depletion in the gonads, but there was a VTG reduction in the liver (Shi et al., 2024). In the same study, estradiol-17β and VTG were significantly reduced when chlorantraniliprole was mixed with antibiotics (ciprofloxacin or erythromycin), although there was no evidence of chlorantraniliprole interaction with sexual hormones and receptors in the literature. Glyphosate on the other hand showed evidence of endocrine disruption and VTG level depletion. Certainly, some GBHs (Roundup Express®, Bioforce®, Grands Travaux® and Grands Travaux plus®) have already shown to disrupt the endocrine system by interacting with hormone receptors (Muñoz et al., 2021). Although the concentration of technical-grade glyphosate was below the effective concentration of cytotoxicity, Gasnier et al. (2009) demonstrated that low concentrations of glyphosate in Roundup (0.5-2 ppm) can reduce androgen conversion to estrogen by inhibiting aromatase activity in human hepatic cell line HepG2. The aromatase gene transcription was also reduced but this was not the case while the glyphosate concentration increased (Gasnier et al., 2009). The same study also revealed that the Roundup formulations could have anti-estrogenic and anti-androgenic effects on the respective hormone receptors (Gasnier et al., 2009). Thus, in a recent study that used Credit® Extreme (the same glyphosate formulation we used in our mixture), there was a decreased tendency in 50 µg/L (Nombré et al., 2025). Roundup has also modulated the VTG concentrations in the mussel *M. galloprovincialis* gonads at 100 and 1000 µg/L of glyphosate, although there was no change in VTG gene expression (Fabrello et al., 2020). In males, a significant reduction of VTG was observed after 7 days of exposure and a strong augmentation on the 21st day. In parallel, in females, there was a significant reduction on the 21st day (Fabrello et al., 2020). Furthermore, Matozzo et al. (2020) summarized evidence that energy may be reallocated toward antioxidant and detoxification defenses at the expense of reproduction, which could explain the VTG reduction, particularly when oxidative stress is present. This suggests that GBH (Credit® Extreme) and thiamethoxam in our mixture may have acted together at low concentrations as endocrine disruptors, or indirectly reduced VTG by inducing oxidative stress. The effect was more pronounced than that of Credit® Extreme alone (Nombré et al., 2025) or thiamethoxam, which can only be explained by a cocktail effect of the mixture on VTG levels in *E. complanata*. As expected, past studies have already demonstrated with *E. complanata*, that complex

urban effluents can strongly influence VTG levels, but they only recorded an increase in the mussel gonads (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2011). Another study also recorded similar effects in zebrafish exposed to other pesticide mixtures (triazophos and imidacloprid) for 96h and, the authors also recorded a conjoint decrease in VTG gene expression (Wu et al., 2018). Overall, VTG is indeed a biomarker that is strongly increased or decreased dependently of the contaminant and exposure time. Thus, given that VTG is dependent on the activation of estrogen receptors and that its level depends on the reproduction cycle, its abnormal fluctuation in times of chemical stress is a sign of endocrine disruption and can strongly disturb *E. complanata*'s reproduction cycle. This disruption appears to be more pronounced when glyphosate is combined with other pesticide classes, such as neonicotinoids and diamide insecticides. Additionally, the VTG were found to be below its laboratory thresholds only in the mixture experiment. However, more studies are needed to understand the mechanism of VTG modulation in time with different pesticide classes, alone or in combination.

Gonadosomatic index (GSI), and condition index (CI)

The GSI and CI remained unaffected by thiamethoxam, chlorantraniliprole and mixture experiments. In the thiamethoxam and the mixture experiments, the GSI was different between sexes even without the pesticide influence (ANOVA: $F_{1,40} = 4.096$, $p < 0.05$ and ANOVA: $F_{1,40} = 4.233$, $p < 0.05$ respectively). Regarding the CI, the threshold values integration showed a slight difference between the experiments. Indeed, the mussels' CI was below laboratory thresholds at the highest concentration of chlorantraniliprole (0.75 µg/L) and thiamethoxam (5 µg/L), and the medium and high concentrations of the mixture (**Fig. 3.5 a**). For GSI, almost no difference was found between the experiments except for chlorantraniliprole. The GSI was below laboratory thresholds only at the lowest concentration (0.25 µg/L) of chlorantraniliprole (**Fig. 3.5 b**).

Across all experiments, we detected no treatment effects on the mussels' GSI or CI; however, under certain conditions these indices fell below their laboratory-derived threshold values. Because CI can vary with reproductive status (e.g., changes in VTG and GSI during spawning) and with environmental stressors, we ensured that mussels were sampled outside the spawning season and that experimental conditions were rigorously maintained at optimal levels. (Farcy et al., 2011; Peddicord, 1977). In our experiments, the VTG concentration was lower at every condition of the mixture and was below the laboratory thresholds, although the GSI was insignificantly affected. So, if the CI was to be affected, it might have been directly linked to the said mixture conditions or indirectly linked to the VTG reduction. Data on bivalves evaluating pesticide effects on CI and GSI are scarce. We found no prior studies evaluating the effect of chlorantraniliprole on the CI and GSI of aquatic organisms, indicating that our research is the first to address

this issue. However, there have been studies conducted on other aquatic organisms, essentially fish, exposed to thiamethoxam, glyphosate, and other pesticides and their mixtures. For instance, low concentrations (0.05 µg/L and 0.5 µg/L) of thiamethoxam and imidacloprid for 144 days did not show any effect on *Danio rerio*'s CI (Zhang et al., 2023). Nonetheless, exposures to high concentrations of thiamethoxam (10, 20 and 40 mg/L) during 21 and 28 days had a significant decrease in the CI of the mosquitofish, *Gambusia affinis* only at 40 mg/L (Cheghib et al., 2019). These studies highlight the fact that extremely high concentrations can affect the CI in aquatic organisms. For glyphosate, a study on the fish, *Salmo trutta* exposed to low and high concentrations (10 µg/L, 500 µg/L and 10 mg/L) for 14 days, did not show any effect on the CI (Uren Webster and Santos, 2015). Similarly, low glyphosate concentrations (50 µg/L, 100 µg/L, 150 µg/L) did not show any effect on the CI either for *E. complanata*, exposed for 21 days (Nombé et al., 2025). Another study showed a CI decrease in a fish, *Astyanax lacustris* when exposed for 21 days to a pesticide mixture containing glyphosate, the pyrethroid bifenthrin, and the fungicides azoxystrobin and cyproconazole (Rossi et al., 2020). Nonetheless, another fish, *Markiana nigripinnis* exposed to the same condition did not show any effect on the CI (Rossi et al., 2020). This suggests that, depending on the species, glyphosate may influence the CI only when it occurs in combination with other pesticides, which aligns with the findings of our own study. Thus, CI may not be a reliable indicator of sublethal concentration of glyphosate and other classes of pesticides such as pyrethroid and phenylpyrazole insecticides (Maul et al., 2008; Nombé et al., 2025; Uren Webster and Santos, 2015). Indeed, the latter classes of pesticide (concentration in g/g of organic carbon: bifenthrin = 6.2, lambda-cyhalothrin = 2.8, permethrin = 24.5 and fipronil = 0.13) associated with sediment did not affect the CI of *Chironomus tentans* (Maul et al., 2008). For GSI, to our knowledge, only a few studies on fish have been done for thiamethoxam, chlorantraniliprole and pesticide mixtures. For instance, when *Gobiocypris rarus* was exposed to thiamethoxam at low concentrations (0.5 µg/L, 5 µg/L, and 50 µg/L) for 90 days – levels comparable to or higher than those in our study – there was no observed effect in its GSI (Zhu et al., 2019). With 144 days exposure of *Danio rerio*, imidacloprid significantly increased the GSI while thiamethoxam had no such effect at 0.05 µg/L and 0.5 µg/L (Zhang et al., 2023). Similarly, high concentrations of thiamethoxam (10 mg/L, 20 mg/L and 40 mg/L) for 28 days did not show any effect on the GSI of *Gambusia affinis* (Cheghib et al., 2019). When *Anabas testudineus* was exposed to high concentrations of glyphosate (2.6 mg/L, 3.9 mg/L and 7.8 mg/L) for 48h, no GSI change was recorded, which was not the case for high monocrotophos concentrations (3.5 mg/L, 5.3 mg/L and 10.6 mg/L) also for 48 h (Mohapatra et al., 2023). Similarly to monocrotophos, other organophosphate pesticides such as dimethoate (0.85 mg/L, 1.20 mg/L and 1.53 mg/L) and dichlorvos (0.65 mg/L, 0.90 mg/L and 1.17 mg/L) have significantly reduced the GSI of *Cyprinus carpio communis* after the first month of 8

months exposure (Mir et al., 2012; Mir et al., 2011). However, low concentration of a pyrethroid pesticide, cypermethrin (4.0 µg/L, 8.0 µg/L and 16.0 µg/L) did not show any effect on the GSI of *Mystus cavasius* after 30, 60 and 90 days (Uddin et al., 2022). This was also the case for *Danio rerio* exposed to low concentrations of cypermethrin (0.1 µg/L, 1 µg/L and 4 µg/L) and malathion (25 µg/L, 250 µg/L and 1000 µg/L) and their mixtures for 21 days (Guo et al., 2021). Except for organophosphate pesticides and imidacloprid, it appears that pesticides and their mixtures used in our and the latter studies have no effect on the GSI of fish, even when exposed long-term to high concentrations.

Energy reserves

Regarding protein content, we measured total proteins in the digestive gland, gills, gonads, and foot of the mussels. No effect was observed in the digestive gland, gills and gonads of *E. complanata* following exposure to thiamethoxam. However, a highly significant disparity in gonads' proteins was observed between the sexes (ANOVA: $F_{1,40} = 59.852, p < 0.001$). Conversely, in the foot, thiamethoxam exhibited a trend towards an effect on proteins (ANOVA: $F_{3,40} = 2.493, p < 0.1$), and the Dunnett test highlighted a significant increase in the high (5 µg/L) concentration treatment ($p < 0.05$ – **Fig. 3.1 a**). Similar to thiamethoxam, no effect was observed in the digestive gland, gills and gonads of *E. complanata* following exposure to chlorantraniliprole. However, a highly significant disparity in gonads' proteins was observed between the sexes (ANOVA: $F_{1,49} = 27.355, p < 0.001$). In the mixture experiment, the gills' proteins were highly significantly different (ANOVA: $F_{4,50} = 7.500, p < 0.001$), and there was a significant difference in proteins between the sexes (ANOVA: $F_{4,50} = 5.917, p < 0.05$). Consequently, the post-hoc Dunnett test revealed that the proteins were highly significantly diminished only in the high mixture concentration ($p < 0.001$, **Fig. 3.3 e**). In the foot, the analysis exhibited a significant effect of the mixture on protein levels (ANOVA: $F_{4,50} = 3.193, p < 0.05$) and the Dunnett showed that it was only the high mixture concentration that had a significant increase effect ($p < 0.05$, **Fig. 3.3 f**). Similarly to previous experiments involving pesticides alone, the mussels' gonadal proteins remained unaffected by the mixtures. Nonetheless, a notably significant difference in protein levels was detected between male and female mussels (ANOVA: $F_{1,50} = 62.791, p < 0.001$). Regarding the threshold values integration, there was a slight difference between the experiments as the protein content in the gills was below the laboratory thresholds only for the medium concentration of chlorantraniliprole (0.5 µg/L) and the highest mixture concentration (**Fig. 3.6 a**). In the foot, the mixture experiment was different from the others. Indeed, only the mixture experiment showed protein levels were below the laboratory thresholds at all concentrations (**Fig. 3.6 b**). No difference was observed in the gonads (**Fig. 3.6 c**). Finally, in the digestive gland, the mixture experiment was once again

different from the others. All the single pesticide experiments had their protein levels below the laboratory thresholds at all their concentrations (**Fig. 3.6 d**).

Protein content can serve as an energy reserve for animals as a last resort, during toxic stress for example (Lomte and Alam, 1982). In the present study, protein levels were altered only in two organs, they were increased in the foot only at the high concentrations of the mixture and thiamethoxam, and strongly decreased in the gills, only at the high mixture concentration. Various effects have been observed regarding the protein levels in different organs of different aquatic organisms exposed to glyphosate, thiamethoxam, chlorantraniliprole, and other pesticides and their mixtures. For instance, exposures to various concentrations of thiamethoxam (12.5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L) for 7 days and 14 days increased liver proteins in the liver *Oreochromis niloticus* (Bose and Sahana, 2011), while extremely high concentrations of chlorantraniliprole (100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L, 800 mg/L and 1000 mg/L) for 96 h did not affect protein content in *Spodoptera littoralis* larvae (Aly and Ali, 2024). However, in Aly and Ali (2024) study, novaluron, chromafenozide and thiocyclam decreased total protein at the same concentration as chlorantraniliprole. Low and relatively high concentrations of glyphosate (10 µg/L, 100 µg/L and 1000 µg/L) did not affect protein content in the digestive gland and gills of *M. galloprovincialis* in 7, 14 and 21 days (Matozzo et al., 2018). Nombré et al. (2025) also observed no effect in the gonads, foot, digestive gland and gills, when *E. complanata* was exposed to glyphosate (Credit® Xtreme) for 21 days. These studies are partially in accordance with our findings as no effect on protein levels was observed in the gill and digestive gland at any experiment. Similarly, high concentrations (22.5 mg/L) did not decrease muscle and hepatopancreas protein levels in juvenile *Cherax quadricarinatus* exposed for 50 days (Frontera et al., 2011). However, in the same study, when glyphosate was mixed with its common surfactant, POEA, protein levels decreased in both tissues. High concentrations of other pesticides have also depleted protein contents in different tissues of freshwater mussels. For instance, a 24 h, 96 h, 7 days and 21 days exposure of *Lamellidens marginalis* to indoxacarb (0.08 mg/L and 0.39 mg/L) and thiamethoxam (2.58 mg/L and 12.89 mg/L), and *Parreysia cylindrica* to triazophos (0.73 mg/L and 3.67 mg/L), significantly decreased protein contents in the gills, gonads, mantle, digestive gland, and foot (Minakshi et al., 2013; Patil, 2011). However, when *Cyprinus carpio* was exposed to both low and relatively high concentrations of the herbicide oxyfluorfen (1595 µg/L, 159 µg/L, and 79 µg/L) and the insecticide indoxacarb (463 µg/L, 46 µg/L, and 23 µg/L) for 3 and 6 weeks, no alterations in total protein levels were observed. In contrast, combined exposure to oxyfluorfen and indoxacarb (184 µg/L + 46 µg/L and 92 µg/L + 23 µg/L) significantly reduced the total protein level (Salih et al., 2024). These results show that toxic stress increases proteolytic activity and the metabolic utilization of proteins as stated in Neelamegam et al.

(2006) study. It has also been noted that pesticide mixtures (thiamethoxam + λ cyhalothrin = 477.29 mg/L + 2.901 μ g/L for 7 and 15 days) can impair xenobiotic-mediated cellular protein synthesis and increase protein carbonylation in *Oreochromis niloticus* (Kocamaz and Oruc, 2020). Based on these findings, it appears that protein levels generally remain unchanged at low pesticide concentrations but may decrease either at higher concentrations or in the presence of low-concentration mixtures. This observation aligns with our own mixture experiment, where high combined concentrations reduced protein levels in *E. complanata*'s gills, which can indicate a cocktail effect. Additionally, in our experiments, protein levels in the gills, foot and digestive gland were below the laboratory thresholds in some of the concentrations. The results of the mixture experiment align with most of the studies except for the gonads. Thus, while the digestive gland protein content fell below laboratory thresholds at most concentrations of thiamethoxam and chlorantraniliprole tested individually, this was not the case when the same concentrations were combined. This could suggest an antagonistic interaction between the pesticides in the digestive gland, as Abendroth et al. (2011) noted. Moreover, examining the effects of pesticides on protein levels in different organs of *E. complanata* helps clarify each organ's vulnerability to individual pesticides or their mixtures. In turn, this provides a valuable perspective for investigating their toxicodynamic and toxicokinetic properties.

Integrating threshold values revealed a difference between the mixture experiment and the others. Indeed, the lipid content was below laboratory thresholds at every tested mixture concentration in the gills, and only at the highest mixture concentration in the digestive gland (**Fig. 3.6 e and f**). Regarding the content of triglycerides, mussels exposed to increasing concentrations of thiamethoxam exhibited no significant effect in the gills. We also found a trend towards an effect in the digestive gland (ANOVA: $F_{3,40} = 2.668$, $p < 0.1$) and a trend towards a difference between sexes (ANOVA: $F_{3,40} = 2.984$, $p < 0.1$) in the digestive gland. Further investigation revealed non-significant results for females but a trend in males (ANOVA: $F_{3,22} = 2.988$, $p < 0.1$). However, as per the post hoc Dunnett test, a significant increase in triglycerides ($p < 0.05$) was observed at the highest thiamethoxam concentration (5 μ g/L), (**Fig. 3.1 b**). No other significant results were found in triglyceride content, regardless of the tissues or the exposure conditions.

A shortage of fatty acids like triglycerides can impair *E. complanata*'s ability to cope with stress, such as food scarcity or reproduction, because these molecules are key energy reserves, and their depletion can disrupt metabolism and reproduction (De Zwaan and Mathieu, 1992; Giese, 1966; Bhalchandra and Lomte, 2004). However, the abnormal accumulation of triglycerides in the digestive gland may be a sign of hepatotoxicity in the mussel *Chamaelea rubens* (Mohammed-Geba et al., 2024). This interpretation

aligns more with the thiamethoxam experiment since the effect only appeared at high concentrations. Furthermore, glyphosate was found to influence energy metabolism. Notably, Frontera et al. (2014) observed decreased metabolic rates and increased glycemia in crayfish (*Procambarus clarkii*) exposed chronically to glyphosate (22.5 mg/L). Similarly, glyphosate was found to reduce energy reserves (glycogen and lipids) in juvenile freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* and *Procambarus clarkii* (Frontera et al., 2011; Frontera et al., 2014). These observations align with the fact that the gills and digestive gland lipids were below laboratory thresholds for the mixture experiment. Plus, the lipid content was below the laboratory thresholds in the digestive gland and the gills at the high mixture concentration and all the mixture concentrations respectively. Additionally, our findings can be interpreted on both individual and population levels. Indeed, low concentrations of pesticides can impair lipid content in the mussels' digestive glands, therefore, disrupting lipid intake and storage during non-reproductive periods (Nombré et al., 2025). Yet, additional research is necessary to comprehend how pesticides and their mixtures, particularly at low concentrations, affect lipid metabolism in freshwater bivalves, particularly *E. complanata*.

Our study highlights significant findings on the effects of thiamethoxam, chlorantraniliprole, and their mixture with a glyphosate-based herbicide (Credit® Xtreme) on *Elliptio complanata*. The key results center on oxidative stress, endocrine disruption, and reproductive risks, with mixtures showing amplified toxicity compared to individual pesticides. The gills were the most affected tissue, showing significant oxidative damage, particularly with the mixture, which demonstrated a stronger and cocktail effect. This underscores the gills' heightened sensitivity to oxidative stress and their role as primary targets for pesticide toxicity. GST activity increased in the digestive gland with thiamethoxam alone but was below laboratory thresholds with the mixture, suggesting potential antagonistic interactions that could impair detoxification mechanisms. The mixture also inhibited AChE activity in the gills and foot, potentially affecting respiration, osmoregulation, locomotion, and reproduction. Interestingly, chlorantraniliprole exposure led to elevated AChE activity, which may indicate a complex cascade involving oxidative stress, intracellular ion depletion, and apoptosis. This finding calls for further investigation into the neurotoxic mechanisms of chlorantraniliprole. VTG levels in the gonads were significantly reduced by the mixture, indicating endocrine disruption with likely reproductive consequences. These reductions, combined with AChE inhibition, point to population-level risks under chronic exposure. While the GSI and CI were not significantly affected, their subtle deviations below laboratory thresholds suggest potential long-term impacts on the overall health and reproductive fitness of *E. complanata*. Protein and lipid levels showed tissue-specific alterations, with gill proteins disrupted by the mixture and lipid reserves below laboratory

thresholds, hinting at metabolic stress that could affect survival during reproduction or food scarcity. These findings highlight the importance to assess pesticide toxicity at the tissue level, as whole-body analyses may miss critical effects. Mixture toxicity was consistently more severe, emphasizing the importance of considering real-world contaminant scenarios in environmental risk assessments.

Comparing results from experiments conducted at different times can be challenging, even under consistent experimental conditions. Leveraging a dataset gathered under uniform conditions in our laboratory, this study defines and proposes threshold values for several biomarkers, enabling the integration and comparison of results from different experiments. It would be beneficial for laboratories to adopt threshold values integration for biomarkers in their workflows, in order to improve the consistency and reliability of data across studies. However, these threshold values require further validation and refinement through additional research (Leprêtre et al., 2022). As noted by the authors, broader data collection across various biomarker modulations will enhance the precision and reliability of these thresholds.

To apply this methodology effectively for *in situ* active biomonitoring, data from diverse habitats and timeframes are needed to establish robust thresholds. In addition to understanding the sentinel species ecophysiology, this approach offers a significant advantage over relying on reference sites, which may themselves be contaminated by undetected pollutants. Once validated, these thresholds can facilitate the comparison of biological data from different environmental sites and periods (Leprêtre et al., 2022), similar to our use of laboratory thresholds to compare laboratory-exposed organisms' data.

Ultimately, one of our perspectives is to refine and validate *E. complanata*'s biomarker thresholds to create practical tools for *in situ* biomonitoring. These tools would enhance the detection or assessment of agricultural pollution, streamlining freshwater biomonitoring programs and contributing to better environmental management. Ultimately, our last perspective is to refine and validate *E. complanata*'s biomarker thresholds to create practical tools for *in situ* biomonitoring. These tools would enhance the detection or assessment of agricultural pollution, streamlining freshwater biomonitoring programs and contributing to better environmental management.

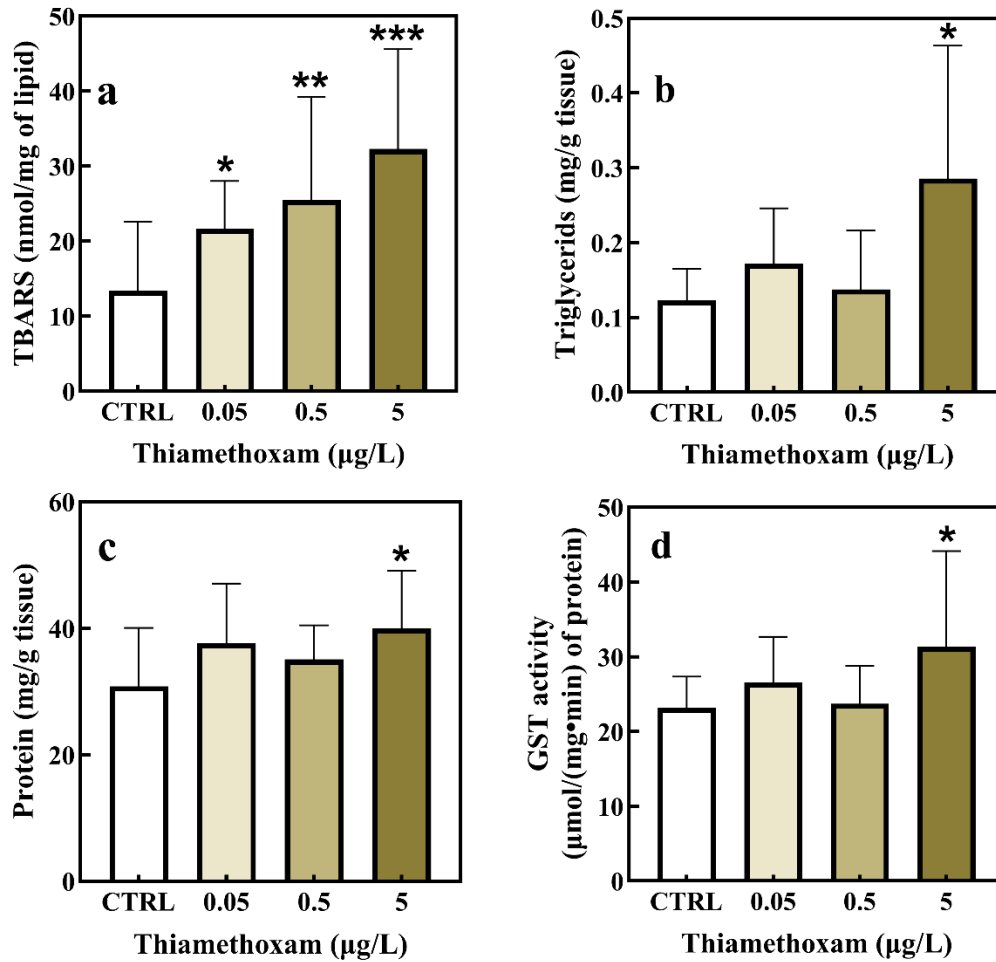


Figure 3. 1 Biomarkers of *Elliptio complanata* following exposure to thiamethoxam. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a), means $\pm$ SD (n=12). Triglycerides content in males' digestive gland (b), means $\pm$ SD (n=5-9). Protein content in foot (c), means $\pm$ SD (n=12). Glutathione-S-transferase (GST) activity in the digestive gland (d), means $\pm$ SD (n=12). From significant ANOVA model, data of each group were compared with the control group by Dunnett's tests, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

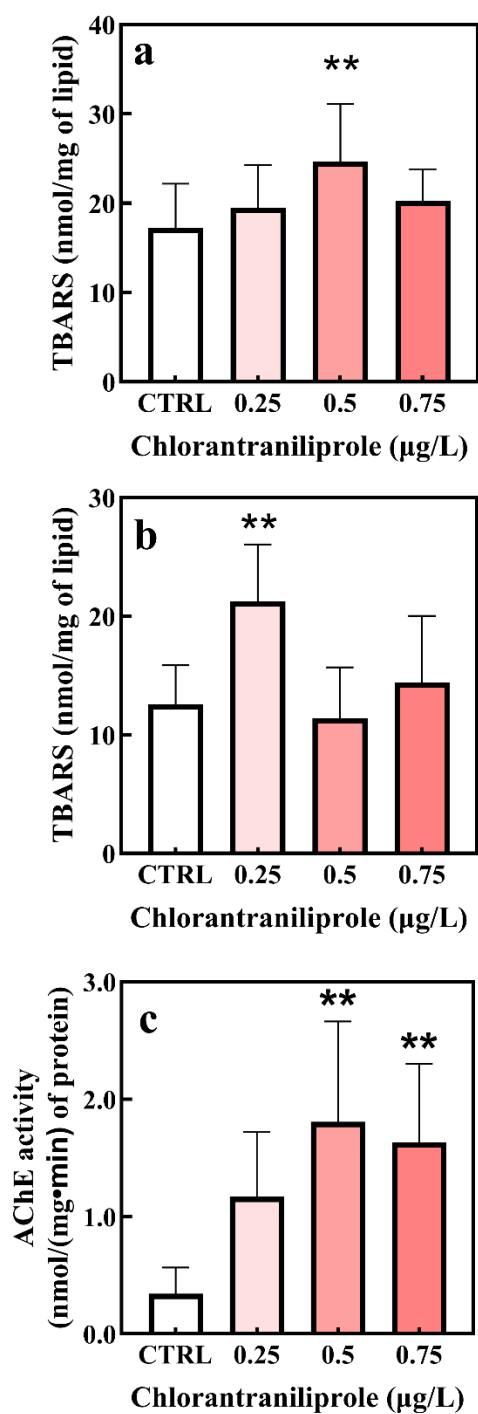


Figure 3. 2 Biomarkers of *Elliptio complanata* following exposure to chlorantraniliprole. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a) and digestive gland (b), means $\pm$ SD (n=12). Acetylcholinesterase (AChE) activity in females' gills (c), means $\pm$ SD (n=9). From significant ANOVA model, data of each group were compared with the control group by Dunnett's tests, ** $p < 0.01$.

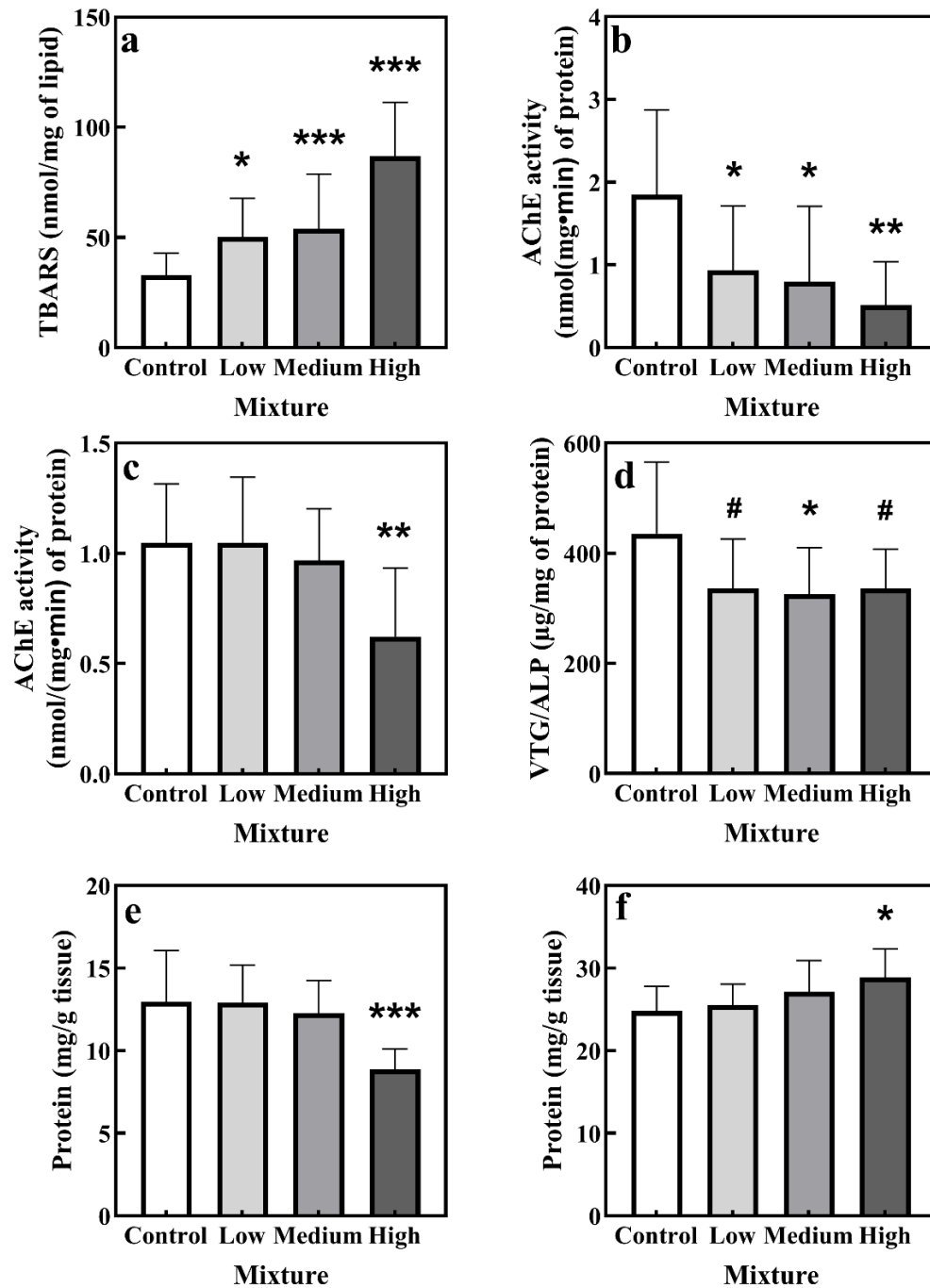


Figure 3. 3 Biomarkers of *Elliptio complanata* following exposure to low, medium and high mixture concentrations. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a), means $\pm$ SD (n=12). Acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills (b) and foot (c), means $\pm$ SD (n=12). Vitellogenin (VTG/ALP) content in gonads (d), means $\pm$ SD (n=12). Protein content in the gills (e) and foot (f), means $\pm$ SD (n=12). From significant ANOVA model, data of each group were compared with the control group by Dunnett's tests, # $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

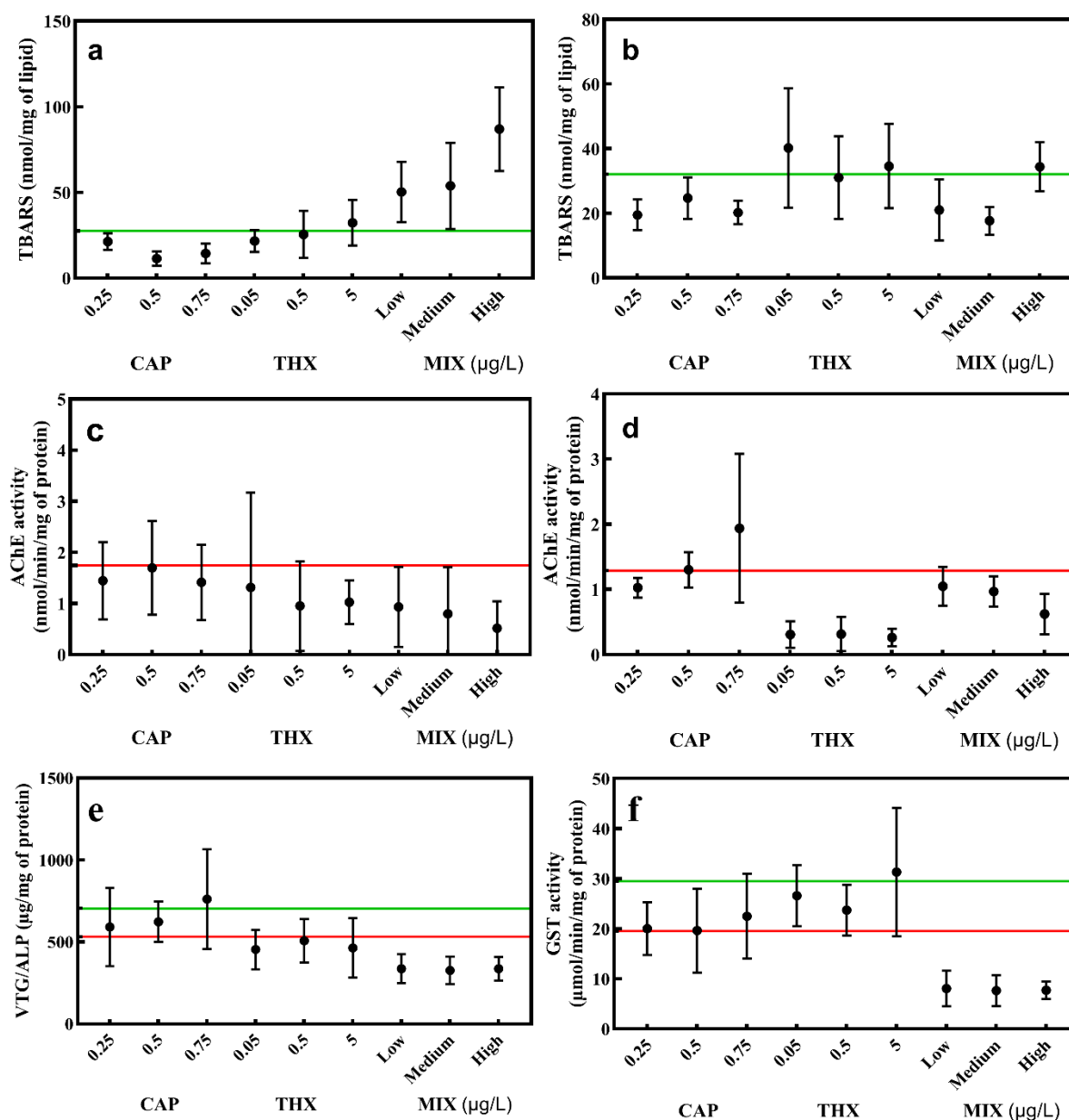


Figure 3. 4 *Elliptio complanata*'s biomarker responses following exposure to thiamethoxam (THX), chlorantraniliprole (CAP), and their mixture (MIX) with glyphosate. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in gills (a) and digestive gland (b), means $\pm$ SD (n=12). Acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills (c) and foot (d), means $\pm$ SD (n=12). Vitellogenin (VTG/ALP) content in males' gonads can, means $\pm$ SD (n=12). Glutathione-S-transferase (GST) activity in the digestive gland (f), means $\pm$ SD (n=12). The biomarker responses were compared with the laboratory threshold of each biomarker (see Materials and methods). The inhibition thresholds are represented by red lines and the induction thresholds by green lines.

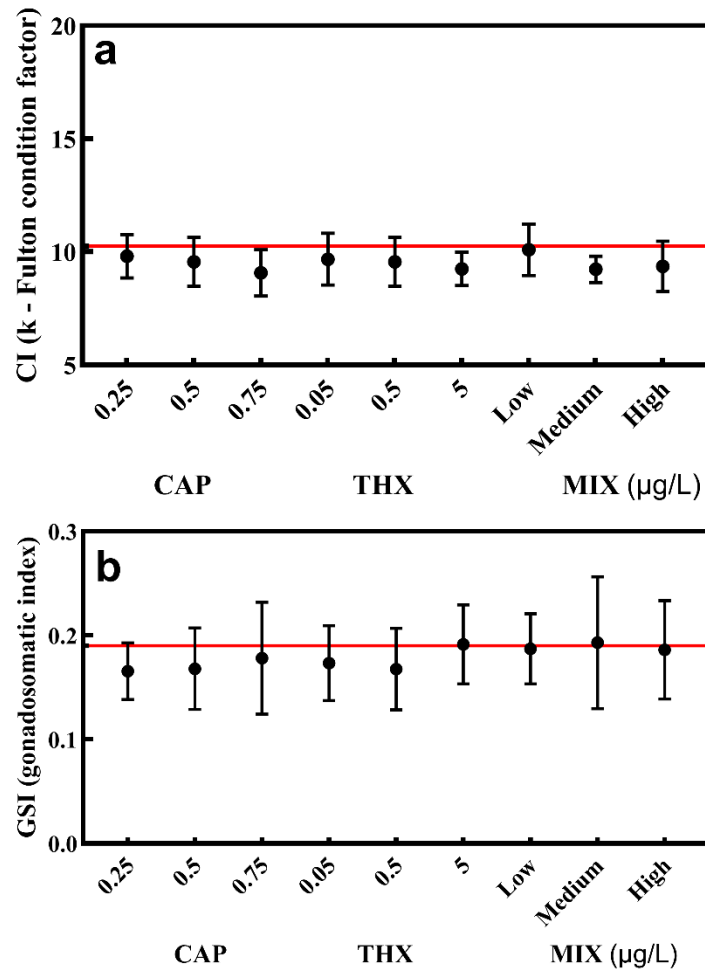


Figure 3. *Elliptio complanata*'s biomarker responses following exposure to thiamethoxam (THX), chlorantraniliprole (CAP), and their mixture (MIX) with glyphosate. Fulton condition index (k) for mussels' general health status (a), means $\pm$ SD (n=12). Gonadosomatic index (GSI) for mussels' gonadal integrity (b), means $\pm$ SD (n=12). The biomarker responses were compared with the laboratory threshold of each biomarker (see Materials and methods). The inhibition thresholds are represented by red lines.

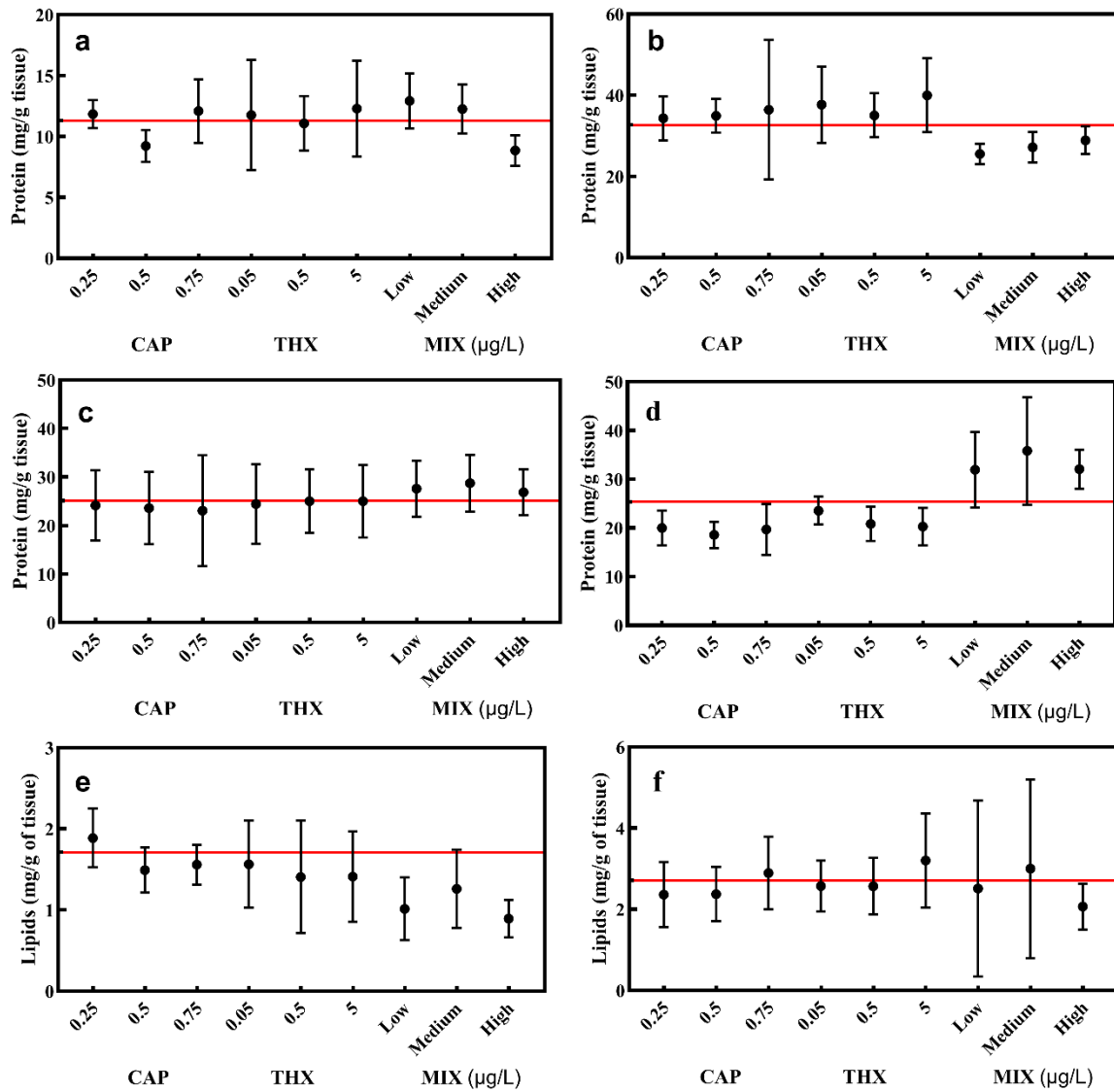


Figure 3. *Elliptio complanata*'s biomarker responses following exposure to thiamethoxam (THX), chlorantraniliprole (CAP), and their mixture (MIX) with glyphosate. Protein content in gills (a), foot (b), gonads (c) and digestive gland (d), means $\pm$ SD (n=12). Lipid content in the gills (e) and digestive gland (f), means $\pm$ SD (n=12). The biomarker responses were compared with the laboratory threshold of each biomarker (see Materials and methods). The inhibition thresholds are represented by the red lines.

3.3 Conclusion

Our study aimed to investigate the physiological effects of thiamethoxam, chlorantraniliprole, and their mixture with glyphosate on the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Using various environmental exposure scenarios (low, medium, and high), we assessed the impact of these pesticides on key physiological systems. By employing a multi-biomarker approach, we focused on oxidative stress, detoxification mechanisms, nervous and reproductive systems, energy reserves, and overall physiological condition. Importantly, we established threshold values for *E. complanata* biomarker responses in laboratory conditions, providing a novel tool for comparing pesticide effects across different experiments.

Thiamethoxam demonstrated significant effects on the gills, digestive gland, and foot, while chlorantraniliprole primarily impacted the gills and digestive gland. However, the pesticide mixture exhibited the most pronounced effects, influencing the gills, foot, and gonads. Among all tissues, the gills were the most sensitive, showing significant oxidative stress and lipid peroxidation, particularly under thiamethoxam and mixture exposures. These findings underscore the vulnerability of *E. complanata* to even low concentrations of thiamethoxam and the amplified effects of the pesticide mixture. The study also highlighted disruptions in detoxification mechanisms, as evidenced by altered glutathione-S-transferase (GST) activity in the digestive gland. Neurotoxicity was observed through inhibited acetylcholinesterase (AChE) activity in the gills and foot during mixture exposures, potentially impairing vital functions such as respiration, osmoregulation, and locomotion. Endocrine disruption was evident from reduced vitellogenin (VTG) levels in the gonads, a response observed exclusively under mixture exposure. This reduction signals potential reproductive risks, with implications for population dynamics.

Our findings underline the heightened toxicity of pesticide mixtures compared to individual chemicals, revealing complex interactions that exacerbate physiological stress. These results highlight the importance of considering realistic agroecosystem exposures and the combined effects of pesticides in ecological risk assessments. Tissue-specific analyses demonstrated that whole-body assessments could obscure localized toxic effects, emphasizing the need for organ-level evaluations to accurately detect and interpret pesticide impacts. To understand sentinel species ecophysiology and enable broader toxicological comparisons, we highlighted the importance for laboratories to adopt the integration of standardized threshold values for biomarkers in their workflows.

In conclusion, our study emphasizes the ecological risks posed by realistic pesticide concentrations in agroecosystems, particularly in mixtures. We advocate for the inclusion of mixture toxicity in regulatory frameworks to better protect aquatic ecosystems and sentinel species like *E. complanata*. Further research and novel methods such as biomarker thresholds for sentinel species are essential to understand their ecophysiology and effectively explore long-term and population-level impacts, ensuring that environmental policies adequately address the risks posed by pesticide mixtures, even at low concentrations in agroecosystems.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors express sincere thanks to Annie Paquet from “Ministère de l’Environnement de la Lutte contre les Changements Climatiques de la Faune et des Parcs” for mussels sampling. The authors are thankful to the UQAM Aquatic facilities for the maintenance of the mussels during the experiments. They also thank Carla Mahé and Charlotte Lassere for laboratory work, and Xiameng Feng from the Laboratory of Analytical Chemistry of “Université de Montréal” for the pesticide analyses. Finally, they thank Chantale André and Catherine Jumarie for technical support, Philippe Juneau for providing *P. subcapitata* inoculum, and Alain Geffard, Iris Barjhoux, and Audrey Catteau for their advice about data integration technique.

This project was funded by Environment and Climate Change Canada (Fonds pour dommages à l’environnement) under a grant given to L. Vandelac and L. Parent. The authors would like to thank the Fondation UQAM (2020 to 2022), the Collectif de recherche Écosanté sur les pesticides, les politiques et les alternatives (CREPPA), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under a grant given to M. Boily (No. RGPIN-2016–05142), the Centre de recherche en écotoxicologie du Québec (EcotoQ) and the Centre interdisciplinaire de recherche en opérationnalisation du développement durable (CIRODD) for scholarships attributed to Y. Nombré.

Appendix A Supplementary data

Table S3. 1 Means $\pm$ SD of nominal and chemical concentrations ($\mu\text{g/L}$) of glyphosate, thiamethoxam, chlorantraniliprole and the main transformation products AMPA and clothianidin, in the water of the mixture experiment at T=0h each week.

Nominal concentrations (GLY+THX+CAP)	Chemical concentrations				
	GLY	THX	CAP	AMPA	CLO
Low (50+0.05+0.25)	48.2 $\pm$ 14.2	0.05 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.21	<LOD
Medium (100+0.5+0.5)	89.5 $\pm$ 11.7	0.39 $\pm$ 0.00	0.56 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.46	<LOD
High (150+5+0.75)	124 $\pm$ 26.3	3.63 $\pm$ 0.29	0.77 $\pm$ 0.07	1.16 $\pm$ 0.20	0.003 $\pm$ 0.001

LOD: Limit of detection; GLY: glyphosate; THX: thiamethoxam; CAP: chlorantraniliprole; AMPA: aminomethylphosphonic acid; and CLO: clothianidin; n = 3.

Table S3. 2 Nominal and chemical concentrations ($\mu\text{g/L}$) of thiamethoxam and chlorantraniliprole in the water used for mussels' exposure, collected at T=0h in the single pesticide experiment.

Pesticides	Nominal concentrations	Chemical concentrations
THX	Ctrl	-
	0.05	0.05 $\pm$ 0.008
	0.5	0.39 $\pm$ 0.002
	5	3.64 $\pm$ 0.008
CAP	Ctrl	-
	Ctrl + CAN	-
	0.25	0.20 $\pm$ 0.013
	0.50	0.20 $\pm$ 0.13
	0.75	0.37 $\pm$ 0.15

LOD: Limit of detection; THX: thiamethoxam; CAP: chlorantraniliprole; CAN: acetone; n = 3.

“-”: not detected

CHAPITRE IV ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF AGRICULTURAL POLLUTION ON NATIVE MUSSELS (*ELLIPTIO COMPLANATA*): INSIGHTS FROM INTEGRATIVE BIOMARKER ANALYSIS

Nombré Y. A.¹, Gauthier M.² Boily M.¹ and Parent L.^{3*}

1. Université du Québec à Montréal (UQAM), Département des sciences biologiques, 141, Avenue du Président-Kennedy, H2X 1Y4 Montréal, Québec, Canada
2. Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 105 Rue McGill, H2Y 2E7 Montréal, Québec, Canada
3. Université TÉLUQ, Département Science et Technologie, 5800 Saint-Denis, bureau 1105, H2S 3L4 Montréal, Québec, Canada

* Corresponding author: lise.parent@teluq.ca

Article en préparation pour être soumis à la revue Science of Total Environment

RÉSUMÉ

L'utilisation de pesticides dans les régions agricoles à forte intensité entraîne fréquemment la contamination des plans d'eau voisins, posant ainsi des risques pour les organismes aquatiques non ciblés. Peu d'études se sont penchées sur la biosurveillance active des effets des pesticides sur la santé des écosystèmes. Dans le cadre de cette étude, nous avons cherché à évaluer l'impact de la contamination de l'eau par les pesticides sur l'état de santé d'une espèce indigène de moule d'eau douce, *Elliptio complanata*. Nous avons étudié la présence de pesticides et évalué des effets sublétaux sur *E. complanata* placée en cage à quatre sites dans le bassin versant de la rivière Châteauguay (sud-ouest du Québec, Canada) : en amont et en aval de la rivière Des Anglais, ainsi qu'en amont et en aval de la rivière Châteauguay. Des échantillons d'eau ont été analysés pour un large éventail de pesticides et de leurs produits de transformation, tandis que la santé des moules a été évaluée au moyen d'une série de biomarqueurs, dont le stress oxydatif (TBARS), l'activité enzymatique (acétylcholinestérase, glutathion-S-transférase), la vitellogénine (VTG) et les réserves énergétiques (protéines, lipides). La réponse de ces biomarqueurs a été intégrée en utilisant une méthode récemment affinée, le « *Integrated Biomarker Response – Threshold* » (IBR-T). Cette méthode repose sur des valeurs de référence et des valeurs seuils propres à chaque tissu, établies à partir d'une vaste base de données sur *E. complanata*.

Cette approche permet de comparer l'état de santé des moules à différents sites sans exiger de site de référence parfaitement exempt de contamination. Le site en aval de la rivière Des Anglais présentait le plus haut degré de contamination en termes nombre et de concentration de pesticides détectés. Les moules de ce site ont montré les altérations de biomarqueurs les plus marquées : une activité de l'AChE (branchies) et un taux de VTG (gonades) plus élevés, ainsi que des valeurs plus faibles pour les TBARS (branchies), la GST (glande digestive) et les protéines (gonades et pied). Des effets moins prononcés ont été observés chez les moules provenant de la rivière Châteauguay, où celles en aval présentaient des valeurs de TBARS (branchies, mâles) plus élevées et des concentrations plus faibles de lipides (glande digestive) et de protéines (gonades, mâles). L'intégration par IBR-T a révélé une dégradation progressive de l'état de santé de *E. complanata* selon l'ordre suivant : amont Châteauguay < aval Châteauguay < amont Des Anglais < aval Des Anglais. Ces résultats soulignent la complexité des interactions entre les mélanges de pesticides

et les organismes aquatiques dans les milieux agricoles. Ils mettent en évidence le lien entre le gradient de contamination par les pesticides dans les agroécosystèmes et l'état de santé de *E. complanata* au regard des biomarqueurs mesurés. Enfin, l'étude démontre l'efficacité de l'approche de biosurveillance active fondée sur l'IBR-T pour évaluer les impacts des pesticides sur des organismes non ciblés dans des habitats contaminés.

Mots-clés :

Elliptio complanata

IBR-T

Valeurs seuils

Biomarqueurs

Biosurveillance active

Écotoxicologie en agroenvironnement

Mélanges de pesticides

Moules d'eau douce

Montérégie

Ruissellement agricole

ABSTRACT

Pesticide use in intensive agricultural regions frequently leads to contamination of adjacent water bodies, posing risks to non-target aquatic organisms. Few scientific research studies have focused on active biomonitoring of pesticides' effects on ecosystem health. In this study, we aimed to evaluate the impact of water contamination by pesticides on the health status of a native freshwater mussel species, *Elliptio complanata*. This study investigated the occurrence of pesticides and assessed sublethal effects on *E. complanata* caged at four sites in the Châteauguay River watershed (southwestern Québec, Canada): upstream and downstream of Des Anglais River and upstream and downstream of the Châteauguay River. Water samples were analyzed for a wide range of pesticides and their transformation products, while mussel health was evaluated using a suite of biomarkers, including oxidative damage (TBARS), enzyme activities (acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase), vitellogenin (VTG), and energy reserves (proteins, lipids). These biomarkers' response was integrated by using a newly refined method "Integrated Biomarker Response – Threshold" (IBR-T), leveraging tissue-specific biomarker reference and threshold values derived from a large *E. complanata* dataset, allowing for a comparison of health impacts across different sites without requiring a pristine reference site.

The downstream site of the Des Anglais River exhibited the highest levels of contamination in terms of number and concentration of detected pesticides. Mussels from this site showed the most pronounced biomarker alterations: higher AChE activity (gills) and VTG (gonads) and lower values for TBARS (gills), GST (digestive gland), and protein (gonads and foot). Less marked effects were found for mussels from the Châteauguay River where downstream individuals had higher TBARS values (gills, males) and lower concentrations of lipids (digestive gland) and proteins (gonads, males). The IBR-T integration revealed a progressive decline in *E. complanata*'s health status following the order of upstream Châteauguay < downstream Châteauguay < upstream Des Anglais < downstream Des Anglais. These findings underscore the complex interactions between pesticide mixtures and aquatic organisms in agricultural environments. The results highlight the link between pesticides contamination gradient in agroecosystems and *E. complanata* health status relative to the measured biomarkers. The study also demonstrates the utility of the

IBR-T-based biomonitoring in assessing pesticide impacts on non-target organisms in contaminated habitats.

Keywords:

Elliptio complanata

IBR-T

Threshold values

Biomarkers

Active biomonitoring

Agroenvironment ecotoxicology

Pesticide mixtures

Freshwater mussels

Montréal

Agricultural runoff

INTRODUCTION

Pesticides, widely used in agriculture, play an important role in modern farming, offering benefits to crop protection. However, their impact becomes problematic when they move beyond the intended agricultural field. Thus, they have raised significant environmental concerns over the last decades (Schulz, 2004, Zhou et al., 2025). These compounds and their transformation products can persist in the environment, disperse through air and water, and accumulate in non-target organisms, leading to detrimental effects on biodiversity and ecosystem functioning (Aktar et al., 2009). Since 2021, pesticide sales reached a historic record, surpassing the 5-million-kilogram mark of active ingredients in the province of Québec (Statistics Canada, 2022), and most of these compounds are mostly used in the Montérégie region (Québec Government, 2024). Montérégie, located in southwestern Quebec, is the province's largest and most productive agricultural area (**Appendix A, Fig. S4.1**). Bordered by the Saint Lawrence River to the north and extending southwards to the United States border, Montérégie is characterized by fertile soils and a favorable climate, host 1,7 million acres that supports a diverse array of crops, including corn, soybeans, fruits, and vegetables (**Appendix A, Fig. S4.1**) (Québec Government, 2021a; Statistics Canada, 2022).

This region's extensive agricultural activities contribute significantly to Quebec's economy (Québec Government, 2023). However, the intensive use of pesticides to maintain high crop yields has raised significant environmental concerns as for the pressure it exerts on organisms that inhabit the aquatic environment. The Châteauguay River watershed, the largest watershed in western Montérégie, has raised our concern because of its land use. It is dominated by forests (38%) mainly upstream in the USA, and agricultural lands (34%) mainly in Quebec. Indeed, 95% of the Quebec side is devoted to agriculture and agroforestry, 3% to urbanization, and the remaining 2% is distributed among other uses (Québec Government, 2010; Simoneau, 2007). The watershed is home to 64 endangered or vulnerable species, including many aquatic species. For example, the Eastern Sand Darter, a small fish, lives in sections of streams with natural banks and good water quality (Québec Government, 2010). Moreover, there are also fish species in the region that host many species of freshwater mussels, the most endangered animal group in North America. For example, despite some occurrence of the freshwater mussel *Obovaria olivaria* in the Montérégie region, its presence was not recorded in Châteauguay River watershed, while its fish hosts are

present (Québec Government, 2021c). On top of that, some hosts and their related mussels have not been observed for decades (Martel et al., 2010; Québec Government, 2021c).

Numerous studies have reported frequent detections of pesticides in the surface waters of Montérégie. For instance, analyses of water samples from key rivers such as the Richelieu, Des Anglais, Saint-Régis, Yamaska, and Châteauguay have revealed the presence of a variety of pesticides, insecticides (including neonicotinoids), herbicides, and fungicides. These chemicals often appear in concentrations that surpass the guidelines (criterion) set by Québec government for the protection of aquatic organisms (Feng et al., 2024; Giroux, 2019, 2022; Montiel-León et al., 2019). Although the concentrations of chlorantraniliprole, an alternative for neonics, appear to be on the rise, neonics such as thiamethoxam, imidacloprid, clothianidin, etc., still exhibit the highest ecotoxicological risk, while herbicides such as glyphosate, *S*-metolachlor, and 2,4-D remain the most abundant pesticides (Feng et al., 2024; Giroux, 2019, 2022). Their widespread use and persistence in the environment have led to high detection frequency and elevated levels of these pesticides.

These analyses highlight the environmental challenges and water resource management efforts in the region, particularly concerning the impact of agricultural practices and the need to protect habitats for endangered species. The Châteauguay river and its main tributaries (Des Anglais, Trout, Esturgeon, Aux Outardes, Des Fèves) are all surrounded by intensive agricultural fields and Châteauguay is the principal contributor of the pesticide discharge to the Saint Lawrence River in western Montérégie (maximum 515 kg/month – Feng et al., 2024). Around 44 pesticides (24 herbicides, 11 insecticides, and 9 fungicides) and 8 transformation products were found in the watershed rivers, and the transformation products were particularly abundant representing a mean of 51% of the total concentration of pesticides (Feng et al., 2024). Feng et al. (2024) assessed the ecotoxicological risks to the aquatic organisms in the watershed based on pesticides concentration. They found that the waterbodies with the highest risk for aquatic life were Des Anglais River and its main tributary, the Norton Stream.

Aside from pesticide contamination, historical and recent studies in the Montérégie region, particularly within the Châteauguay River watershed, have documented the presence of various other contaminants (Simoneau, 2007; Duchemin & Hébert, 2014). Earlier surveys highlighted metals in water, sediments and biota, with mercury standing out in fish tissue (Simoneau, 2007). However, more contemporary investigations (2008–2011) indicate that concentrations of most dissolved metal elements measured at the mouth of the Châteauguay River were well below chronic quality criteria for the protection of aquatic life (Duchemin & Hébert, 2014). Moreover, for some elements the predominance of particulate fractions tends to reduce immediate bioavailability and, consequently, potential toxicity. Data on nutrients (nitrates, ammoniacal nitrogen and total phosphorus) show that ammoniacal nitrogen and nitrate

concentrations are most often below applicable quality guidelines (Données Québec, 2003–2016; CCME, 2010, 2012). Total phosphorus occasionally exceeds thresholds intended to prevent eutrophication, particularly in certain agricultural tributaries, but such exceedances remain localized and are driven more by hydrological conditions favoring stagnation than by widespread diffuse pollution. In addition, urban and industrial organic contaminants (PAHs, PCBs, phthalates) are recurrently detected, mainly in sediments where their affinity for particulate organic matter promotes accumulation; nevertheless, municipal wastewater treatment plants partially reduce these loads by transferring much of these compounds to sludge (Pham & Proulx, 1997). While these stressors warrant consideration, the available evidence suggests they do not, on their own, fully account for the biologically relevant alterations observed locally. In the current context of the Châteauguay watershed, characterized by intensive agriculture and contemporary agricultural practices, pesticides emerge as the principal concern. Their widespread use, the diversity of commercial formulations, and the potential for combined effects on aquatic organisms make pesticide-related risks particularly relevant for assessing ecological quality.

Exposure to pesticides in aquatic organisms can lead to various effects and can be observed on many levels such as biochemical, physiological, and behavioral. It has been widely shown that pesticides can profoundly impact aquatic organisms, particularly invertebrates, disrupting their physiological and biochemical processes (Ewere et al., 2021; Kaur, 2019). These impacts are often reflected by changes in various biomarkers, which are measurable indicators of an organism's health and exposure to contaminants (Amiard and Amiard-Triquet, 2017). For example, pesticides can inhibit or alter the activity of essential enzymes. For instance, many pesticide classes including organophosphates, pyrethroids and carbamates inhibit acetylcholinesterase (AChE), an enzyme critical for nerve function, leading to neurotoxicity on aquatic species (Fulton and Key, 2001; Matozzo et al., 2018; Khazri et al., 2016; Mundhe and Pandit, 2014). Similarly, they can affect enzymes involved in detoxification processes, such as cytochrome P450 and glutathione-S-transferase (GST) which is also an antioxidant enzyme (Almeida et al., 2005; Boryslawskyj et al., 1988; Ewere et al., 2021; Jokanović, 2001; Mundhe and Pandit, 2014). Additionally, many pesticides induce oxidative stress by generating reactive oxygen species (ROS) and altering antioxidant enzyme activity (Ewere et al., 2021; Khazri et al., 2016; Mundhe and Pandit, 2014). This can lead to cellular damage, including lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage (Livingstone, 2001). Biomarkers of oxidative stress, such as increased levels of malondialdehyde (MDA, a byproduct of lipid peroxidation) and altered antioxidant enzyme activities (e.g., superoxide dismutase, catalase), are commonly used to assess the impact of pesticides on invertebrates (Lushchak, 2011). Exposure to pesticides can disrupt normal metabolic processes in invertebrates. This can be measured through changes in energy reserves (e.g., lipids, carbohydrates, and proteins), alterations in metabolic enzyme activities, and shifts in metabolic pathways (Smolders et al., 2004). Pesticides can impair reproduction and development in invertebrates, leading to

reduced fertility, developmental abnormalities, and population declines. Biomarkers related to reproductive health, such as vitellogenin levels (VTG) or changes in reproductive organ development, are crucial indicators of pesticide impact (Fabrello, 2020; Gagnaire et al., 2009; Guo et al., 2021). All these impacts at the biochemical level can be precursors to effects at the tissue level, and eventually, they may affect the overall health of organisms.

Freshwater mussels in particular, perform essential ecological functions among which is their crucial role in improving water quality due to their sedentary nature and remarkable filtration capability (Bärlocher et Brendelberger, 2004; Martel et al., 2010). However, pollutants have deleterious effects on their health in general, reducing their efficiency in fulfilling their ecological functions (Douville et al., 2009; Gagné et al., 2018; Gendron et al., 2023; Nobles et Zhang, 2015). This reduction would lead to increased water quality degradation, which in turn would pose more risk to freshwater mussel populations. Moreover, pollution along with other anthropogenic and environmental factors, may have contributed to the drastic decline of freshwater mussels over the last century, making these organisms the most vulnerable animal group today (Martel et al., 2010). This highlights the urgent need for conservation efforts to protect freshwater mussels and their habitats. Additionally, the sensitivity to pollution and sedentary nature of freshwater mussels makes them interesting sentinels for effective active monitoring of anthropogenic impacts on aquatic ecosystems.

Given the ecological importance of the Châteauguay watershed for wildlife populations and recognizing that individual and combined pesticide exposures pose significant risks to aquatic organisms, this study aims to assess the relationship between pesticide contamination gradients in the Châteauguay and Des Anglais rivers and the health of caged *Elliptio complanata* at sites with varying contamination levels. In parallel, we also plan to characterize the two rivers with respect to their pesticide contamination profiles. Then, using a novel methodological approach, the study seeks to compare the health status of caged *E. complanata* across sites and establish a link between the pesticide mixtures identified at each site and the observed health effects.

The biomarker evaluation employs a suite of biomarkers targeting diverse physiological functions and systems. In the Des Anglais River, the caging was conducted upstream where the water quality was reported to be good, and downstream where the water quality was reported to be very poor following the discharge from Norton stream, which exhibited the highest risk for aquatic life (Feng et al., 2024; Quebec Government, 2010). In the Châteauguay River, the caging occurred upstream where water quality was considered doubtful, and downstream where water quality was reported to be poor following the discharge from Des Anglais, which also presented one of the highest risks for aquatic life (Feng et al., 2024; Quebec Government, 2010). By assessing biomarkers such as oxidative damage (Thiobarbituric acid reactive

substances – TBARS), detoxification enzyme (GST activity), neurotoxicity enzyme (with AChE), essential reproduction protein (VTG) and metabolism energy reserves (protein and lipid content) in *E. complanata*, we can gain a comprehensive understanding of the sub-lethal effects of pesticide exposure on freshwater mussels and infer the broader ecological risks posed to the aquatic ecosystems of an important agricultural watershed of Montérégie that contributes to the pesticide discharge in the Saint Lawrence River.

Moreover, we applied for the first time a novel method to define the threshold and reference values of natural variation of the biomarkers of *E. complanata*. The result of the threshold values was integrated with the caging result to compare each caging site relative to the biomarkers' natural variation threshold. In the last two decades, the Integrated Biomarker Response index (IBR) has been used worldwide, mainly in Europe, in biomonitoring to assess the health condition of exposed organisms (Iturburu et al., 2018; Ji et al., 2018; Samanta et al., 2018; Sanchez et al., 2013; Serafim et al., 2012). However, this method has shown some limitations for multi-experiment comparison, as the control or the reference site can vary due to confounding factors (Catteau et al., 2023) or contamination status. To overcome these limitations, Catteau et al. (2023) refined the index by adding the biomarkers' natural variation threshold as the reference for integrating each result (Integrated Biomarker Response – Threshold, IBR-T). In our *in-situ* caging experiment, we determined a threshold for each biomarker using the method of Leprêtre et al. (2022), bootstrapped by Catteau et al. (2023). Then, we conducted a comprehensive assessment of the health effects of pesticides on *E. complanata* using IBR-T. This approach facilitates the comparison between our caging site without a reference site and simplifies the visualization of the extent of each site risk regarding the health and well-being of *E. complanata*.

We hypothesize that *E. complanata* caged downstream of intensive agricultural areas in the Montérégie region will experience higher pesticide loads and exhibit greater deviations in key biomarkers (e.g., oxidative stress, detoxification, neurotoxicity, and endocrine disruption). Studies in Montérégie (Feng et al., 2024; Giroux, 2019, 2022) indicate that agricultural activities significantly intensify pesticide inputs, leading to heightened contamination in adjacent water bodies. Laboratory evidence shows that mixtures of various pesticide classes, including organophosphorus compounds, can induce oxidative stress, impair detoxification (GST enzyme activity), deplete energy reserves, and inhibit AChE, thereby affecting nervous function (Almeida et al., 2005; Boryslawskyj et al., 1988; Ewere et al., 2021; Fulton and Key, 2001; Jokačević, 2001; Khazri et al., 2016; Matozzo et al., 2018; Mundhe and Pandit, 2014). Additionally, certain pesticides have estrogenic properties that elevate vitellogenin (VTG) levels, further disrupting reproductive processes (Fabrello, 2020; Gagnaire et al., 2009; Guo et al., 2021). Integrated in IBR-T approach, these biomarkers will clearly discriminate between the upstream from downstream sites regarding the physiological condition of *E. complanata*.

Overall, this study will provide needed data on the status of pesticides and their joint effect on aquatic life in the Châteauguay watershed and implement a novel integration tool for monitoring to inform management strategies and mitigation efforts in the protection and conservation of aquatic life in agriculturally intensive region. Ultimately, this study would provide insightful information to environmental managers for a better agricultural practice to mitigate pesticide discharge to the Saint Lawrence River.

4.1 Materials and methods

4.1.1 Chemicals

Tris(hydroxymethyl)aminomethane and Bradford reagent were from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Richmond, CA, USA). Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada) supplied the phosphorus standard sodium, L-ascorbate sodium, and 2-thiobarbituric acid. The EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit (Catalog No. ETGA-200) was from Cedarlane Co. (Burlington, ON, Canada). The reduced form of glutathione was obtained from Bio Basic Inc (Markham, ON, Canada). The 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) and 1,1,3,3-tetramethoxypropane were purchased from Merck KgaA Millipore (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The trichloroacetic acid, Tek-Select Diff-Stain Kit (Catalog No. K7128), L-ascorbic acid, sodium deoxycholate, bovine serum albumin, and sodium hydroxide were from Thermo Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada).

4.1.2 Mussels' sampling, caging and tissue sample preparation

We collected the mussels, *E. complanata*, in mid-June 2021 at two sites in the province of Québec, Canada, upstream from major agricultural activities. The first site was Des Anglais River (45°00'17.6" N 73°39'12.8" W). The second site was Châteauguay River (45°02'45.6" N 74°10'50.6" W). Adult specimens (40 per site) were meticulously gathered using a gripper stick from an approximate depth of 0.5 m. An aqua scope was employed for underwater visibility, and an underwater bag was utilized to maintain the mussels in their native water until they were transferred to polypropylene bags filled with water from their original habitat. The bags were stored in coolers equipped with bubblers and transported to the aquatic laboratory of the Université du Québec à Montréal (UQAM), maintaining a temperature below 10°C during transit. The mussels underwent a depuration process based on previously established methods (Farcy et al., 2011; Flynn and Spellman, 2009) consisting of a gradual change in water type to dechlorinated tap water and maintaining the temperature at $15 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$. Each group of mussels from the two rivers underwent a depuration period for one month in a 200L tank containing approximately 10 cm of sandy substrate and equipped with water flow-through system. Mussels were fed three times a week with Seachem® plankton concentrates from Seachem Laboratories, Inc. (Madison, GA, 30650, USA) and *Raphidocelis subcapitata*

microalgae cultured in our laboratory. The light cycle was maintained at 16h/8h, and the water tank was monitored thrice weekly for parameters such as CaCO₃, pH, NO₃/NO₂, dissolved oxygen, and NH₄/NH₃.

After the purification period, we transported the mussels to the river sites (same transport conditions as described above), and we proceeded to cage the mussels. Twenty mussels were placed per cage (cylindrical PVC nets with >1 m² surface area) and positioned upstream and downstream in their river of origin for one month, from July 13th to August 15th (**Fig. 4.1**). The four experimental cages were tagged and secured by affixing them to construction bricks. The first caging site was situated upstream of Des Anglais River in Canada, adjacent to the USA border. The first portion of the Des Anglais River, which crosses the USA, is primarily characterized by small forests, wooded areas, and grasslands. There are also minor patches with agricultural fields. This characterization persists until the first caging site and then becomes predominantly occupied by agricultural fields until the second caging site (outlet of Des Anglais River in Châteauguay River). The third caging site is located upstream of the Châteauguay River surrounded by a blend of agricultural fields and wooded lands. For a few kilometers downstream of the third caging site, the landscape surrounding the river becomes almost entirely dominated by agricultural fields until well beyond the fourth caging site. The land use characterization of the caging areas was based on previous reports (Québec Government, 2010; Simoneau, 2007). Water samples were collected at each caging site for the detection of pesticides potentially used in the region (Feng et al., 2024). Physicochemical parameters such as conductivity, pH and temperature were measured at each caging site (**Appendix A, Table S4.1**).

After the *in-situ* exposure, the mussels were collected and transported to UQAM, in bags containing water from their respective site and kept at a constant temperature. They were then dissected on ice, and their sex was determined based on the presence of either spermatozoa or oocytes in fresh gonadal smears on slides, which were stained using the Tek-Select Diff-Stain Kit. From each river, a random selection of 5 males and 5 females was made for laboratory biomarkers analysis. Various parts of the mussels, including the gills, digestive gland, gonads, and foot, were harvested, weighed, and preserved at -80°C. Before the analyses, the frozen tissues were thawed and homogenized on ice in a PBS buffer (containing 0.1% ascorbic acid) using a Kinematica Polytron PT 1600 E homogenizer (Kinematica, AG, Bohemia, NY) equipped with a 5 mm PT-DA 05/2EC-E85 disperser for a duration of 20s. The resulting sample homogenates from 10 mussels were randomly chosen from each caging site for biomarker analysis.

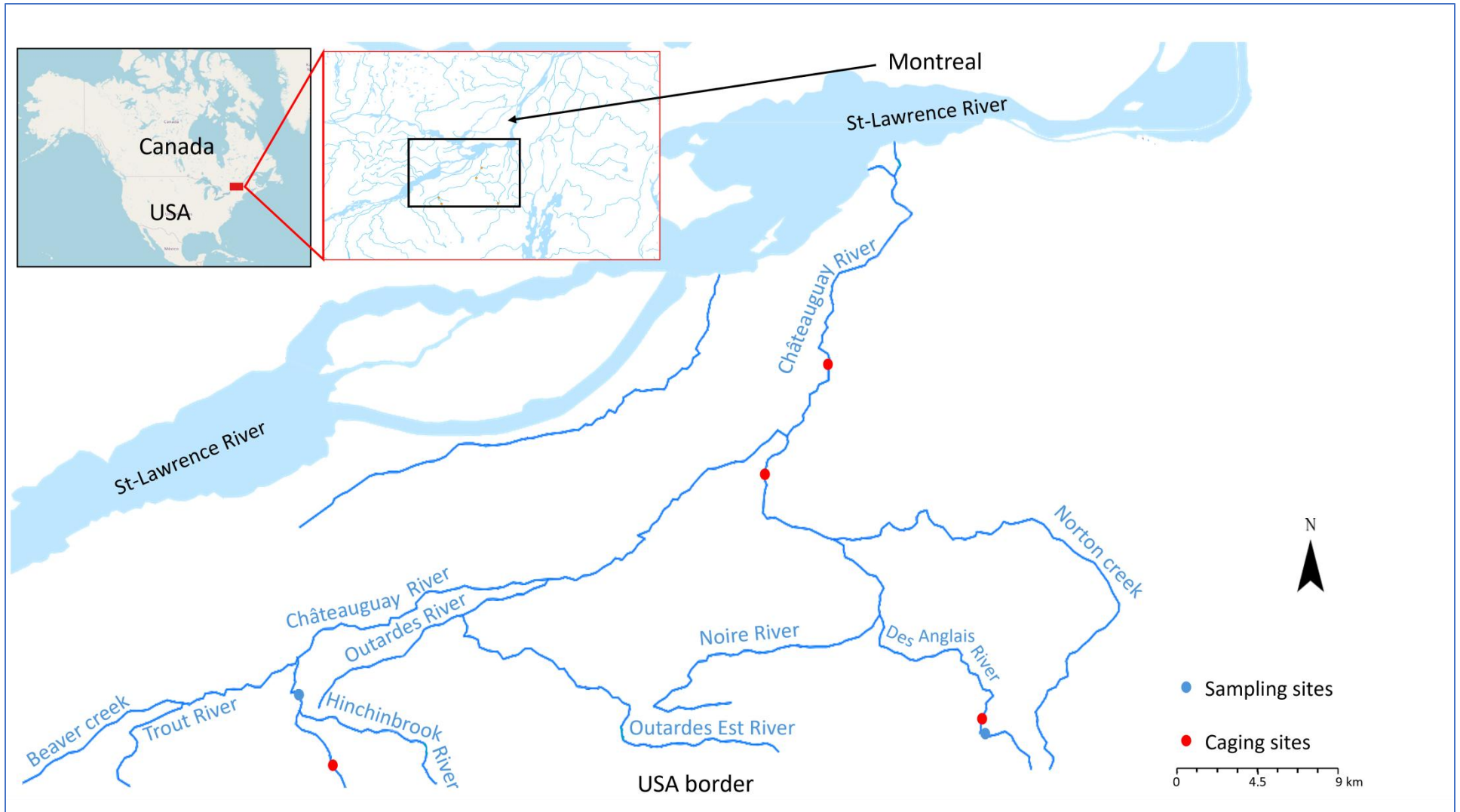


Figure 4. 1 Map of the study area: mussels' sampling and caging sites in Châteauguay River watershed (See also Appendix A, Fig. S4.1 for cropland occupation in Montérégie in general).

4.1.3 Biomarkers assays

The examination of oxidative damage was conducted using the TBARS assay, as outlined in Hanna et al. (2022), and adapted to *E. complanata* by Nombé et al. (2025). The digestive gland and gills' samples as well as the standard curve were mixed in triplicate in a 96-well microplate with different reagents (Thiobarbituric acid and trichloroacetic acid), incubated at 60°C in the dark on a dry heating block for 2h. The absorbance was read at 530 and 650 nm using the Varioskan Lux Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada). Results for TBARS are expressed in nmol/mg of lipids (Nombé et al., 2025).

The evaluation of acetylcholinesterase (AChE) activity was carried out in the gill and foot tissues. The procedure was identical to the one outlined in past studies (Boily et al., 2013), with slight modifications from Nombé et al. (2025). The gills and foot samples were utilized for the kinetic variation of AChE enzyme optical density at 410 nm using the Varioskan Lux spectrophotometer. The levels of AChE activity are denoted in nmol/min/mg of protein.

The quantification of glutathione-S-transferase (GST) was performed in a 96-well microplate, as stated in Gagné et al. 2015, except that the homogenates of the digestive gland samples were subjected to centrifugation at $20,000 \times g$ as adapted by Nombé et al. (2025) on *E. complanata*'s digestive gland. This method is based on the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with GSH, the optical density of which is measured at 340 nm (Boryslawskyj et al., 1988). In this study, the optical density of the microplate was measured kinetically using the Varioskan Lux spectrophotometer, and the activity of GST was determined from the linear section of the curves. GST was expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein.

The quantification of vitellogenin (VTG) on gonadal samples was conducted using the indirect alkali labile phosphate technique as described by Gagnaire et al. (2009), with the exception that the centrifugation of samples was performed at $20,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C as in Nombé et al. (2025). The basis of the assay is the colorimetric detection of inorganic phosphate.

Protein concentrations in the supernatants of all homogenates were determined using the Bradford assay (Bradford, 1976).

The total lipid quantification was carried out in the gill and digestive gland tissues as described in Nombé et al. (2025). The authors used lipids extraction technique from Smedes (1999) and the lipids quantification technique (microcolorimetric Sulfo-Phospho-Vanillin – SPV) from Lu et al. (2008). The samples' optical density was measured at 536 nm. Lipid concentrations are reported in units of mg/g tissue.

The gonadosomatic index (GSI) is the ratio of the relative gonad mass on the soft tissues of the mussel (Gagné et al., 2011). The condition index (CI) was determined according to Fulton's condition factor

“K”, which is an expression of the growth and sexual maturity (Fulton, 1904). They were determined by the following equations:

$$GSI = \frac{GW}{SW} ; CI = \frac{W}{L^3} \times 100$$

Where GW is the gonad weight, SW is the soft tissues' total weight, W is the whole animal weight, and L is the animal length.

The assessment of the overall relative impact on the health of mussels between different sites was conducted using an index known as the *Integrated Biomarker Response – Threshold* (IBR-T), as delineated by Catteau et al. (2023).

4.1.4 Data processing

Reference and threshold values calculation

The reference and threshold value calculation methodology of Leprêtre et al. (2022) presumes that the intrinsic variability of a biomarker in organisms inhabiting an unpolluted, healthy environment, combined with stochastic noise, would conform to a normal distribution. The theory is based: 1) on a large set of data from sufficient experiments for a given biomarker, and 2) each organism biomarker value gathered should represent a continuous dataset following a Gaussian distribution (with a p -value > 0.05). The normality would only be tempered by the presence of extreme biomarker values. The process relies on checking the Gaussian distribution of the dataset and removing an extreme value when the normality is not met. The removed value should be the highest for induced biomarkers and the lowest for inhibited biomarkers. The iterative process must be done until normality is achieved, and the reference and threshold values were defined respectively as the 50th and 95th percentile of the Gaussian distribution (Leprêtre et al., 2022). To obtain solid and robust reference and threshold, Leprêtre et al. (2022) randomly selected 30 biomarker values 1,000 times to generate 1,000 different reference and threshold values. The final reference and threshold were obtained by calculating the mean of the respective values. Before applying this method in this study, we used bootstrapping from Catteau et al. (2023) to obtain biomarker data representative of the natural variability. For biomarkers that can be both inhibited and induced, the entire dataset was sorted in ascending order and divided into two distinct sub-datasets for induction and inhibition parameters. The induction dataset used was the 65th % highest values of the primary datasets, and the inhibition consisted of the 65th % lowest values (Catteau et al., 2023). We then applied the methodology described by Leprêtre et al. (2022) with and without bootstrapping to determine two sets of reference and threshold values. A large dataset was used for reference and definition of threshold values. More than 100 caged or acclimatized mussels from 2 different rivers and a lake (Des Anglais upstream, Châteauguay upstream, and Lake

Bellevue) were used in the process. Their biomarkers were measured in the summer after the spawning period. The R software (version 4.4) was used to perform the statistical tests, and the graphs were made by GraphPad Prism (version 10.2.3).

IBR-T calculation

All biomarkers were subjected to IBR-T index calculation with the threshold values as reference and used to assess the general health of mussels. We determine a deviation index (A_i) of each experimental caging site by applying the following simplified equation from Catteau et al. (2023):

$$A_{i-n} = \frac{\log\left(\frac{X_{i-n}}{X_0}\right) - \mu}{S}$$

Where X is the average biomarker value for each caging site, X_0 is the threshold value, μ is the general mean and S is the general standard deviation of the equation numerator.

The A values represent the deviation of each biomarker from the threshold value. In the results section, they are displayed in a star plot to visualize the scope of the general difference between the treatments and the threshold.

As suggested by Catteau et al. (2023), the IBR-T index is finally determined by the following equation:

$$IBR - T = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |A|$$

Only the biomarkers that are below the inhibition threshold and above the induction threshold have been used to calculate the indexes.

Microsoft Excel (version 2406) was used to compute the data with the latter equations and generate the IBR-T plots.

Statistical analyses

Observations were subjected to statistical analysis for each biomarker and site. Data for biomarkers were subjected to a two-way analysis of variance (2W-ANOVA) testing the effects of sites (upstream vs downstream) and the interaction between the sex and the site. If the latter was significant, a one-way ANOVA was performed for each sex and site. Data sets with skewed normality or homoscedasticity were subjected to Kruskal-Wallis' rank sum tests. The statistical significance for all tests was set at $p < 0.05$ ($n=10$). Statistical tests were performed using R software (version 4.4.0).

4.2 Results and discussion

Pesticides detection and quantification

The pesticides detected in the rivers of our study are presented in **Table 4.1**. In Des Anglais River, 22 and 40 pesticides were above the limit of detection (LOD) upstream and downstream respectively. In Châteauguay River, 27 pesticides were upstream, while 32 were downstream. Herbicides such as atrazine, glyphosate, S-metolachlor, cyanazine, metribuzin, and simazine were present in 100% of the sample sites. Among fungicides, four compounds were found to be the most detected. Azoxystrobin, carbendazim, fluxapyroxad, and propiconazole. They were also found in 100% of the sampling sites, as were the insecticides imidacloprid and chlorantraniliprole, along with the degradation products of atrazine, glyphosate, and S-metolachlor.

Additionally, greater values for pesticide concentrations were found downstream Des Anglais River, followed by Châteauguay downstream, upstream, and lastly Des Anglais upstream which had the lowest pesticide concentrations. The pesticides concentrations ranged from 0.01 to 414 ng/L, the highest ones were all herbicides and their transformation products. The MCPA (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) had the highest concentration of all the compounds subjected to our analysis (414 ng/L), followed by linuron, AMPA, metolachlor ethanesulfonic acid, prometryn, 2,4-D, metolachlor oxanilic acid and glyphosate (with 386, 315, 233, 215, 172, 115 and 142 ng/L, respectively). Although our measured concentrations are lower, most of our pesticides still fall within the range reported by Feng et al. (2024) who studied the same rivers at the same season and year (2021). The site downstream the Des Anglais River, the most contaminated by agricultural pesticides, also displays neonics thiamethoxam and imidacloprid concentrations exceeding the chronic criterion value for aquatic life (8.3 ng/L). These higher concentration values could result from many farms along the river and the Norton Stream, its main tributary. In the same area, Feng et al. (2024) found that more pesticides (chlorpyrifos, clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid) exceeded their respective chronic criterion value for aquatic life (in 2019 and 2021). The Châteauguay River which also crosses many agricultural exploitations and receives pesticide discharge from Des Anglais, Trout, and Aux Outardes tributaries, is not as contaminated as downstream Des Anglais River. The higher waterflow of the Châteauguay River could explain this discrepancy in pesticide burden. Indeed, in July and August 2021 (year of our field study), the daily mean waterflow of Des Anglais was 0.16 and 0.07 m³/s respectively. Yet, Châteauguay's was approximately 65 times higher with 4.80 and 4.54 m³/s respectively (Québec Government, 2021b). When taking into account their respective water body volumes and waterflow, Feng et al., 2024 calculated that Châteauguay represents the main contributor of pesticide discharge to the Saint-Lawrence River in western Montréal, which therefore support our reasoning. That is although the overall concentrations of pesticides are lower than the ones found in Des Anglais River. Overall, following these

observations, pesticides and their transformation products are abundant in the surface waters of western Montérégie and neonics pose the most risk by exceeding the water quality criteria. This highlights the contribution of agriculture to the degradation of water quality in the Châteauguay River watershed. Additionally, according to the bacteriological, physicochemical and their water quality index (WQI), the government of Québec (2010) has reported that the water quality of Des Anglais River is good at its entry point into Quebec. However, the quality deteriorates progressively downstream until the outlet in Châteauguay River, with a WQI deemed as very bad, due to agricultural activities around and the input of Norton stream also surrounded by agricultural fields (Quebec Government, 2010; Simoneau, 2007). For the Châteauguay River, the WQI is doubtful at its entry point into Quebec, likely due to dairy farming south of the border. At Huntingdon (Qc), a city upstream of the river, the water quality improves due to the input from the Trout River. However, the quality deteriorates again progressively downstream and thereafter with a very bad WQI, due to agricultural activities around tributaries (Quebec Government, 2010; Simoneau, 2007). Despite the poor quality of surface waters, urban sanitation is generally well managed. Wastewater treatment plants serving most municipalities substantially reduce their contribution to organic contamination in surface waters. (Quebec Government, 2010; Simoneau, 2007).

These findings underscore the significant impact of agricultural activities on the water quality of the Des Anglais and Châteauguay Rivers. Pesticides and their transformation products are pervasive, with concentrations frequently exceeding water quality criteria for aquatic life, particularly for neonics downstream of the Des Anglais River. The disparity in pesticide burden between the two rivers can be attributed to differences in water flow and the influence of tributaries. While urban wastewater management appears effective, the progressive deterioration of water quality indices downstream highlights the pressing need for improved agricultural practices to mitigate pesticide discharge. These results align with previous studies, reinforcing the necessity of targeted interventions to protect aquatic ecosystems and maintain water quality within the Châteauguay River watershed.

Table 4. 1 Pesticides concentration (ng/L) measured in mussels from the Châteauguay River and Des Anglais River in August 2021.

Pesticides				Rivers				Aquatic criterion (µg/L)	
				Des Anglais		Chateauguay			
				Upstream	Downstream	Upstream	Downstream		
				LOD ⁵ (ng/L)	QC ⁶ (%)				
								Acute	Chronic
Herbicides	2,4-D	0.10	93	<LOD	172	79.5	86.4	1400	220
	AMPA ¹	2.00	103	21.3	315	24.8	91.2	-	-
	Atrazine	0.001	105	3.0	7.5	3.6	7.1	50	2
	Atrazine-2-hydroxy ¹	0.02	107	5.7	11.0	0.9	5.7	50	2
	Bentazon	0.30	100	<LOD	71.3	<LOD	9.1	11000	510
	Bromoxynil	0.03	94	<LOD	0.4	<LOD	<LOD	-	-
	Cyanazine	4.50	107	9.8	9.8	4.0	10.5	1000	2
	Dicamba	5.00	94	7.3	<LOD	<LOD	<LOD	-	10
	Dimethenamid	0.03	104	<LOD	65.5	0.1	4.1	260	5.60
	Deethylatrazine ¹	0.13	98	6.0	11.6	5.6	11.6	50	2
	Deisopropylatrazine ¹	0.06	96	1.9	5.0	2.4	4.0	50	2
	Flumetsulam	0.03	111	<LOD	1.3	<LOD	1.4	25000	3.1
	Fomesafen	0.05	100	<LOD	0.4	<LOD	0.4	-	-
	Glyphosate	2.00	103	42.7	142.4	39.2	63.9	-	800
	Imazethapyr	0.01	116	<LOD	45.3	<LOD	44.7	34000	8.1
	Linuron	0.01	105	<LOD	385.6	0.8	14.2	-	7
	MCPA	0.05	94	<LOD	413.6	2.3	43.4	-	2.6

Table 4. 1 (continued)

Pesticides		Rivers						Aquatic criterion (µg/L)		
		Des Anglais			Chateauguay					
		LOD ⁵ (ng/L)	QC ⁶ (%)		Upstream	Downstream	Upstream	Downstream	Acute	Chronic
Herbicides	Mecoprop	0.05	97	<LOD	0.4	<LOD	<LOD	10000	13	
	Mesotrione	0.33	109	<LOD	2.9	<LOD	1.2	-	-	
	(S)-Metolachlor	0.08	104	0.3	31.2	2.0	17.7	110	7.8	
	Metolachlor	0.01	99	42.1	233	90.0	233	-	-	
	ethanesulfonic acid ¹									
	Metolachlor oxanilic acid ¹	0.01	99	10.4	115	17.4	84.9	-	-	
	Metribuzin	0.37	105	5.9	10.2	3.8	22.3	-	1	
	Pendimethalin	0.50	113	5.6	15.5	5.0	<LOD	-	-	
	Prometryn	0.05	107	<LOD	215	0.5	16.3	-	-	
	Simazine	0.02	107	0.5	1.3	0.3	0.9	-	-	
	Topramezone	0.50	108	<LOD	1.8	<LOD	<LOD	-	-	
Fungicides	Azoxystrobin	0.02	105	0.2	25.1	0.5	2.2	-	1	
	Carbendazim	0.02	110	0.02	1.5	0.1	0.3	-	-	
	Fluxapyroxad	0.01	120	0.6	2.0	0.5	0.7	-	-	
	Metconazole	0.05	101	0.05	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	
	Propiconazole	0.19	103	0.6	1.2	1.5	1.0	-	3.7	

Table 4. 1 (continued)

Pesticides		Rivers						Aquatic criterion (µg/L)	
		Des Anglais		Chateauguay					
		Upstream	Downstream	Upstream	Downstream			Acute	Chronic
		LOD ⁵ (ng/L)	QC ⁶ (%)						
Fungicides	Pyrimethanil	0.01	108	<LOD	1.1	0.01	0.1	-	-
	Tebuconazole	0.02	115	<LOD	0.5	0.6	0.5	-	-
Insecticides	Acetamiprid	0.01	106	<LOD	0.1	<LOD	<LOD	-	-
	Carbaryl	0.03	102	<LOD	1.6	<LOD	<LOD	-	0.2
	Chlorantraniliprole	0.10	102	0.6	15.4	0.3	3.0	0.56	0.1
	Clothianidin ^{3,4}	0.10	100	0.1	7.4	<LOD	1.5	0.2	0.0083
	Desnitro-imidacloprid ³	0.02	97	<LOD	<LOD	0.1	<LOD	-	-
	Flonicamid	0.31	90	<LOD	1.5	<LOD	<LOD	-	-
	Imidacloprid ⁴	0.02	110	0.1	37.1	0.2	2.4	0.2	0.0083
	Thiacloprid ⁴	0.05	106	<LOD	0.2	<LOD	<LOD	0.77	0.064
	Thiamethoxam ⁴	0.01	108	<LOD	13.9	<LOD	0.4	0.2	0.0083

¹Herbicide transformation product²Also used as a fungicide³Insecticide transformation product⁴Neonicotinoids⁵LOD: limit of detection⁶QC: quality control

Mortality and Biomarkers responses

After one month of caging, only a single mussel was found dead downstream of Des Anglais River, while no mortality was observed at the other caging sites. This outcome was unexpected as *E. complanata* is native to all the waterbodies where caging occurred. Although the mortality observed downstream of the Des Anglais River represented only one individual out of twenty, it raises concerns about potential lethal effects of prolonged pesticide exposure on *E. complanata*. However, further studies are needed at that specific site to verify this hypothesis.

The comparison of biomarker values between upstream and downstream sites revealed significant differences in both rivers, depending on the biomarker assessed. In the Des Anglais River, AChE activity in the gills was significantly different between the caging sites (two-way ANOVA, $F_{1,16} = 13.812$, $p < 0.01$) with higher activity downstream and lower upstream (**Fig. 4.2.A**), while there were no differences in foot AChE activity. In the Châteauguay River, neither tissue displayed a difference in AChE activity between sites.

The significantly different AChE activity in the gills between the Des Anglais River sites may be due to pesticide exposure. Generally, AChE inhibition occurs following exposure to carbamate or organophosphorus pesticides (Casida and Durkin, 2013; Fulton and Key, 2009; Pundir and Chauhan, 2012). However, according to our pesticide characterization, none of these pesticide classes were detected at the upstream site of the Des Anglais (**Table 4.1**). Although other pesticide classes are not primarily known to be anticholinergic, some can inhibit AChE activity. While the mode of action of herbicides on AChE is not well characterized, neonicotinoids can alter nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) function (Simon-Delso et al., 2015; Sparks et al., 2013). For instance, glyphosate and neonics (clothianidin and imidacloprid) detected at the upstream site have been shown to inhibit AChE activity in aquatic invertebrates, including bivalves (Ewere et al., 2020; Gajula et al., 2023; Nombé et al., 2025; Yoloğlu et al., 2024). Nombé et al. (2025) demonstrated that concentrations of 0.1 and 0.15 mg/L of glyphosate caused significant AChE activity inhibition in *E. complanata* gills and muscular foot after 21 days of exposure *in vivo*. Similarly, the crustacean *Astacus leptodactylus* experienced strong AChE inhibition when exposed to imidacloprid (0.932, 0.466, and 0.233 mg/L) for 96 h (Yoloğlu et al., 2024). Another study reported the same outcome for the oyster *Saccostrea glomerata* at 0.1 and 1 mg/L of imidacloprid for 96h (Ewere et al., 2020). However, these concentrations are hundred thousands of times higher than those detected upstream Des Anglais River. Additionally, given the number of pesticides found in this site, their mixture could have an unpredictable effect on AChE activity. Compared to the upstream site, the downstream site of the Des Anglais River not only had higher AChE activity but also contained more pesticides at greater

concentrations. In contrast to organophosphorus compounds, some insecticides (e.g., organochlorines, pyrethroids, anthranilic diamides) are not anticholinergic, as they have other modes of action. Certain pesticides detected at this site (chlorantraniliprole, tebuconazole, and bentazone) can lead to increased AChE activity in aquatic organisms such as fish (AlMisherfi et al., 2023; Bitschinski et al., 2024; Hackenberger et al., 2018). For instance, AlMisherfi et al. (2023) exposed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to chlorantraniliprole (0.1 mg/L) for 96 h and observed increased brain AChE activity. More interestingly, mixtures of some pesticides detected in this site can also increase AChE activity in fish and amphibians (Bitschinski et al., 2024; Marin et al., 2021). A study on *O. niloticus* found that combinations of atrazine (0.56 µg/L), azoxystrobin (0.024 µg/L), and imidacloprid (0.11 µg/L) exposure led to increased AChE activity in 96h (Marins et al., 2021). Similarly, Bitschinski et al. (2024) observed the same effect in *Boana faber* tadpoles exposed to mixtures of bentazone (2.10 and 17.9 µg/L), chlorantraniliprole (0.70 and 3.80 µg/L) and tebuconazole (1.20 and 2.60 µg/L) for 16 days. These observations suggest that environmental exposure to pesticide mixtures in our study may have contributed to the increase of AChE activity in *E. complanata*. The increased AChE may be due to the organism's compensatory attempt aiming to reduce hyperstimulation caused by compounds binding to the nAChR (Marins et al., 2021). These results highlight potentially harmful effects in natural environments, where organisms may experience prolonged exposure. They also raise concerns about the lack of knowledge regarding the effects of multiple pesticides at various concentrations.

Oxidative stress was assessed by measuring TBARS concentrations at upstream and downstream sites in both rivers. In the Des Anglais River, two-way ANOVA revealed a significant increase in TBARS in the gills at the upstream site compared to downstream ($F_{1,16} = 7.454$, $p < 0.05$) (**Fig. 4.2.B**), with no differences observed between sexes or in the site-sex interaction. Although TBARS did not differ in the digestive gland, GST activity was significantly lower downstream ($F_{1,16} = 5.844$, $p < 0.05$) (**Fig. 4.2.C**). In the Châteauguay River, two-way ANOVA showed no significant difference in gills TBARS between upstream and downstream sites overall; however, there was a significant difference between sexes ($F_{1,16} = 5.760$, $p < 0.05$) and a significant interaction between site and sex ($F_{1,16} = 5.625$, $p < 0.05$). Further one-way ANOVA on each sex indicated a significant difference only in male gills ($F_{1,8} = 7.203$, $p < 0.05$) (**Fig. 4.3.A**). The GST activity was not different between upstream and downstream of Châteauguay River.

In both rivers, organisms exhibited signs of oxidative stress, with higher TBARS concentrations in the gills of upstream Des Anglais River mussels and in the gills of male mussels downstream Châteauguay River. Lipid peroxidation is frequently triggered by pesticide exposure, and antioxidant defense mechanisms can be similarly affected. For instance, dos Santos and Martinez (2014) exposed the freshwater clam *Corbicula fluminea* for 96 hours to atrazine (2 and 10 ppb), Roundup (2 and 10 ppm), and mixtures

of these concentrations. They noted that, in the digestive gland, glyphosate alone increased lipid peroxidation (LPO) and SOD activity and decreased CAT activity, while in the gills it elevated LPO, SOD, and GPx. In contrast, atrazine boosted SOD and GPx in the gills. Iummato et al. (2013) reported increased GST activity and LPO levels, but decreased SOD, in *Limnoperna fortunei* exposed to 1, 3, and 6 mg/L of glyphosate for 26 days. Similarly, when *Lamellidens marginalis* was exposed to monocrotophos, LPO and SOD were significantly elevated in the mantle, gills, foot, and muscle; GST was reduced in the gills but rose in the foot and muscle; and CAT declined in the mantle, muscle, and gills. Glutathione reductase (GR) decreased in the mantle and muscle but increased in the gills (Mundhe and Pandit, 2014).

Although the concentrations used in these studies were much higher than those measured at our caging sites, environmentally relevant levels of pesticides – such as atrazine (0.56 µg/L), azoxystrobin (0.024 µg/L), imidacloprid (0.11 µg/L), bentazone (2.10 and 17.9 µg/L), tebuconazole (1.20 and 2.60 µg/L), and chlorantraniliprole (0.70 and 3.80 µg/L) – have also been tested individually or in mixtures. For example, in 96-hour exposures of *O. niloticus*, a mixture of atrazine, azoxystrobin, and imidacloprid did not induce LPO but led to fluctuating effects on GST (Marins et al., 2021). Likewise, *B. faber* tadpoles exposed to bentazone, tebuconazole, and chlorantraniliprole at low concentrations for 16 days exhibited significantly lower LPO only when chlorantraniliprole was used (0.70 and 3.80 µg/L) or when all pesticides were combined at their lower concentrations (Bitschinski et al., 2024). Note that atrazine, azoxystrobin, imidacloprid, bentazone, tebuconazole, and chlorantraniliprole are both pesticides found in our caging sites. These findings illustrate that, at environmentally relevant concentrations, LPO can sometimes be lower than in controls, potentially explaining the reduced LPO observed downstream in the Des Anglais River. Ultimately, whether elevated or decreased fluctuations in GST activity and other oxidative stress biomarkers, suggest how organisms respond or fail to cope with pesticides, and pesticide-induced reactive oxygen species or oxidative damage. Various pesticide classes can generate reactive oxygen species in freshwater mussels, damaging cell membranes (Iummato et al., 2024; Köprücü et al., 2010; Mundhe and Pandit, 2014). Resulting changes in membrane integrity, permeability, and fluidity can impair essential processes like gas exchange in the gills and nutrient absorption and detoxification in the digestive gland (Abidli et al., 2021). Consequently, shifts in oxidative stress biomarkers serve as early warning signals for broader ecological impacts, potentially threatening survival, growth, and reproduction in aquatic organisms' population if antioxidant defenses become overwhelmed.

While no significant differences in VTG concentration were detected in the Châteauguay River, the Des Anglais River exhibited a notable increase in mussel gonad VTG levels at the downstream site (two-way ANOVA, $F_{1,16} = 13.110$, $p < 0.01$) (**Fig. 4.2.D**). This finding points toward possible endocrine

disruption, given that several pesticides detected in Des Anglais are known or suspected to interfere with hormonal pathways (Gasnier et al., 2009; Hassan et al., 2021; Zhu et al., 2019).

Interestingly, recent studies have reported the opposite effect (namely, VTG reduction) when aquatic organisms were exposed to pesticides alone or in mixtures with anti-androgenic or anti-estrogenic properties. For example, when zebrafish were exposed to thiamethoxam (0.05 and 0.5 $\mu\text{g/L}$), both estradiol-17 β and VTG levels decreased (Zhang et al., 2023). Likewise, 300 $\mu\text{g/L}$ of chlorantraniliprole over 60 days did not affect gonadal estradiol-17 β in *D. rerio* but led to reduced hepatic VTG (Shi et al., 2024). In the same experiment, estradiol-17 β and VTG significantly declined when chlorantraniliprole was combined with antibiotics. Another glyphosate-based formulation (Credit® Extreme) prompted a trend toward lower gonadal VTG levels in *E. complanata* after 21 days at 50 $\mu\text{g/L}$ (Nombré et al., 2025). Additionally, effects on *M. galloprovincialis* gonads at 100 and 1000 $\mu\text{g/L}$ of glyphosate varied with exposure duration (Fabrello et al., 2020). Although VTG gene expression remained unchanged, VTG concentrations declined significantly in males after 7 days yet rose sharply by day 21, whereas females displayed a marked decrease by day 21. Conversely, other investigations have reported VTG increases under high pesticide concentrations, their mixtures, or complex contaminant exposures. For instance, when *L. fortunei* was exposed to glyphosate at 3 or 6 mg/L for 26 days, gonadal VTG increased (Iummato et al., 2013). Another study using zebrafish embryos exposed to a mixture of triazophos (0.25 mg/L) and imidacloprid (13 mg/L) found elevated VTG levels and gene expression within 96 h (Wu et al., 2018). Moreover, exposing *E. complanata* males to atrazine (1.5 and 15 $\mu\text{g/L}$) for 6h, led to evidence of feminization, followed by an increase in VTG concentration (Flynn et al., 2013). Similar feminization effects have been noted in *E. complanata* males exposed to urban effluent (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2011), where a drastic rise in female-to-male ratio paralleled a surge in VTG and serotonergic changes in males (Gagné et al., 2011). Bouchard et al. (2009) also reported substantial VTG elevations in caged *E. complanata* at an urban effluent-impacted site. As the precursor protein of egg-yolk in oviparous organisms, VTG is governed by estrogen receptors and is crucial for embryogenesis (Gagné et al. 2001). During gametogenesis, oocytes secrete estradiol-17 β targeting the receptor in the gonads (in case of some invertebrates) to activate vitellogenesis, under natural conditions (Gagné et al., 2001). Therefore, VTG can reflect estrogenic effects of contaminants on the mussel's reproductive system. Given that our mussels released their glochidia before being encaged, and considering that VTG level of bivalves should be lower right after the spawning season (Gagné et al., 2009), the unexpected increase in VTG could be attributed to endocrine-disrupting chemicals. Thus, downstream Des Anglais River may contain pesticides that acted as endocrine-disruptors. Such an abnormal rise of VTG at this site has the potential to disrupt the reproductive cycle of *E. complanata*, consequently have cascading effects on their reproductive health and overall population dynamics.

To gain insights on metabolism energy reserves in *E. complanata*, the lipids and proteins content were assessed in different organs. In the digestive gland, only a trend toward a difference (two-way ANOVA, $F_{1,16} = 3.665$, $p < 0.1$, **Fig. 4.2.G**) was observed for the lipids content downstream Des Anglais River. Regarding the proteins content, the two-way ANOVA showed highly significant lesser in the foot ($F_{1,16} = 9.599$, $p < 0.01$) and gonads ($F_{1,16} = 16.529$, $p < 0.001$, **Fig. 4.2.E, F**) of caged mussels downstream Des Anglais River. The total proteins were also highly significantly lesser at the same site ($\chi^2 = 11.063$, $p < 0.001$) after a Kruskal-Wallis test (**Fig. 4.2.H**). For Châteauguay River, the lipids content in the digestive gland was significantly different regardless of the sex (two-way ANOVA, $F_{1,8} = 8.400$, $p < 0.05$). Downstream mussels had significantly lower lipids in the digestive gland than the upstream ones (**Fig. 4.3.B**). In the gonads, only the proteins showed a significant model after the ANOVA two-way. Although there was no site effect on protein content, the sexes appeared to be highly significantly different ($F_{1,16} = 41.151$, $p < 0.001$) and an interaction between site and sex was also evident ($F_{1,16} = 7.671$, $p < 0.05$). Further investigation (one-way ANOVA) on each sex showed that only the males' proteins were highly significantly different between sites ($F_{1,8} = 12.166$, $p < 0.01$). Downstream males had fewer proteins in the gonads than upstream ones (**Fig. 4.3.C**). Proteins and lipids are critical biomolecules in the life cycle of bivalves, serving as both energy reserves and structural components essential for growth, reproduction, and stress tolerance (Bhalchandra and Lomte, 2004; Giese, 1966; Lomte and Alam, 1982). Our findings – showing reduced protein content in *E. complanata* foot and gonads in the site downstream Des Anglais River, and diminished lipid levels in the digestive gland as well as lower gonadal protein in male mussels downstream in the Châteauguay River – suggest that metabolic and reproductive health may be compromised at these sites. Various factors, including pesticide exposure, could underlie these alterations.

Numerous studies highlight that pesticides or their mixtures can affect protein metabolism in diverse aquatic species (Frontera et al., 2011; Kocamaz and Oruc, 2020; Neelamegam et al., 2006). However, the direction and magnitude of these effects vary widely and depend on the concentration, type of pesticide, presence of surfactants, and the specific organism or tissue studied. For instance, Matozzo et al. (2018) noted no change in protein levels in the gills and digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* under relatively low glyphosate exposures (10, 100, and 1000 $\mu\text{g/L}$). In contrast, high glyphosate concentration (22.5 mg/L) significantly decreased muscle proteins in *Cherax quadricarinatus* (Frontera et al., 2011). Other pesticides, such as indoxacarb (0.08-0.39 mg/L), thiamethoxam (2.58-12.89 mg/L), and triazophos (0.73-3.67 mg/L), have been shown to deplete proteins in multiple tissues (gills, gonads, mantle, digestive gland, and foot) of freshwater mussels like *L. marginalis* and *Parreysia cylindrica* (Minakshi et al., 2013; Patil, 2011). Increased proteolytic activity and metabolic use of proteins, possibly triggered by toxic stress, often explain such protein depletions (Neelamegam et al., 2006). Our observations that certain tissues (e.g., gills, digestive gland) remained unaffected while others (foot, gonads in Des Anglais; male

gonads in Châteauguay) displayed significant protein reductions are consistent with this mosaic of pesticide effects. Similar organ-specific responses have been reported in crustaceans exposed to complex mixtures (Salih et al., 2024) and in bivalves under different pesticide formulations (Nombré et al., 2025). Such variability may stem from differing tissue roles in detoxification, energy storage, or reproductive processes.

We measured the lipid concentration in the gills and digestive gland to only find lower concentration in the latter organ downstream of both rivers. Although some studies report that organophosphorus pesticides can increase lipid content (Bhalchandra and Lomte, 2004), others show that other classes of pesticides can cause the opposite effect (Frontera et al., 2011; Gonçalves et al., 2016; Ilyaskina et al., 2024). Bhalchandra and Lomte (2004) have shown that organophosphorus pesticides (carbaryl – 1.16 mg/L, cypermethrin – 0.10 mg/L and endosulfan – 0.09 mg/L, for 96h) can increase lipid level in different organs and whole body of *Parreysia cylindrica*. The authors suggested that this could be attributed to lipase inhibition by organophosphorus pesticides, leading to an increase in free fatty acids. However, this class of pesticide was not much detected in our river sites. Other classes of pesticides have been shown to reduce lipid content among other effects regarding energy metabolism. For example, glyphosate at 22.5 mg/L was found to reduce glycogen and lipid reserves in *C. quadricarinatus* (Frontera et al., 2011) and lower metabolic rates in *Procambarus clarkii* (Frontera et al., 2014). Additionally, Primextra® Gold TZ (a formulation of herbicides, terbuthylazine and *S*-metolachlor from 0.5 to 30 mg/L), reduced diversity and abundance of fatty acids in bivalves (*Cerastoderma edule* and *Scrobicularia plana*) when exposed for 96 h (Gonçalves et al., 2016). Ilyaskina et al. (2024) also observed the same result with a springtail (*Folsomia candida*) exposed to 0.035 mg/L of the insecticide teflubenzuron. They also found a link between lipids reduction and reproduction success (reduced offspring production). Our data, showing lower lipid content in the digestive gland of downstream mussels, supports the hypothesis that diverse pesticide concentrations or mixtures may compromise energy reserves in bivalves. The deficiency of essential lipids poses its own risk, hindering the organism's ability to endure stress, maintain normal metabolic functions, and successfully reproduce.

From an ecological perspective, alterations in protein and lipid stores can have cascading effects on individual fitness and population dynamics. Bivalves rely on these reserves to sustain energy-intensive processes like gonadal development, spawning, and glochidia production. Depleted protein or lipid levels might delay or disrupt gametogenesis, resulting in lower reproductive success (Bhalchandra and Lomte, 2004; Giese, 1966). This concern is particularly pressing for *E. complanata*, which plays crucial roles in aquatic ecosystems, including nutrient cycling and habitat structuring. Moreover, the stress responses observed here may be exacerbated under agroecosystem conditions where pesticide mixtures are common, potentially acting synergistically (Kocamaz and Oruc, 2020; Salih et al., 2024). Even if single pesticides at

low concentrations do not elicit discernible metabolic shifts, combined exposures can provoke significant impairments (Frontera et al., 2011, 2014; Gonçalves et al., 2016). Our findings thus underscore the importance of investigating real-world contaminant mixtures, which are more representative of what mussels' experience *in situ*.

Additionally, the presence of pesticides at all caging sites introduced complexities when making direct comparisons. Nonetheless, these challenges do not undermine our result interpretations. By integrating biomarkers from each site with established reference and threshold values, it was still possible to draw further meaningful comparisons.

Reference and threshold values and IBR-T

For the first time, we provided tissue-specific reference and threshold values representing the natural variation of *E. complanata*'s biomarkers. These values, listed in **Table 4.2**, may require further refinement and validation because incorporating data from more diverse populations or habitats will increase their precision and applicability for the species' active biomonitoring under various environmental conditions (Leprêtre et al., 2022). Analysis of the IBR-T values revealed a gradient of physiological condition across the caging sites (**Fig. 4.3**). The steeper the gradient, the more the state of physiological condition declines. Specifically, the respective IBR-T values of 0.53, 0.64, 0.88, and 1.13 indicate a progressive decline in physiological condition of *E. complanata*, following the order of upstream Châteauguay < downstream Châteauguay < upstream Des Anglais < downstream Des Anglais, respectively. Initially, even at the site upstream of the Des Anglais River, which had the lowest pesticide concentrations and no exceedances of aquatic life criteria (**Fig. 4.4.A**), 7 out of 14 biomarkers deviated from the reference and threshold values. As anticipated, the site downstream of the Des Anglais River, characterized by the highest pesticide concentrations and number of detected pesticides, exhibited the highest number of biomarkers (10 out of 14) that deviated from the reference and threshold values (**Fig. 4.4.B**). At this site, some pesticide levels exceeded the criteria for protecting aquatic life (**Table 4.1**). Finally, although there were more pesticides detected than upstream Des Anglais, both upstream and downstream of the Châteauguay River had fewer biomarkers deviating from the threshold values (5 out of 14 biomarkers – **Fig. 4.4.C.D**). Additionally, the biomarker deviations were less different between the upstream and downstream sites of the Châteauguay River. These findings suggest that while pesticide presence at all sites likely impacted the physiological condition of *E. complanata*, the effects varied, probably due to differences in the number, concentration, and mixtures of pesticides detected at each site. Schäfer et al. (2023) reviewed ecotoxicological studies and found that even though pesticides are present at low concentrations, their combinations could have unexpected effects in bioassays. They then stated that low concentration mixtures of chemicals must still be considered to accurately explain the observed effects. This conclusion is consistent with the results we

obtained at the upstream site of the Des Anglais River and both upstream and downstream site of Châteauguay River. Just as for the presence and concentration of pesticides in Châteauguay River, the high waterflow might have mitigated the pesticides mixture effect in the caging site of this river. Beyond this hypothesis, the complexities of environmental pesticide mixtures remain largely unexplored, as most studies on pesticide interactions and toxicities focus on a limited number of compounds tested under controlled laboratory conditions (Kocamaz and Oruc, 2020; Olsvik and Søfteland, 2020; Schaeffer and Wijntjes, 2022; Schäfer et al., 2023; Wu et al., 2018; Zhao et al., 2020). However, in an intensive agricultural environment like the Châteauguay River watershed, *E. complanata* alongside other non-target species are frequently exposed to complex mixtures of multiple pesticides. Analyzing the effects of these mixtures is challenging because the behavior of each active ingredient can be altered by the presence of other active ingredients or surfactants originally added in commercial formulations to enhance the effectiveness of pesticides (Defarge et al., 2018; Schäfer et al., 2023). Nevertheless, characterizing the pesticide composition in agri-environmental water bodies is crucial for understanding the impacts of these mixtures at each site. In this study, the application of the IBR-T was aimed at linking the characterized pesticide mixtures at each caging site with the health effects observed on caged *E. complanata* exposed to pesticides at different kind of mixtures. The advantage of caging is that the environmental conditions are realistic, and the mixture represents a true site-specific cocktail in unique and authentic combinations. Consequently, in our study, the effects observed in the IBR-T were ecologically relevant, reflecting the impact of typical pesticide mixtures present at each site in the watershed of Châteauguay River.

Table 4. 2 Reference and threshold values of biomarkers for *E. complanata*, derived from Leprêtre et al. (2022) and Catteau et al. (2023) methodologies.

Tissue	Biomarkers	Units	Induction Thresholds	Inhibition Thresholds	Reference Values
Gills	TBARS	nmol/mg lipid	26.8	-	18.7
	AChE	nmol/(mg·min) protein	-	1.21	1.16
	Lipid	mg/g tissue	1.71	1.71	1.73
	Protein	mg/g tissue	-	12.9	12.1
Digestive gland	TBARS	nmol/mg lipid	38.9	-	27.9
	GST	μmol/(mg·min) protein	28.0	17.7	18.4
	Lipid	mg/g tissue	2.58	2.58	2.65
	Protein	mg/g tissue	-	28.2	29.8
Foot	AChE	nmol/(mg·min) protein	-	1.08	1.12
	Protein	mg/g tissue	-	29.4	30.6
Gonads	VTG	μg/mg protein	665	-	492
	Protein	mg/g tissue	-	28.8	26.6
Hole organism	CI	-	-	10.1	8.97
	GSI	-	-	0.18	0.16

TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances); AChE (acetylcholinesterase); GST (glutathione-S-transferase); VTG (vitellogenine); CI (condition index); and GSI (gonadosomatic index).

“-”: not defined

The findings of this study highlight the intricate relationship between pesticide contamination in agricultural watersheds and the health of aquatic organisms, with a particular focus on Châteauguay River watershed, a region heavily impacted by agriculture. This area, home to species that may require conservation attention, serves as a critical case study to explore the effects of pesticides on non-target species, particularly the freshwater mussel *Elliptio complanata*. Pesticides have significant unintended consequences on the environment, particularly when they enter aquatic ecosystems. Their persistence and tendency to form complex mixtures pose substantial challenges for water use, as well as for effective environmental monitoring and management. In this study, biomarker-specific reference, and threshold values for *E. complanata* were established, laying the groundwork for future research utilizing the same *in situ* model. These threshold values will be refined with additional studies to integrate a wider array of health markers along with broader ecophysiological variability. This, in turn, will extend the geographical applicability and overall ecotoxicological relevance of these values. As more data is collected across the spectrum of possible biomarker responses, these reference and threshold values will become increasingly useful in environmental assessments. These reference and threshold values used in the IBR-T method provided valuable insights into the health impacts of pesticide mixtures on *E. complanata*. By comparing biomarkers across caging sites within Des Anglais and Châteauguay Rivers, the research demonstrated an insightful gradient of health effects, related to the levels of pesticide contamination. Downstream Des Anglais, characterized by the highest pesticide concentrations, exhibited the most severe biomarker deviations, indicating noteworthy stress and physiological disruption in the caged mussels. In contrast, the Châteauguay River sites, despite being contaminated, showed less pronounced biomarker responses. This difference can be attributed to the higher waterflow in the Châteauguay River, which likely reduces the concentration and impact of pesticides through dilution. However, this does not diminish the risks posed by the detected pesticides mixtures, as even low concentrations of these chemicals can have significant effects, particularly when organisms are exposed over extended periods. Overall, this result highlighted the detrimental effects of pesticide mixtures, with evidence of oxidative stress, altered metabolic and detoxification processes, neurotoxicity and elevated vitellogenin levels. These effects on *E. complanata* are particularly concerning, given the potential for these substances to be fatal or interfere with reproductive processes and lead to population decline.

The study also highlighted the inherent challenges in assessing the ecological impacts of pesticide mixtures. Non-target species are often exposed to mixtures of multiple pesticides, each with different modes of action and potential for interaction. These interactions can modify the toxicity of individual components, leading to effects that are not predictable based on studies of a single or a couple of compounds. The findings from this study support the notion that environmental risk assessments must account for the cumulative and interactive effects of multiple pesticides to accurately reflect the risks to aquatic life.

Moreover, the study emphasizes the importance of utilizing robust biomonitoring tools such as the IBR-T method. By incorporating natural variation thresholds, this approach provides a more comprehensive and context-specific assessment of organism physiological condition in contaminated environments. It addresses the limitations of traditional methods that rely on pristine reference sites, which may not always be available or applicable. The IBR-T approach is particularly valuable in complex environments like the Châteauguay River watershed, where multiple stressors may influence biomarker responses. For environmental monitoring purposes, this method should be considered as a first step, using both specific and non-specific biomarkers to assess the effects of chemical contamination prior undertaking more costly chemical characterization.

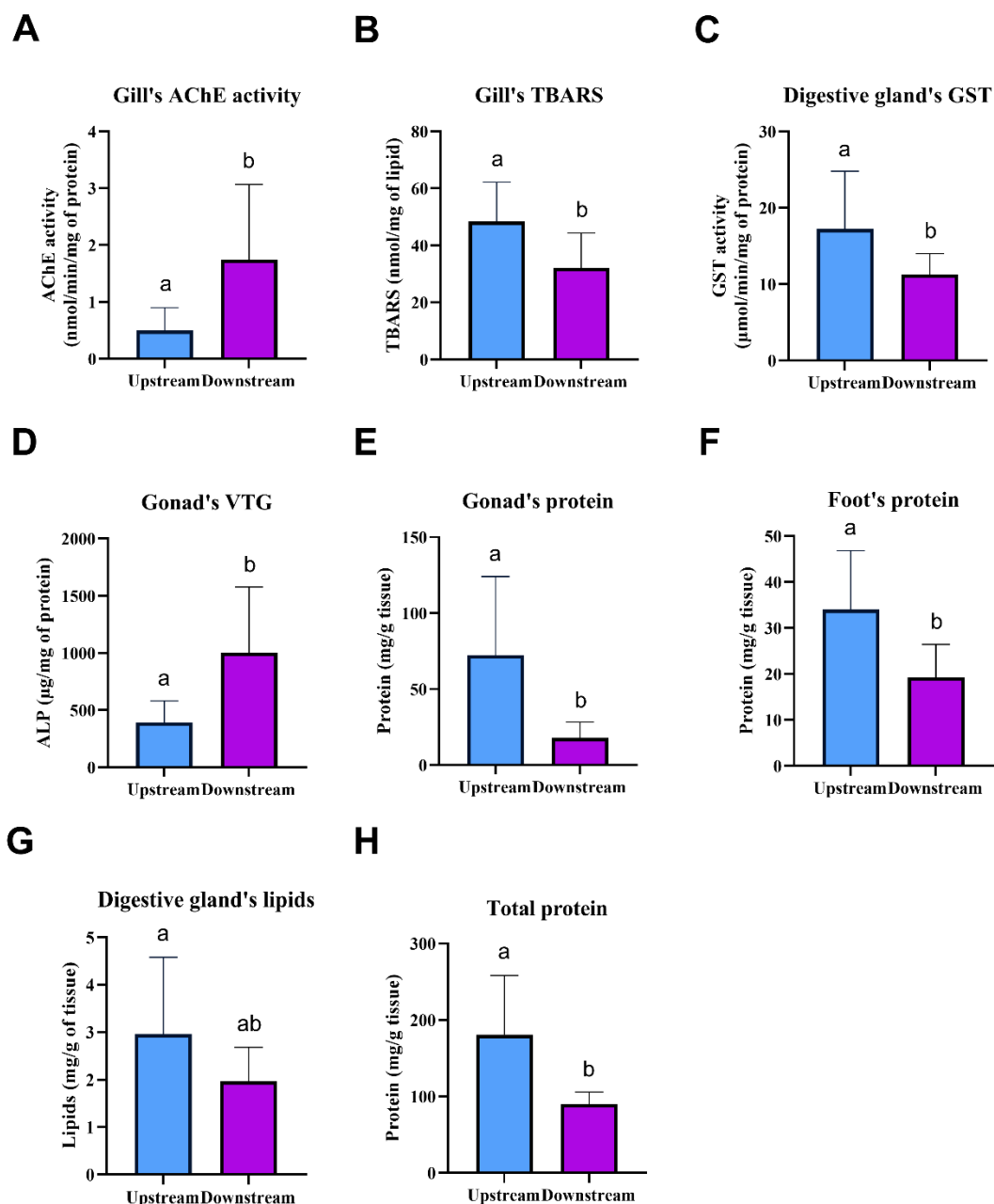


Figure 4. 2 Des Anglais biomarkers. (A) gills' acetylcholinesterase activity (AChE), (B) gill's oxidative damages (TBARS), (C) digestive gland's glutathione-S-transferase (GST), (D) Gonads' vitellogenin (VTG), (E) Gonads' proteins, (F) foot's proteins, (G) digestive lipids, and (H) total proteins in *E. complanata* exposed upstream and downstream Des Anglais River. The values are means $\pm$ SD (n=10). The data were tested by two-way and/or one-way ANOVA. Only the total protein was tested by Kruskal-Wallis' rank sum test. The letter b indicates statistically significant difference between sites.

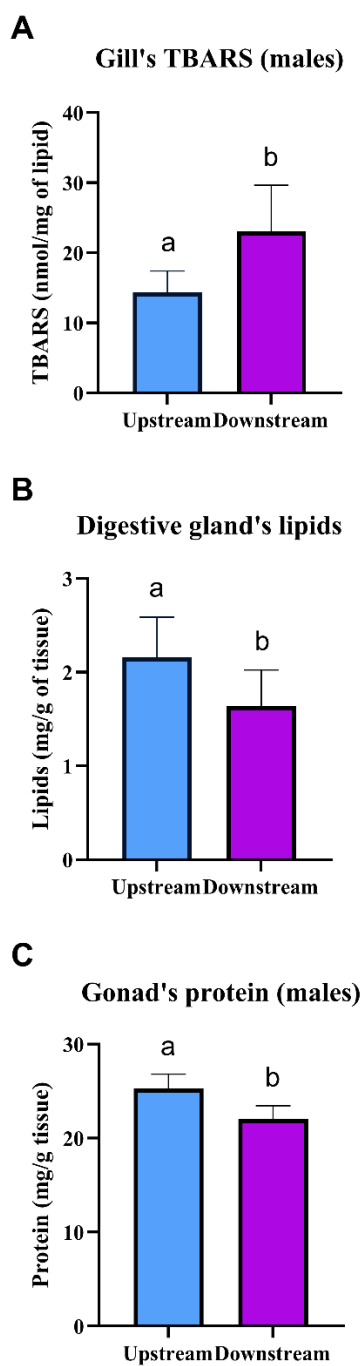


Figure 4. 3 Chateauguay River's biomarkers. (A) Gills' oxidative damages (TBARS), (B) digestive gland's lipids and (C) gonads' proteins in *E. complanata* exposed upstream and downstream Chateauguay River. The values are means $\pm$ SD (n=10). The data were tested by two-way and/or one-way ANOVA tests. The letter b indicates statistically significant difference between sites.

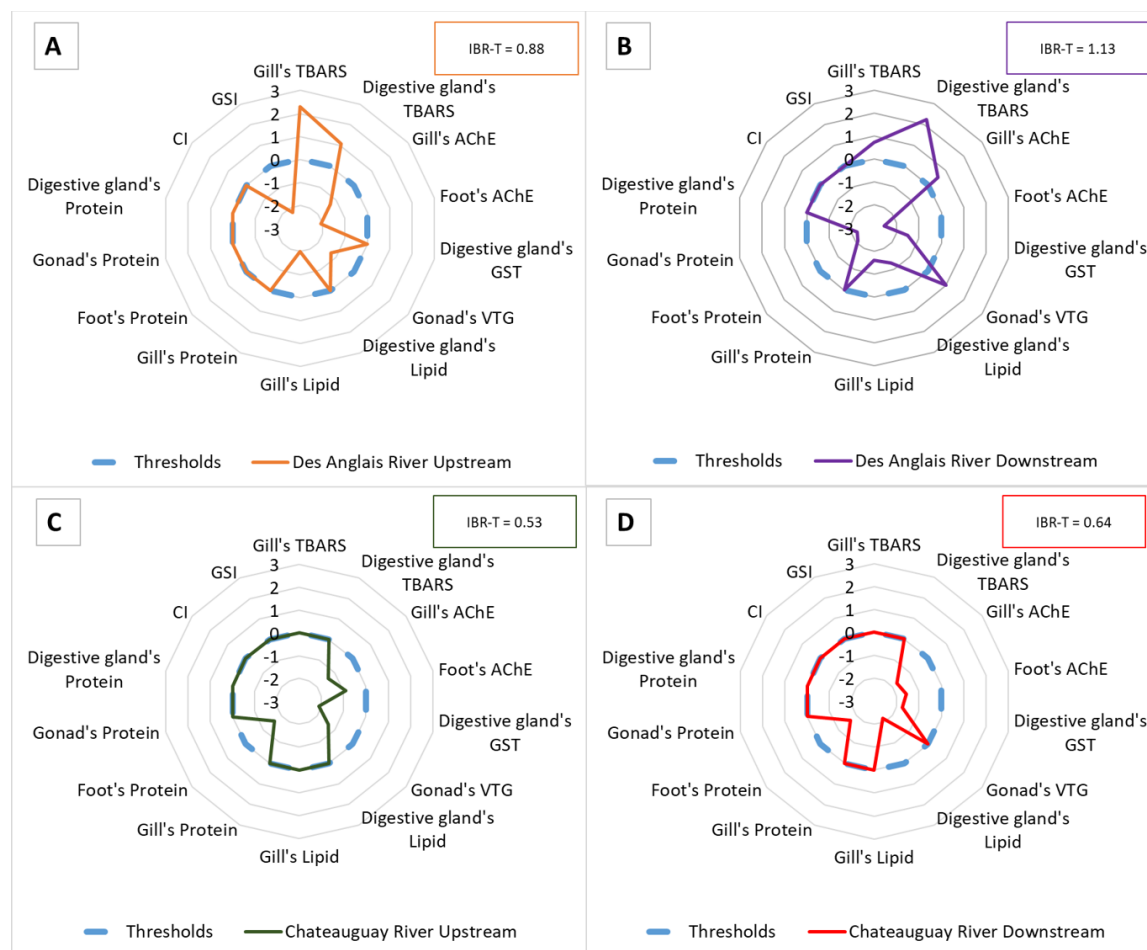


Figure 4. 4 Starplots of IBR-T for Des Anglais River upstream (A) and downstream (B), and Chateauguay River upstream (C) and downstream (D). The thresholds are represented by the blue dotted curve, and the IBR-T values are given at the top right in each figure.

4.3 Conclusion

This study underscores the pervasive presence of pesticides and their transformation products in the Châteauguay River watershed, demonstrating how multiple agricultural pesticides – even at concentrations below individual regulatory criteria for aquatic life – can combine to exert stress on non-target aquatic organisms. By caging *E. complanata in-situ* and measuring a suite of biomarkers tied to key physiological processes (e.g., neurotoxicity, oxidative damage, detoxification, reproductive function, and energy metabolism), we captured a clear gradient of health responses ranging from relatively low stress at upstream sites to significant disruptions downstream where pesticide concentrations were highest. A key innovation in this study was the introduction of biomarker-specific threshold and reference values for *E. complanata*, which allowed us to apply the IBR-T approach. The higher pesticide burdens and exceedances of aquatic-life criteria downstream of the Des Anglais River were associated with the highest IBR-T values and the most pronounced biomarker deviations.

In conclusion, this study contributes to a growing body of evidence that underscores the ecological risks posed by pesticide use in agricultural environments. It shows that the IBR-T approach can serve as a powerful early-warning tool, providing an integrative assessment of contaminant effects on aquatic organisms and supporting decision-making in environmental monitoring before more costly chemical analyses are undertaken. It also highlights the need for comprehensive environmental monitoring programs that consider the effects of pesticide mixtures on non-target species. The findings also suggest that current guidelines for pesticide application may not fully protect aquatic ecosystems, particularly in regions with intensive agricultural activity. Policymakers and environmental managers should consider these insights when developing strategies to mitigate the impact of pesticides on aquatic life. Additionally, further research is needed to better understand the mechanisms underlying pesticide interactions and their long-term effects on biodiversity and ecosystem health.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors express sincere thanks to Annie Paquet from “Ministère de l’Environnement de la Lutte contre les Changements Climatiques de la Faune et des Parcs” for mussels sampling. The authors are thankful to the UQAM Aquatic facilities for the maintenance of the mussels during the experiments. They also thank Carla Mahé and Charlotte Lassere for laboratory work, and Xiameng Feng from the Laboratory of Analytical Chemistry of “Université de Montréal” for the pesticide analyses. Finally, they thank Chantale André and Catherine Jumarie for technical support, Philippe Juneau for providing *P. subcapitata* inoculum, and Alain Geffard, Iris Barjhoux, and Audrey Catteau for their advice about data integration technique.

This project was funded by Environment and Climate Change Canada (Fonds pour dommages à l’environnement) under a grant given to L. Vandelac and L. Parent. The authors would like to thank the Fondation UQAM (2020 to 2022), the Collectif de recherche Écosanté sur les pesticides, les politiques et les alternatives (CREPPA), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under a grant given to M. Boily (No. RGPIN-2016–05142), the Centre de recherche en écotoxicologie du Québec (EcotoQ) and the Centre interdisciplinaire de recherche en opérationnalisation du développement durable (CIRODD) for scholarships attributed to Y. Nombré.

Appendix A Supplementary data

Table S4. 1 Physicochemical parameters recorded at mussels' caging sites.

Site	Des Anglais River		Châteauguay River	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
Temperature (°C)	19.5	22.4	20.3	22.2
pH	6.59	6.72	6.90	6.60
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	112	320	119	243
Dissolved oxygen (mg/L)	10.4	8.19	10.6	8.55

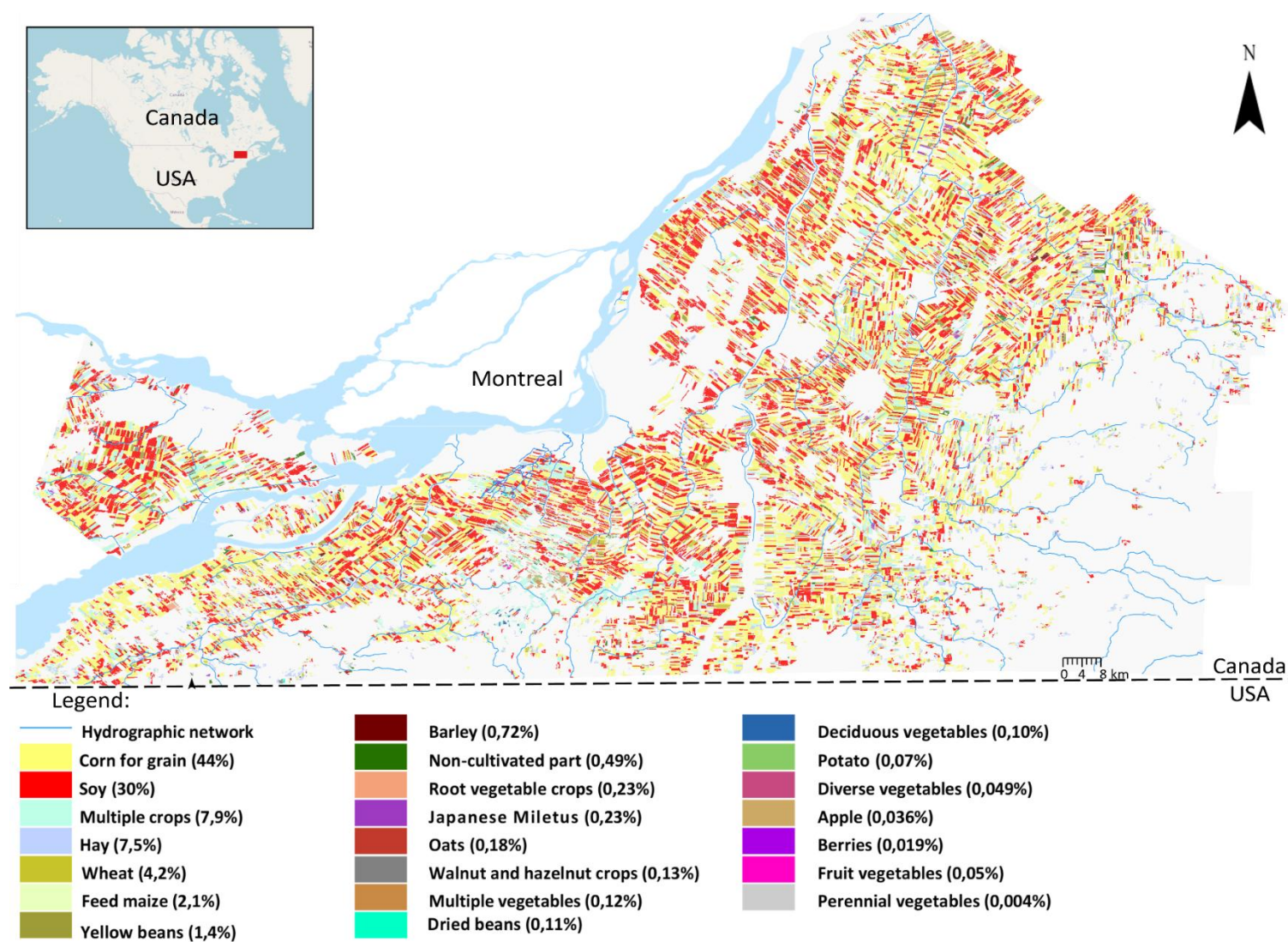


Figure S4. 1 Different crops representation in the Montérégie region. Data: Financière Agricole (Québec), 2018.

CHAPITRE V LE RISQUE CACHÉ DES PESTICIDES : PROPOSITION D'OUTIL DE DIAGNOSTIC DE L'ÉTAT DE SANTÉ DES AGROÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES

Biosurveillance active des pesticides en milieu aquatique : développement d'un indice de risque basé sur les biomarqueurs chez *E. complanata*

Nombré Y. A.¹, Boily M.¹ and Parent L.^{2*}

- 1 Université du Québec à Montréal (UQAM), Département des sciences biologiques, 141, Avenue du Président-Kennedy, H2X 1Y4 Montréal, Québec, Canada
- 2 Université TÉLUQ, Département Science et Technologie, 5800 Saint-Denis, bureau 1105, H2S 3L4 Montréal, Québec, Canada

* Auteur chargé de la correspondance : lise.parent@teluq.ca

Article en préparation pour être soumis à la revue Vertigo

RÉSUMÉ

Le but de cette étude est de développer et d'appliquer un nouvel outil, l'Indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB), pour évaluer le risque posé par la contamination des écosystèmes aquatiques par les pesticides.

Cet outil combine deux indices : l'Indice de risque des pesticides (IRP) et l'Indice des réponses de biomarqueurs (IRB), permettant ainsi une évaluation globale de l'impact des pesticides sur la condition physiologique d'*Elliptio complanata*. L'étude s'appuie sur des données de caractérisation chimique des pesticides et sur des mesures de biomarqueurs effectuées chez la moule *E. complanata*, exposée aux pesticides dans deux rivières agricoles du Québec : la rivière Châteauguay et la rivière des Anglais.

Les résultats montrent que l'IRPRB est plus élevé aux sites situés en aval de ces rivières, où les concentrations de pesticides et leurs effets biologiques sont plus prononcés. En amont, les risques évalués étaient plus faibles, en raison d'une exposition réduite. En aval de la rivière des Anglais, l'IRPRB a indiqué un niveau de risque « majeur » nécessitant une intervention urgente pour limiter la détérioration de la qualité de l'eau. En aval de la rivière Châteauguay, le niveau de risque était « modéré », bien que l'IRP y soit faible. L'étude a également révélé que, même lorsque les concentrations de pesticides respectent les critères de qualité de l'eau pour la préservation de la vie aquatique, la présence simultanée de plusieurs pesticides peut représenter un danger pour la santé des organismes aquatiques.

L'IRPRB offre un cadre d'évaluation environnementale simple et efficace, capable de fournir des alertes précoces sur la dégradation des écosystèmes. Cet outil peut guider les interventions et améliorer les pratiques de gestion des pesticides dans les régions agricoles, contribuant ainsi à la protection et à la conservation des écosystèmes d'eau douce.

Mots clés :

Pesticides

Biomarqueurs

Elliptio complanata

Méthode intégrative

Évaluation de risque

Rivières agricoles

Indice de risque

INTRODUCTION

Le Québec se distingue par une richesse naturelle particulièrement précieuse : ses ressources hydriques, auxquelles sont liés de nombreux écosystèmes riches et diversifiés. Les lacs, rivières et zones humides abritent une faune et une flore variées, jouant un rôle crucial dans la préservation de la biodiversité. La gestion des ressources en eau doit donc tenir compte non seulement des besoins humains, mais aussi de la protection des écosystèmes. Malgré cette abondance, des défis existent en matière de gestion durable de l'eau douce au Québec (MELCC, 2020ab, 2022). Le réchauffement climatique, la pollution des eaux et la pression croissante des activités humaines exigent une gestion rigoureuse et des politiques environnementales solides pour garantir que cette ressource soit préservée pour les générations futures.

Pour la protection de l'environnement en général, des ressources en eau en particulier, et pour l'encadrement de leur usage, le Québec a mis en place des politiques telles que la LCPN ("Loi sur la conservation du patrimoine naturel," RLRQ, c-61.01), la LACCRERP ("Loi affirmant le caractère collectif des ressources en eau et visant à renforcer leur protection," RLRQ, c. C-6.2), et la LCCMHH ("Loi concernant la conservation des milieux humides et hydriques," LQ, (2017) c. 14). D'autres politiques complémentaires, comme la LP ("Loi sur les pesticides," RLRQ, c. P-9.3) et la LQE ("Loi sur la qualité de l'environnement," RLRQ, c. Q-2), sont également à disposition pour protéger la qualité de l'environnement dans son ensemble.

Grâce à ces politiques, divers programmes ont été mis en place pour protéger les écosystèmes aquatiques, réduire la pollution de l'eau et améliorer la gestion des eaux usées. Ces initiatives comprennent également des mesures pour lutter contre la pollution diffuse liée à l'agriculture, où les pesticides constituent l'une des principales sources de contamination. Entre autres, l'obligation d'obtenir une ordonnance accompagnée d'une justification agronomique avant la vente et l'utilisation des pesticides les plus nuisibles a été instaurée (Giroux, 2022). Des études régulières, menées par des initiatives gouvernementales, visent à caractériser la présence de pesticides dans les cours d'eau (Giroux, 2014, 2015, 2018, 2019, 2022 ; Giroux et al., 2016). Tout comme plusieurs institutions environnementales dans d'autres pays (NORMAN, 2024), le ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP) détermine et adopte régulièrement plusieurs critères de qualité pour protéger la vie aquatique relatifs aux pesticides, basés sur les concentrations de toxicité individuelle de chaque ingrédient actif pour les organismes aquatiques. Les critères en vigueur sont : le critère de qualité pour la vie aquatique chronique

(CVAC) et celui pour la vie aquatique aigue (CVAA), (MELCC, 2019). Malgré les efforts consentis par le MELCCFP, plusieurs pesticides, appartenant à différentes classes, ainsi que leurs produits de dégradation, continuent d'être fréquemment détectés dans les tributaires du fleuve Saint-Laurent, parfois à des taux de détection proches de 100 % (Giroux, 2022). De plus, entre 2011 et 2021, plusieurs rivières ont régulièrement enregistré des dépassements des critères CVAC et CVAA pour des dizaines de pesticides, notamment les herbicides tels que l'atrazine, la métribuzine, le *S*-métolachlore, le diméthénamide et le MPCA, ainsi que des insecticides incluant les néonicotinoïdes (clothianidine, thiaméthoxame et imidaclopride), le chlorantraniliprole, le chlorpyrifos, le carbaryl, le diazinon, le diméthoate, le malathion et la perméthrine (Feng et al., 2024 ; Giroux, 2022 ; Montiel-León et al., 2019). L'omniprésence de ces pesticides dans l'eau de surface du Québec et le dépassement des critères impliquent qu'ils peuvent, individuellement, représenter un risque d'effets sévères à court terme pour les dépassements de CVAA et d'effets sous-létaux à long terme sur les populations pour les dépassements de CVAC (CCME, 2007 ; Feng et al., 2024 ; MELCCFP, s.d.). De plus, même si la concentration de chaque pesticide pris isolément est inférieure aux critères de qualité, la présence simultanée de plusieurs pesticides ou de leurs produits de transformation, souvent aussi persistants et parfois plus toxiques, peut entraîner une toxicité accrue en raison des effets « cocktails » (Feng et al., 2024 ; Kortenkamp et Faust, 2018 ; Relyea, 2009).

Bien que les études de caractérisation fournissent des informations sur la présence, la concentration et les risques écologiques potentiels des pesticides et de leurs produits de transformation, elles ne permettent pas de mesurer directement les effets réels de ces substances, individuellement et en mélange, sur les écosystèmes aquatiques. La biosurveillance active de l'état de santé des organismes aquatiques en complément des efforts de caractérisation devient alors essentielle. Cette approche « bimodale » permet d'obtenir un portrait global de la contamination par les pesticides et leurs produits de transformation, ainsi que de leurs effets insidieux sur les espèces. Étant donné que les dépassements des CVAC suggèrent un risque d'effets sous-létaux, il serait pertinent d'évaluer les impacts précoces sur les écosystèmes exposés à la pollution diffuse par les pesticides. Pour cela, divers outils ont été développés, et les biomarqueurs biochimiques et physiologiques, capables de révéler l'impact individuel ou combiné des pesticides, constituent l'une des premières alertes d'une éventuelle dégradation de la santé de l'écosystème (Milinkovitch et al., 2019). Les biomarqueurs sont utiles pour se renseigner sur l'état des systèmes et fonctions biologiques des organismes. Leur utilisation conduit cependant à la production de grands ensembles de données de biomarqueurs, dont l'interprétation présente un défi de taille (Catteau et al., 2023), vu le nombre élevé de paramètres à considérer. Pour pallier cela, plusieurs approches d'intégration de données de biomarqueurs sont utilisées depuis des décennies pour contribuer à une interprétation plus éclairée des résultats de biosurveillance. Parmi ces approches, notons les méthodes de statistiques

multidimensionnelles, les systèmes experts (ex. le WoE – *Weight of evidence*), et les indices intégratifs (Amiard-Triquet et Berthet, 2017).

Divers indices intégratifs, tels que l'indice d'évaluation de la santé des poissons, l'indice biomarqueur et l'indice de réponse intégrée de biomarqueurs (IBR – *Integrated Biomarker Response*), sont couramment employés pour la biosurveillance utilisant les moules et les flets. (Amiard-Triquet et Berthet, 2017). L'IBR est reconnu comme l'indice intégratif le plus fréquemment employé, apprécié pour sa simplicité et son évolution continue au fil des décennies. Son utilisation s'est particulièrement intensifiée en Europe dans le cadre des initiatives visant à améliorer la qualité des masses d'eau, conformément aux exigences de la Directive-cadre sur l'eau (DCE 2000/06/CE) (Amiard-Triquet et Berthet, 2017 ; Catteau et al., 2020 ; Catteau et al., 2023 ; Milinkovitch et al., 2019 ; Sanchez et al., 2013). Une version améliorée de la méthode IBR, nommée indice de réponse intégrée de biomarqueurs – Seuil (IBR-T – *Integrated Biomarker Response – Threshold*), a récemment été développée par Catteau et al. (2023). Cette approche propose d'utiliser des valeurs seuils et des références basées sur la variation naturelle des biomarqueurs, plutôt que des valeurs de sites de référence qui ne sont pas toujours exempts de contamination (Leprêtre et al., 2022). Bien que l'IBR-T permette de mettre en évidence l'impact de la contamination d'un habitat sur les organismes qui y vivent, elle peine à intégrer les caractéristiques des contaminants présents, telles que leur biodisponibilité et leurs concentrations. Par ailleurs, le WoE, plus complexe, se veut une méthode de type triade (ou tétrade) reposant sur l'intégration de « lignes de preuve » (LDP), c'est-à-dire, l'intégration d'une grande variété de données provenant de plusieurs études. Cette dernière approche est l'une des mieux adaptées pour une évaluation environnementale intégrée de l'effet de contaminants générés par les activités anthropiques sur la santé des écosystèmes (Barjhoux et al., 2018 ; Chapman et al., 2002 ; Dagnino et al., 2008). Techniquement, l'application de cette méthode nécessite des données multidisciplinaires : sur la présence de polluants chimiques, leur biodisponibilité et l'apparition d'effets indésirables à différents niveaux d'organisation biologique. Des indices synthétiques pour chaque « ligne de preuve » sont calculés et intégrés sous forme d'indice général de risque (Barjhoux et al., 2018 ; Piva et al., 2011).

Étant donné que le WoE est une approche à plusieurs niveaux d'organisation biologique prenant en compte la bioaccumulation, et que l'IBR-T n'intègre pas les détails sur les pesticides présents dans l'environnement, ces méthodes peuvent s'avérer limitées pour évaluer l'impact des pesticides faiblement bioaccumulables et qui ne persistent pas dans les organismes, mais provoquent des effets aigus ou chroniques. À ce jour, aucune approche ne permet de considérer simultanément la contamination chimique par les pesticides et leurs effets précoces mesurés à partir de biomarqueurs sur les organismes, ce qui serait pourtant essentiel pour diagnostiquer efficacement le niveau de risque de la contamination des cours d'eau par ces substances. Pour répondre à ce besoin, nous proposons une approche novatrice appelée Indice de

risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB). Cette méthode combine le calcul des indices de déviation des biomarqueurs par rapport à leurs valeurs seuils, issues de l'IBR-T, avec le calcul des quotients de risque des pesticides et des transformations qualitatives inspirées du WoE. Spécifiquement conçue pour les environnements dominés par des contaminants ne se bioaccumulant pas nécessairement, tels que les pesticides, cette approche exclut la bioaccumulation comme facteur. Elle met plutôt l'accent sur les analyses chimiques du milieu, les réponses des biomarqueurs biochimiques, et éventuellement d'autres types d'effets écotoxicologiques.

Pour évaluer la pertinence de ce nouvel indice (IRPRB), nous l'avons appliqué à une étude de cas portant sur la moule d'eau douce *Elliptio complanata*, encagée en amont et en aval de deux rivières agricoles (Des Anglais et Châteauguay) situées en Montérégie (chapitre 4, section 4.1.2). Dans cette étude, différents biomarqueurs biochimiques et sub-individuels ont été mesurés. Les biomarqueurs biochimiques regroupaient l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans la glande digestive, qui renseigne sur la biotransformation des xénobiotiques, et celle de l'acétylcholinestérase (AChE) dans les branchies et le pied, servant d'indicateur de neurotoxicité. La peroxydation lipidique (TBARS) a également été évaluée dans les branchies et la glande digestive pour estimer le niveau de stress oxydatif, tandis que la vitellogénine circulante (VTG) a été mesurée afin de détecter d'éventuelles perturbations du système reproducteur. En parallèle, les lipides et protéines ont été analysés dans les branchies, la glande digestive, les gonades et le pied, afin d'estimer l'état des réserves énergétiques des moules. Ensuite, deux biomarqueurs sub-individuels, soit l'indice gonadosomatique (GSI) et l'indice de condition (CI), ont permis d'apprécier l'état physiologique global d'*E. complanata*. Enfin, la caractérisation des sites d'encagement a été faite pour faire un portrait de la contamination des rivières par les pesticides. L'ensemble de ces mesures a servi à alimenter le calcul de l'IRPRB et à évaluer le degré de perturbation biologique associé aux niveaux de contamination observés dans les deux rivières étudiées.

Évidemment, après l'application de cette méthode, on peut simplement prédire que le risque pour les moules sera plus faible dans les sites contenant moins de pesticides en nombre et en concentration, et où les effets sur les biomarqueurs sont relativement faibles, que dans les sites avec un plus grand nombre de pesticides à des concentrations plus élevées et où les effets sur les biomarqueurs sont relativement importants. Toutefois, il est difficile de prédire le risque lorsque les pesticides présents sur les sites sont différents, et ont des modes d'action variés (Deneer, 2000 ; Relyea, 2009) et des concentrations en dessous des critères de qualité.

5.1 Méthodologie

La méthode de l'indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB) pourra fournir une évaluation exhaustive des risques environnementaux liés à la contamination par les pesticides. Elle

combine deux approches complémentaires : l'évaluation des risques chimiques pour les pesticides à travers l'Indice de risque (IRP) et l'évaluation combinée des valeurs IBR-T de chaque biomarqueur à travers l'indice des réponses de biomarqueurs (IRB). Cette méthode vise à offrir une vue d'ensemble intégrée et précise des impacts potentiels des pesticides sur les écosystèmes aquatiques, en mettant l'accent sur les effets biologiquement significatifs.

L'encagement des moules *E. complanata* a eu lieu de la mi-juillet à la mi-août 2021, en amont (45°00'20.3"N 73°39'12.1"W) et en aval (45°00'20.3"N 73°39'12.1"W) de la rivière des Anglais, ainsi qu'en amont (45°00'05.0"N 74°09'24.6"W) et en aval (45°15'33.1"N 73°47'57.6"W) de la rivière Châteauguay. Ces rivières sont presque entièrement entourées par des champs agricoles les rendant vulnérables à la pollution diffuse par les pesticides et autres contaminants agricoles. Les contaminations d'autres sources sont largement maîtrisées par les systèmes de traitement d'eaux usées des petites municipalités de la zone d'étude (chapitre 4, section 4.2). Les données de contamination en pesticides proviennent d'échantillons d'eau collectés à chaque site d'encagement ; 48 pesticides utilisés ou potentiellement utilisés dans la région, ainsi que 8 de leurs produits de transformation ont été analysés. Les concentrations des pesticides mesurés dans les rivières et les critères de vie aquatique chronique (CVAC) déterminés par le MELCCFP ont été utilisés pour calculer les IRP de chaque pesticide. Pour les pesticides dont le CVAC n'était pas encore disponible au Québec, ce sont des équivalents provenant d'autres institutions gouvernementales et environnementales reconnues (NORMAN, 2024). Dans le cas où différentes institutions fournissent des CVAC pour un même pesticide, une moyenne géométrique de ces valeurs est alors faite pour calculer les IRP. Une base de données de biomarqueurs de 100 moules provenant de divers habitats (lac Bellevue, rivières Des Anglais et Châteauguay), mesurés à une période spécifique (après la ponte de glochidies en été), a été utilisée dans le processus de détermination des valeurs seuils et de référence (Chapitre 4, section 4.1.4). Ces valeurs ont été calculées par la méthode de Leprêtre et al. (2022), à la manière de Catteau et al. (2023) pour une meilleure représentativité de la variabilité naturelle. Elles ont ensuite servi à déterminer les valeurs d'IBR-T (Catteau et al., 2023) qui ont servi à leur tour pour les calculs de l'IRB.

5.1.1 La méthode IRPRB : intégration séquentielle

Étape 1 : Calcul de valeurs seuils et de référence tiré de Catteau et al. (2023).

Ces valeurs sont calculées en supposant que des biomarqueurs d'organismes en santé, ou non-affectés, suivront une distribution normale. Le processus nécessite un grand ensemble de données et implique de vérifier la normalité. Si des valeurs extrêmes affectent la distribution normale, elles sont supprimées de manière itérative jusqu'à ce que la normalité soit atteinte. La valeur de référence est définie comme étant le 50^{ème} percentile, et la valeur seuil comme étant le 95^{ème} percentile de la distribution normale. Pour avoir des valeurs de références et des valeurs seuils robustes, ce processus est appliqué 1 000 fois sur 30 données de

biomarqueurs pour calculer une moyenne finale (Leprêtre et al., 2022). Les 30 données de biomarqueurs sont sélectionnées aléatoirement dans la base de données pour chacun des 1000 cycles du processus. Pour avoir des valeurs de biomarqueurs plus représentatives de la variabilité naturelle, cette méthode n'est appliquée qu'à 65 % des données les plus hautes pour les biomarqueurs induits et 65 % des données les plus basses pour les biomarqueurs inhibés (Catteau et al., 2023). Les valeurs seuils et de référence sont consignées dans le tableau S1 (chapitre 4, Appendix A Supplementary data).

Étape 2 : Calcul des valeurs d'indice des réponses de biomarqueurs.

Tous les biomarqueurs ont été soumis au calcul de l'indice IBR-T avec les valeurs seuils et de référence, et utilisés pour évaluer l'état de condition physiologique générale des moules. Seuls les biomarqueurs qui sont en dessous du seuil d'inhibition, sans dépasser la valeur de référence du biomarqueur, ainsi que ceux au-dessus du seuil d'induction, sans dépasser la valeur de référence du biomarqueur, ont été utilisés pour calculer les indices. Nous déterminons un indice de déviation (A_i) pour chacun des quatre sites d'encagement (amont et aval dans chacune des deux rivières) en appliquant l'équation simplifiée suivante tirée de Catteau et al. (2023) :

$$A_{i-n} = \frac{\log(\frac{X_{i-n}}{X_0}) - \mu}{S}$$

Où X représente la valeur moyenne du biomarqueur pour chaque site de cage, X_0 est la valeur seuil, μ est la moyenne générale et S est l'écart-type général du numérateur de l'équation. Les valeurs A représentent la déviation de chaque biomarqueur par rapport à la valeur seuil.

L'indice IBRTp pour chaque biomarqueur est déterminé par l'équation suivante, en y ajoutant une pondération attribuée à chaque déviation avant de procéder au calcul du risque des biomarqueurs (Tableau S2) :

$$IBRTp(i) = \sqrt{(A_i * p)^2}$$

Où p est la pondération (de 1 à 3) attribuée à chaque biomarqueur en fonction de sa pertinence en tant que paramètre biologique et de la connaissance de son mode d'action. Considérant que la valeur A_i peut être négative, l'IBRTp intègre un processus de changement de signe dans sa formule.

L'attribution de cette pondération est également influencée par la pertinence du biomarqueur dans les différents tissus. La pondération adaptée à partir de Piva et al. (2011) est : la valeur 1 est généralement attribué aux biomarqueurs d'exposition ou d'effets qui n'impliquent pas nécessairement l'apparition d'un état de toxicité (protéines, enzymes antioxydants, etc.), 1,2 aux biomarqueurs qui préviennent les effets délétères (TBARS/MDA par exemple), 1,5 aux biomarqueurs qui sont plus prédictifs d'effets délétères à

un niveau plus élevé d'organisation (AChE par exemple). Les biomarqueurs associés à des effets de plus en plus graves reçoivent des pondérations plus élevées. Par exemple, les dérèglements hormonaux ou de la reproduction sont pondérés à 1,9 ; 2,4 pour l'histopathologie ou l'échec de la reproduction et 3 pour la mortalité (Piva et al., 2011).

L'indice des réponses de biomarqueurs (IRB) pour chaque site d'encagement est la moyenne des IBRTp et est déterminé par l'équation suivante :

$$IRB = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sqrt{(A_i * p)^2}$$

En tenant compte du fait que les déviations des biomarqueurs de leur valeur seuil peuvent être négatives, la formule de l'IBRTp a nécessité un changement de signe. L'IRB étant une moyenne des IBRTp, son équation reflète alors la moyenne quadratique des indices de déviation pondérés des biomarqueurs pour chaque site d'encagement. Pour calculer l'IRB dans les rivières, nous avons classé chaque valeur dans une catégorie de risque, identifiée par des couleurs, en nous inspirant du travail de Piva et al. (2011). Les valeurs inférieures à 0,7, égales ou supérieures à 0,7 et inférieures à 1, égales à 1 et inférieures à 2, égales à 2 et inférieures à 3, ou bien égales ou supérieures à 3 correspondent respectivement à un risque absent (vert), faible (jaune), modéré (orange), majeur (rouge) et sévère (noir).

Étape 3 : Calcul des indices de risque des pesticides IRP adaptés.

Les calculs sont basés sur les équations tirées de Barjhoux et al. (2018) en utilisant les concentrations mesurées de pesticides (chapitre 4, section 4.2) et des données liées au statut de chaque pesticide de Pêche et Océan Canada (Anderson et al., 2021).

En premier lieu, des valeurs de risque finales sont calculées pour chacun des pesticides selon la formule suivante :

$$VRF(i) = \frac{CM}{CVAC}$$

Avec : VRF représentant la valeur de risque finale ; CM, la concentration mesurée du pesticide ; CVAC, le critère de qualité pour la vie aquatique chronique du pesticide du Québec ou autres.

Ensuite, une pondération inspirée de Barjhoux et al. (2018) leur est attribuée en fonction de la liste de pesticides à statut prioritaire de pêche et Océan Canada. Le classement des pesticides prioritaires établi par Anderson et al. (2021) se fonde sur une échelle de notation allant de 0 à 33, où 0 correspond à une priorité nulle et 33 à la plus élevée. Des valeurs de 1,1 ou 1,3 sont données respectivement aux pesticides qui sont

prioritaires avec un score de 12 à 22 et à ceux qui sont en tête de la liste des pesticides prioritaire avec un score de 23 à 33. La pondération 1 est attribué aux pesticides non prioritaires, c'est-à-dire ceux absents de la liste et aux pesticides de la liste qui ont un score inférieur à 12 (Tableau S3). Les calculs ont été faits selon la formule suivantes :

$$VRFp(i) = VRF(i) * p$$

Où p représente la pondération.

Enfin, toutes les $VRFp$ sont ensuite utilisées pour calculer l'indice de risque des pesticides pour chaque site d'encagement :

$$IRP = \frac{\sum_{j=1}^N VRFp(j)_{VRF(j) \leq 1}}{N} + \sum_{k=1}^M VRFp(k)_{VRF(k) > 1}$$

Où N et M sont le nombre de pesticides avec des VRF respectivement $\leq$ et > 1 , tandis que j et k sont des indices permettant de répéter le calcul pour N ou M fois (Piva et al., 2011).

Pour représenter l'IRP dans les rivières, nous avons attribué chaque valeur à une classe de risque identifiée selon différentes couleurs tel que Piva et al. (2011) l'ont fait. Lorsque la valeur est inférieure à 0,7, égale à 0,7 et inférieure à 1,3, égale à 1,3 et inférieure à 2,6, égale à 2,6 et inférieure à 6,5, égale à 6,5 et inférieure à 13, ou égale ou supérieure à 13, le risque est respectivement absent (vert), négligeable (bleu), faible (jaune), modéré (orange), majeur (rouge) et sévère (noir).

Étape 4 : Normalisation et intégration en IRPRB

L'IRPRB de chaque site a été obtenu à partir d'une approche de normalisation inspirée de Piva et al. (2011) dans l'application du WoE. Bien que n'ayant que 2 indices, nous avons appliqué une pondération inspirée de l'approche « Triade » classique (Dagnino et al., 2008 ; Piva et al., 2011). Nous avons alors attribué aux valeurs normalisées une pondération en fonction de leur pertinence pour le contexte environnemental spécifique et les objectifs de notre évaluation. Par exemple, si les impacts biologiques sont jugés plus critiques, une pondération plus élevée peut être attribuée à la valeur normalisée de l'IRB. Piva et al. (2011) ont proposé de multiplier les indices (normalisés) de biodisponibilité par 1,2 afin de leur accorder davantage d'importance par rapport à la présence de produits chimiques dans la colonne d'eau et les sédiments, ces derniers étant pondérés par un facteur de 1. Dans notre cas, aucun indice de biodisponibilité des pesticides n'a été utilisé en raison de leur faible potentiel de bioaccumulation rapporté dans plusieurs espèces de moules à travers le monde (Álvarez-Ruiz et al., 2021 ; Bervoets et al., 2005 ; Campillo et al., 2017 ; Carvalho et al., 2008 ; Herceg-Romanić et al., 2014 ; Milun et al., 2016 ; Ulusoy et al., 2016). La présence de pesticide ayant seulement été rapporté dans la colonne d'eau, l'IRP (normalisé) a été pondéré par 1 tout

comme dans Piva et al. (2011). Les auteurs ont suggéré d'appliquer une pondération de 1,2 aux de bioessais reflétant des effets aigus au niveau de l'individu, tandis que les indices de réponses des biomarqueurs, décrivant des effets sub-létaux à l'échelle moléculaire, ont été pondérées par 1 (Piva et al., 2011). Toutefois, Barjhoux et al. (2018) ont trouvé que c'était plus pertinent d'appliquer une pondération de 1.2 aux indices de réponses des biomarqueurs vu que les organismes ont été exposés de façon chronique *in situ* plutôt que de façon aigue au laboratoire. Les expositions de la présente étude ayant été faites *in situ* et les effets mesurés étant sub-létaux, la pondération utilisée pour l'IRB (normalisé) est de 1.2. La normalisation et la pondération garantissent que les deux indices contribuent de manière équitable à l'évaluation finale. La formule de normalisation et de pondération adaptée de Barjhoux et al. (2018) se présente comme suit :

$$NormIRp(i) = \frac{IR(i) - MinIR}{MaxIR - MinIR} * p$$

Où NormIRp représente les indices de risque de biomarqueurs ou de pesticides pondérés (p) et MinIR ainsi que MaxIR sont les minimums et maximums des indices de risques calculés.

L'IRPRB est obtenu en combinant les valeurs normalisées et pondérés de l'IRB et de l'IRP :

$$IRPRB = \frac{\sum_i NormIRp(i)}{\sum MaxNormIR} * 100$$

Après une mise à l'échelle sur 100, la valeur IRPRB obtenue pour chacun des sites constitue un indice reflétant une évaluation complète du risque environnemental lié à la contamination par les pesticides. Cet indice intègre à la fois les impacts biologiques et les dangers chimiques des pesticides, basés sur un seul modèle d'organisme. L'IRPRB final est classé en différentes catégories de risques allant de 0 à 100% (absent = 0-10%, faible = 10-25%, modéré = 25-45%, élevé = 45-70% et sévère = 70-100%) selon les seuils définis des études précédents (Barjhoux et al., 2018 ; Piva et al., 2011) (**Fig. 5.3**). Cette classification sert à orienter les décisions de gestion environnementale et les interventions réglementaires nécessaires.

5.2 Résultats et discussion

5.2.1 Calcul de l'Indices de risque des pesticides (IRP)

Les données utilisées pour calculer les valeurs de risque finales (VRF) pour chaque pesticide sur chaque site, pondérées en fonction de leur statut prioritaire, sont consignées dans le Tableau S1. L'IRP pour chaque site a été calculé en intégrant les VRFp des sites d'encagement situés en amont et en aval des rivières Des Anglais et Châteauguay. Les valeurs obtenues sont respectivement de 0,004, 6,81, 0,004 et 0,024.

Ces résultats indiquent une absence de risque en amont de la rivière Des Anglais, ainsi qu'en amont et en aval de la rivière Châteauguay, tandis qu'un risque majeur est observé en aval de la rivière Des Anglais (**Tableau 5.1 et Fig. 5.1**).

Tableau 5. 1 Valeur des indices de risque des pesticides (IRP), indices de réponses des biomarqueurs (IRB) et indices de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB)

Rivières	Des Anglais		Châteauguay	
Sites	Amont	Aval	Amont	Aval
IRP	0.004	6.81	0.004	0.024
IRB	1.36	2.18	0.81	0.92
IRPRB (%)	24.8	41.5	0.000	25.7

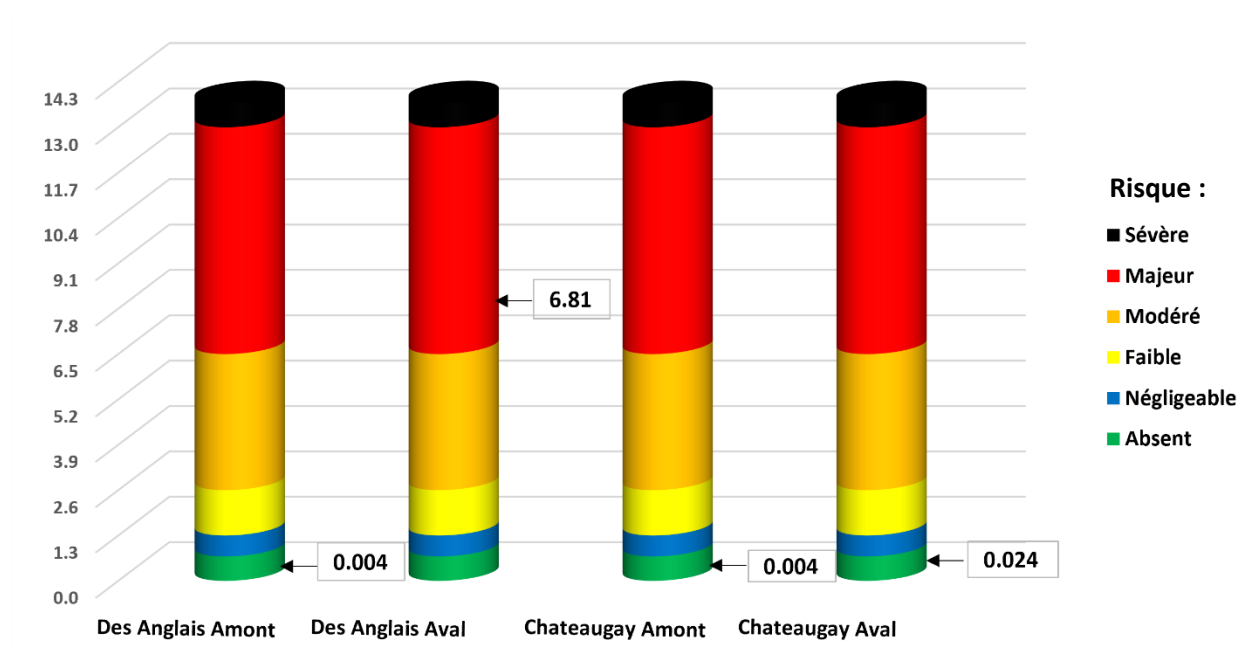


Figure 5. 1 Représentation de l'indice de risque des pesticides (IRP) dans les rivières. Risque absent (vert) et risque majeur (rouge).

Dans nos études précédentes (chapitre 4, section 4.2), il a été mentionné que 22 composés étaient détectés en amont et 40 en aval de la rivière Des Anglais, tandis que la rivière Châteauguay présentait 27 composés en amont et 32 en aval. Les concentrations en pesticides les plus élevées ont été relevées en aval de la rivière Des Anglais, avec un total de 2393 ng/L, suivies de l'aval de la rivière Châteauguay, avec 786 ng/L. En

comparaison, l'amont de la rivière Châteauguay affichait des concentrations de 286 ng/L, et l'amont de la rivière Des Anglais présentait les concentrations les plus faibles, avec un total de 165 ng/L.

Ces résultats montrent que les concentrations en pesticides augmentent généralement en aval des cours d'eau, en particulier dans la rivière Des Anglais, reflétant une accumulation des pesticides en descendant le long des rivières. L'analyse simple de ces résultats de caractérisation des sites d'encagement peut donner une idée de la différence de risque qui pourrait exister entre les sites, mais ne permet pas de déterminer ou de visualiser exactement la différence de risques entre lesdits sites au même titre que l'IRP. Feng et al. (2024) ont également montré que la rivière Des Anglais était l'une des rivières avec un risque d'effet chronique élevé pour la vie aquatique. Dans leur étude, les auteurs ont calculé le quotient de risque de chaque pesticide individuellement sauf pour les néonicotinoïdes. Contrairement à l'IRP, cette méthode ne permet pas de déterminer le niveau de risque posé par un ensemble de pesticides dans un site où il n'y a aucun dépassement de critère de qualité.

5.2.2 Calcul des indices des réponses de biomarqueurs (IRB)

Les valeurs moyennes des biomarqueurs ayant servi pour déterminer les IBR-Tp en utilisant les valeurs seuils et les pondérations appropriées pour chaque biomarqueur à chaque site sont fournies dans le Tableau S2. Les IBR-Tp ont été utilisés pour calculer l'IRB, et les valeurs obtenues sont de 1,36 pour l'amont de la rivière Des Anglais; 2,18 pour l'aval de la rivière Des Anglais; 0,81 pour l'amont de la rivière Châteauguay et 0,92 pour l'aval de la rivière Châteauguay. Selon la catégorisation de Piva et al. (2011), les IRB révèlent une réponse modérée de dégradation de la condition physiologique des moules en amont de la rivière Des Anglais, et une réponse majeure en aval, tandis que dans la rivière Châteauguay, la réponse reste faible aussi bien en amont qu'en aval (**Tableau 5.1 et Fig. 5.2**).

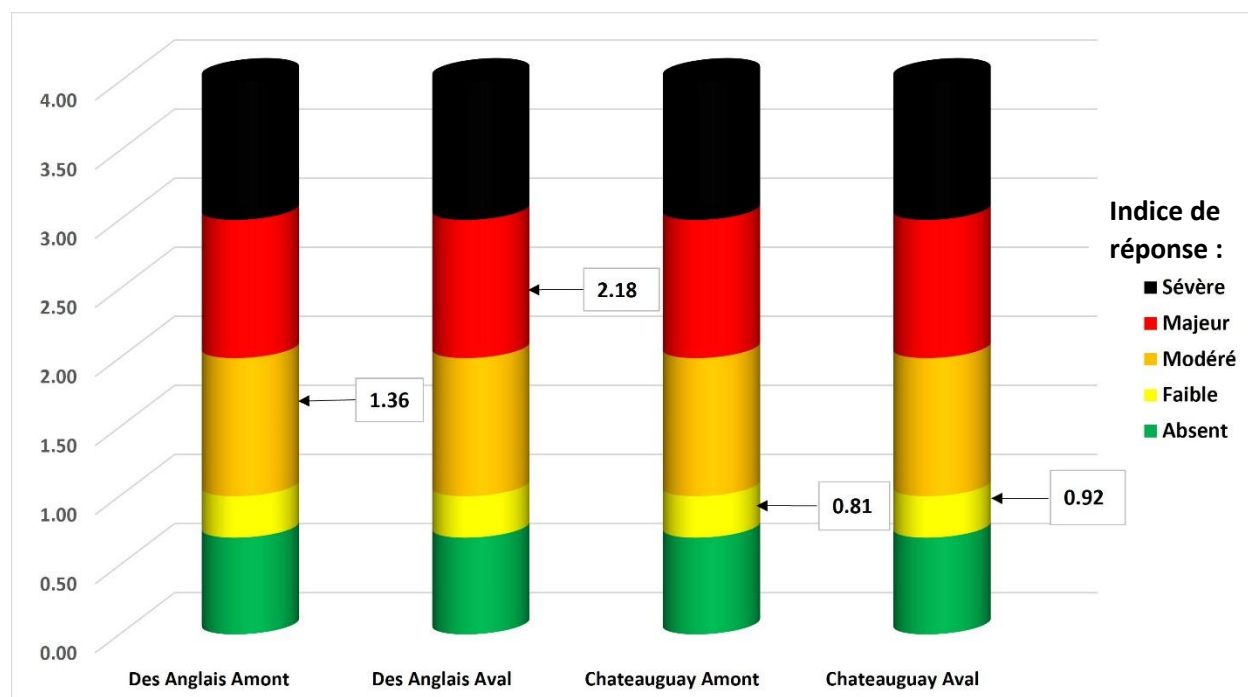


Figure 5. 2 Représentation de l'indice de réponse des biomarqueurs (IRB) dans les rivières. Indice absent (vert), indice faible (jaune) et indice modéré (orange).

Dans nos études précédentes (chapitre 4, section 4.2), les moules encagées en aval montrent des différences significatives de certains biomarqueurs par rapport aux moules en amont. En comparant tous les sites entre eux avec les valeurs d'IBR-T, on remarque une dégradation progressive de la condition physiologique d'*E. complanata*, selon l'ordre suivant : amont de la rivière Châteauguay < aval de la rivière Châteauguay < amont de la rivière Des Anglais < aval de la rivière Des Anglais (chapitre 4, section 4.2). Cet ordre concorde avec les résultats d'IRB obtenus bien que les valeurs d'IBR-T ne permettent pas de déterminer un niveau spécifique des réponses de biomarqueur à chaque site.

5.2.3 Calcul de l'indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB)

Les valeurs d'IRPRB, intégrées à partir des IRP et IRB normalisés et pondérés, ont été ramenées sur une échelle commune (0-100%) et présentées dans le **Tableau 5.1** et la **Fig. 5.3**. L'IRPRB pour le site en amont de la rivière Des Anglais indique un risque environnemental de 24,8% correspondant à un risque faible pour la moule *E. complanata*. En revanche, l'IRPRB du site en aval de la rivière Des Anglais est de 49,5%, ce qui représente un risque majeur pour *E. complanata*. Le site en amont de la rivière Châteauguay ne présente aucun risque pour la moule *E. complanata*, tandis que le site en aval de cette rivière présente un risque modéré de 25,7% (**Tableau 5.1** et **Fig. 5.3**).

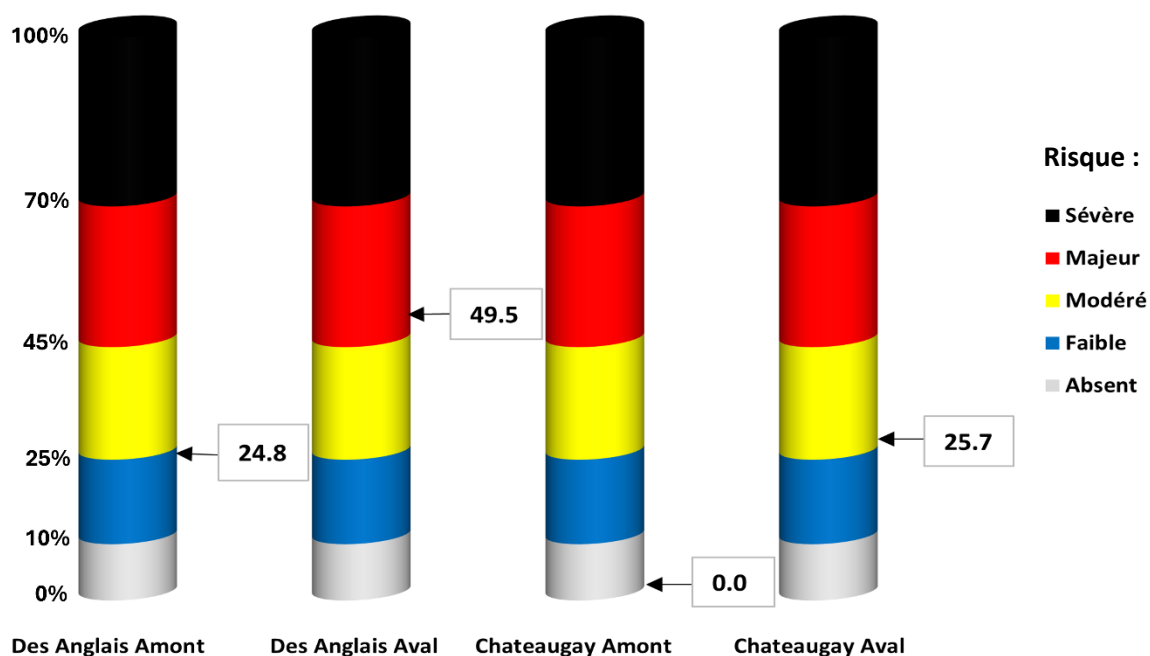


Figure 5. 3 Représentation de l'Indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB). Risque : absent de 0-10% (gris pale), faible de 10-25% (bleu), modéré de 25-45% (jaune), majeur de 45-70% (rouge) et sévère de 70-100% (noir).

En comparant simplement avec les CVAC, les études de Feng et al. (2024) et de Giroux (2022) ont montré que les concentrations de pesticides détectées dans certaines rivières de la Montérégie pouvaient poser un risque pour la vie aquatique. Ainsi, lorsqu'un grand nombre de pesticides sont présents à des concentrations relativement élevées par rapport aux CVAC, le risque pour la vie aquatique devient évident, ce qui est confirmé par nos résultats pour l'aval de la rivière Des Anglais. En effet, ces prédictions se sont avérées exactes sur ce site, comme le montre l'analyse des indices IRP, IRB et même IRPRB. Les indices IRP et IRB ont indiqué des niveaux de risque majeurs, et leur intégration dans l'IRPRB a également confirmé un niveau de risque majeur.

Cependant, nos prédictions n'ont pas été vérifiées pour les autres sites. Comme mentionné précédemment, il est difficile de prédire le risque lorsque les pesticides présents sur les sites diffèrent, avec des modes d'action variés (Deneer, 2000 ; Relyea, 2009), et des concentrations en dessous des critères de qualité. En effet, malgré l'absence de risque signalé par l'IRP pour la rivière Châteauguay et l'amont de la rivière Des Anglais, l'IRB a indiqué des niveaux de risque faible et modéré respectivement pour ces deux sites. Cette divergence peut être expliquée par l'effet cocktail de différents pesticides en mélange dans ces sites (Weisner et al., 2021). L'intégration de ces indices dans l'IRPRB a fourni un diagnostic différent : un

niveau de risque absent a été observé en amont de la rivière Châteauguay, tandis qu'en amont la rivière Des Anglais et en aval de la rivière Châteauguay, les niveaux de risque étaient respectivement faibles et modérés. Dans chaque rivière, les sites en amont, qui contenaient moins de pesticides en nombre et en concentration, ont montré des niveaux de risque inférieurs par rapport aux sites en aval, après que les rivières aient traversé des exploitations agricoles conventionnelles. En effet, bien qu'aucun dépassement des critères de qualité n'ait été observé sur trois de nos sites, différents niveaux de risque ont néanmoins été détectés sur ces derniers.

Les études sur les pesticides, qu'ils soient utilisés seuls ou en mélange, peuvent fournir des informations toxicodynamiques et toxicocinétiques essentielles à la compréhension de leurs effets sur différents organismes (Ashauer et Escher, 2010 ; Ribeiro et al., 2022). Bien que certaines d'entre elles contribuent à éclairer les processus environnementaux, leurs résultats sont difficilement extrapolables *in situ*, où la composition et les concentrations des mélanges de pesticides sont plus complexes et variables. L'IRPRB a montré que, si les critères de qualité constituent des outils utiles pour évaluer les risques que posent les pesticides aux organismes aquatiques, ils ne prennent en compte que les concentrations individuelles de chaque pesticide, ce qui peut induire un faux sentiment de sécurité. En effet, reposant principalement sur l'évaluation isolée de chaque molécule (CCME, 2007 ; MELCC, 2019), ces critères ne permettent pas une estimation complète des risques, en particulier lorsque les pesticides sont présents en mélange et que les concentrations mesurées demeurent inférieures aux valeurs de référence.

5.3 Conclusion

Dans la présente étude nous avons développé et appliqué un nouvel outil d'évaluation du risque que représente la contamination par les pesticides pour *E. complanata*, l'indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB), pour évaluer la santé des écosystèmes aquatiques exposés à la contamination par les pesticides. Cette méthodologie combine l'évaluation du risque chimique (lié aux pesticides – IRP) avec des réponses de biomarqueurs (IRB), offrant ainsi une évaluation simple mais complète des risques environnementaux posés par les pesticides dans les rivières des bassins versants agricoles. Malgré l'existence de mesures réglementaires et de politiques environnementales visant à réduire la pollution, de nombreux pesticides continuent d'être détectés à des niveaux préoccupants, dépassant souvent les critères de qualité pour la vie aquatique. L'IRPRB, intégrant à la fois les risques chimiques et biologiques, classe les sites en aval des rivières Des Anglais et Châteauguay dans les catégories de risque modéré et majeur, ce qui nécessite respectivement une attention particulière et des mesures urgentes en termes de gestion environnementale.

En conclusion, l'IRPRB fournit un cadre simple pour le suivi environnemental, aidant à identifier les zones où la pollution par les pesticides présente des risques significatifs pour les écosystèmes

aquatiques. Il s'agit d'un outil d'orientation pour la gestion environnementale et les décisions réglementaires, aiguillant des interventions plus ciblées pour protéger et préserver la biodiversité des eaux douces. L'IRPRB nécessite d'être développé d'avantage et adapté à différentes situations, tout en gardant sa simplicité pour une utilisation plus élargie. Les futures applications de cette méthode pourraient être étendues à d'autres contaminants, régions et espèces aquatiques, contribuant ainsi aux efforts plus larges de gestion durable de l'eau et de conservation des écosystèmes aquatiques.

Appendix A, Matériel supplémentaire

Tableau S5. 1 Valeur de risque finale (VRF) des pesticides détectés dans les sites d'encagement.

Pesticides	LOD (ng/L)	QC (%)	Rivière Des	Rivière Des	Rivière	Rivière	Pondération	CVAC x10 ³ ng/L	Score/33 de priorité ^c	Rivière Des	Rivière Des	Rivière	Rivière
			Anglais	Anglais	Châteauguay	Châteauguay				Anglais	Anglais	Châteauguay	Châteauguay
			Amont	Aval	Amont	Aval				Amont	Aval	Amont	Aval
			Concentrations (ng/L)						VRFp				
2,4-D	0.1	93	<LOD	172.012	79.455	86.394	1.3	220 ^a	21	-	0.00102	0.00047	0.00051
Acetamiprid	0.01	106	<LOD	0.097	<LOD	<LOD	1	0.16 ^d	-	-	0.00061	-	-
AMPA ^b	2	103	21.308	315.183	24.784	91.210	1	96 ^c	-	0.00022	0.00328	0.00026	0.00095
Atrazine	0.001	105	3.008	7.525	3.599	7.099	1.3	1.8 ^a	27	0.00217	0.00543	0.00260	0.00513
Atrazine-2-hydroxy ^b	0.02	107	5.711	11.042	0.934	5.749	1.3	1.8 ^a	27	0.00412	0.00797	0.00067	0.00415
Azoxystrobin	0.02	105	0.152	25.123	0.471	2.181	1	1.24 ^a	-	0.00012	0.02026	0.00038	0.00176
Bentazon	0.3	100	<LOD	71.251	<LOD	9.080	1.1	510 ^a	15	-	0.00015	-	0.00002
Bromoxynil	0.026	94	<LOD	0.377	<LOD	<LOD	1	5 ^a	-	-	0.00008	-	-
Chlorantraniliprole	0.1	102	0.639	15.385	0.266	3.040	1	0.1 ^a	-	0.00639	0.15385	0.00266	0.03040
Carbaryl	0.025	102	<LOD	1.560	<LOD	<LOD	1.1	0.2 ^a	22	-	0.00858	-	-
Carbendazim	0.015	110	0.017	1.478	0.129	0.256	1	0.29 ^a	-	0.00006	0.00510	0.00045	0.00088
Clothianidin	0.1	100	0.111	7.361	<LOD	1.467	1.3	0.0083 ^a	25	0.01741	1.15294	-	0.22976
Cyanazine	4.5	107	9.767	9.828	3.986	10.533	1	2 ^a	-	0.00488	0.00491	0.00199	0.00527
Deethylatrazine ^b	0.13	98	6.031	11.598	5.556	11.552	1.3	1.8 ^a	27	0.00436	0.00838	0.00401	0.00834
Deisopropylatrazine ^b	0.058	96	1.895	5.004	2.400	4.003	1.3	1.8 ^a	27	0.00137	0.00361	0.00173	0.00289
Dicamba	5	94	7.255	<LOD	<LOD	<LOD	1.1	10 ^a	14	0.00080	-	-	-
Dimethenamid	0.034	104	<LOD	65.543	0.068	4.139	1.1	5.6 ^a	16	-	0.01287	0.00001	0.00081
Desnitro-imidacloprid ^b	0.024	97	<LOD	<LOD	0.097	<LOD	1.1	0.0083 ^a	22	-	-	0.01287	-
Flonicamid	0.31	90	<LOD	1.528	<LOD	<LOD	1	3000 ^e	6	-	0.00000	-	-
Flumetsulam	0.032	111	<LOD	1.304	<LOD	1.399	1	3.1 ^a	11	-	0.00042	-	0.00045
Fluxapyroxad	0.01	120	0.553	1.994	0.538	0.696	1	1.52 ^f	-	0.00036	0.00131	0.00035	0.00046
Fomesafen	0.05	100	<LOD	0.392	<LOD	0.379	1	1.57 ^f	-	-	0.00025	-	0.00024
Glyphosate	2	103	42.728	142.433	39.235	63.916	1.1	800 ^a	14	0.00006	0.00020	0.00005	0.00009

Imazethapyr	0.01	116	<LOD	45.254	<LOD	44.677	1.1	8.1 ^a	14	-	0.00615	-	0.00607
Imidacloprid	0.015	110	0.098	37.136	0.244	2.399	1.1	0.0083 ^a	22	0.01293	4.92162	0.03228	0.31792
Linuron	0.01	105	<LOD	385.596	0.803	14.239	1.1	7 ^a	13	-	0.06059	0.00013	0.00224
MCPA	0.05	94	<LOD	413.576	2.312	43.439	1.1	2.6 ^a	13	-	0.17497	0.00098	0.01838
Mecoprop	0.05	97	<LOD	0.425	<LOD	<LOD	1.1	13 ^a	13	-	0.00004	-	-
Mesotrione	0.328	109	<LOD	2.861	<LOD	1.196	1	22.91 ^f	-	-	0.00012	-	0.00005
Metconazole	0.05	101	0.049	<LOD	<LOD	<LOD	1	2.75 ^f	-	0.00002	-	-	-
(S)-Metolachlor	0.08	104	0.295	31.248	2.004	17.680	1.3	7.8 ^a	24	0.00005	0.00521	0.00033	0.00295
Metolachlor ethanesulfonic acid ^b	0.007	99	42.124	233.415	90.026	232.934	1.3	7.8 ^a	24	0.00702	0.03890	0.01500	0.03882
Metolachlor oxanilic acid ^b	0.008	99	10.425	114.800	17.424	84.915	1.3	7.8 ^a	24	0.00174	0.01913	0.00290	0.01415
Metribuzin	0.37	105	5.874	10.155	3.756	22.288	1.1	1 ^a	19	0.00646	0.01117	0.00413	0.02452
Pendimethalin	0.5	113	5.559	15.532	4.960	<LOD	1	0.35 ^f	-	0.01588	0.04438	0.01417	-
Prometryn	0.05	107	<LOD	215.066	0.479	16.308	1	1.97 ^f	-	-	0.10917	0.00024	0.00828
Propiconazole	0.19	103	0.608	1.180	1.487	1.001	1	3.7 ^g	-	0.00016	0.00032	0.00040	0.00027
Pyrimethanil	0.01	108	<LOD	1.104	0.010	0.077	1	3.51 ^f	-	-	0.00031	0.00000	0.00002
Simazine	0.02	107	0.460	1.306	0.329	0.861	1	10 ^a	10	0.00005	0.00013	0.00003	0.00009
Tebuconazole	0.018	115	<LOD	0.536	0.616	0.461	1	11 ^c	7	-	0.00005	0.00006	0.00004
Thiacloprid	0.05	106	<LOD	0.246	<LOD	<LOD	1	0.064 ^c	-	-	0.00384	-	-
Thiamethoxam	0.01	108	<LOD	13.912	<LOD	0.412	1.1	0.0083 ^a	22	-	1.84377	-	0.05462
Topramezone	0.5	108	<LOD	1.783	<LOD	<LOD	1	15.17 ^f	-	-	0.00012	-	-

^a Critère de qualité pour la vie aquatique chronique du MELCC

^b produit de transformation (avec les critères de qualité de la molécule mère)

^c Kontiokari et Mattsoff (2011)

^d Scheer, (2022)

^e Anderson et al., (2021)

^f Calculer à partir de Norman (2024)

^g Giroux (2022)

LOD = limite de détection

QC = contrôle de qualité

CVAC = Critère de qualité pour la vie aquatique chronique

- Non déterminé parce que c'est < LOD

VRFP = Valeur de risque finale, pondérée

Tableau S5. 2 Valeurs seuil et de référence des biomarqueurs d'*E. complanata*.

Biomarqueurs	TBARS (B)	TBARS (GD)	ACh E (B)	AChE (P)	GST (GD)	VTG (G)	Lipide (GD)	Lipide (B)	Protéine (B)	Protéine (P)	Protéine (G)	Protéine (GD)	CI	GSI
Unité	nmol/mg de lipide		nmol/min/mg de protéine		μmol/min/mg de protéine	μg/mg protéine	mg/g de tissu		mg/g de tissu					
Seuil														
d'inhibition	-	-	1.21	1.08	17.71	-	2.58	1.71	12.88	29.44	28.82	28.21	10.08	0.18
Seuil														
d'induction	26.78	38.91	-	-	27.99	665	2.58	1.71	-	-	-	-	-	-
Références	18.66	27.89	1.16	1.12	18.36	492	2.65	1.73	12.07	30.65	26.62	29.81	8.97	0.16

B = branchie, GD = glande digestive, P = pied, G = gonades.

Tableau S5. 3 Valeurs moyennes des biomarqueurs et des IBR-T pondérés.

Biomarqueurs	Sites				IBR-Tp			
	Des	Des	Châteauguay	Châteauguay	Des	Des	Châteauguay	Châteauguay
	Anglais	Anglais			Anglais	Anglais		
	Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval
TBARS des branchies (nmol/mg de lipide)	48.3	32.1	14.3	17.9	2.77	0.852	-	-
TBARS glande digestive (nmol/mg de lipide)	48.0	59.9	37.2	38.5	1.31	2.69	-	-
AChE des branchies (nmol/min/mg de protéine)	0.494	1.75	0.478	0.372	2.01	0.815	2.08	2.64
AChE du pied (nmol/min/mg de protéine)	0.410	0.326	0.707	0.517	3.10	3.83	1.36	2.36
GST de la glande digestive (µmol/min/mg de protéine)	17.2	11.3	9.42	10.5	-	1.50	2.10	1.74
VTG des gonades (µg/mg de protéine)	392	1004	379	495	2.45	1.91	2.60	-
Lipide de la glande digestive (mg/g de tissu)	2.96	1.96	2.16	1.64	-	1.57	-	2.60
Lipide des branchies (mg/g de tissu)	1.18	1.27	2.29	1.79	2.41	1.93	-	-
Protéine des branchies (mg/mg de tissu)	38.5	16.3	21.7	22.9	-	-	-	-
Protéine du pied (mg/g de tissu)	34.0	19.3	21.2	20.9	-	2.09	1.61	1.69

Protéine des gonades (mg/g tissu)	72.3	17.9	27.3	27.0	-	2.24	-	-
Protéine de la glande digestive (mg/g tissu)	36.1	36.6	35.3	31.7	-	-	-	-
Indice de condition	8.42	8.78	9.9	10.2	-	-	-	-
Indice gonadosomatique	0.129	0.160	0.178	0.174	2.24	-	-	-
Survie (%)	100	95	100	100	-	6.71	-	-

CONCLUSION

6.1 Retour sur les hypothèses et les objectifs de recherche

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié l'effet des pesticides sur la santé de la moule d'eau douce *E. complanata*, espèce indigène du Québec, à la fois en laboratoire et dans son habitat naturel. L'objectif principal consistait à mettre en évidence des indicateurs précoces (biomarqueurs) de l'impact des pesticides sur la condition physiologique d'*E. complanata* et à proposer des indices intégrés pour évaluer les risques environnementaux dans des agroécosystèmes fortement exposés à la pollution diffuse. Les hypothèses formulées initialement ont été pour la plupart validées par les résultats obtenus dans les quatre chapitres de cette thèse.

En laboratoire, nous avons démontré que des concentrations (proches de celles mesurées près des champs agricoles) de glyphosate, de thiaméthoxame et de chlorantraniliprole – et plus particulièrement leurs mélanges – provoquent des perturbations notables; stress oxydatif accru, dysfonctionnements neurologiques (diminution de l'activité AChE), altérations du métabolisme énergétique (diminution des réserves de lipides), stimulation du système de détoxification (augmentation de la GST) et effets négatifs sur le système reproducteur (diminution de la VTG). Afin d'approfondir l'interprétation de ces résultats, nous avons appliqué deux approches d'intégration des biomarqueurs : l'IBRv2 proposé par Sanchez et al. (2013) (chapitre 2) et une comparaison des valeurs mesurées aux valeurs seuils de variation des biomarqueurs (par la méthode de Leprêtre et al., 2022) en conditions contrôlées (chapitre 3). De manière générale, ces travaux confirment que même des expositions à faibles concentrations – souvent inférieures aux critères de qualité pour la vie aquatique – peuvent affecter de manière insidieuse la condition physiologique globale de *E. complanata*, un constat d'autant plus marqué pour les mélanges de pesticides à des concentrations mesurées dans les agroécosystèmes de la Montérégie.

La deuxième phase du projet (chapitre 4) visait l'évaluation de l'exposition à un cocktail de pesticides en faisant l'encagement de moules en amont et en aval de deux rivières agricoles de la Montérégie. L'analyse des concentrations en pesticides a révélé une progression de la pollution de l'amont à l'aval suivant, dans cet ordre : amont Des Anglais < amont Châteauguay < aval Châteauguay < aval Des Anglais. Aucun des sites ne pouvait être considéré comme un site de référence dépourvu de contamination en pesticides. Les expositions *in situ* ont, quant à elles, montré des perturbations des biomarqueurs d'*E. complanata*, parfois similaires à celles observées en

laboratoire (exposition au mélange des 3 pesticides), telles qu'un stress oxydatif accru et des altérations du métabolisme énergétique (baisse des réserves de protéines et de lipides). Cependant, les effets sur les systèmes de détoxification, neurologique et reproducteur se sont révélés opposés à ceux relevés en laboratoire, avec une baisse de l'activité de la GST, une augmentation de l'activité de l'AChE et une hausse de la concentration de VTG. Toutefois, il est important de souligner que les moules exposées *in situ* ont été comparées entre l'amont et l'aval des rivières et non pas avec un contrôle. Une comparaison *stricto sensu* n'a pas été possible entre les moules de laboratoire et les moules encagées. De plus, les réponses des biomarqueurs mesurées en laboratoire diffèreraient de celles observées en milieu naturel en raison de la complexité et de la variabilité des conditions environnementales. En laboratoire, les moules ont été soumises à des paramètres physico-chimiques constants (luminosité, température, oxygène, pH, conductivité, etc.) et à l'action ciblée des pesticides et de leurs mélanges à des concentrations fixes. Dans les rivières, elles faisaient face à des fluctuations des propriétés physico-chimiques de l'eau, liées aux changements météorologiques, aux gradients de concentration des pesticides et autres contaminants agricoles potentiels (ammoniac, nitrates, phosphore)⁶. De plus, les concentrations en pesticides peuvent varier dû à l'apport intermittent via le ruissellement provenant des champs agricoles. Pour comparer d'une façon plus éclairée les résultats d'encagement *in situ*, une nouvelle approche d'intégration des données de biomarqueurs a été appliquée. La réponse intégrée des biomarqueurs-seuil (Integrated Biomarker Response – Threshold, IBR-T), une version implémentée de la réponse intégrée des biomarqueurs version 2 (IBRv2) par Catteau et al. (2023), tenant compte des valeurs seuils de variations naturelles des biomarqueurs (Leprêtre et al., 2022), a permis de comparer les sites d'encagement, malgré l'absence de sites de référence exempts de contamination et soumis à des conditions environnementales comparables. Cette approche a montré des niveaux d'effets allant de pair avec le gradient de contamination relevé dans les sites d'encagement : la valeur IBR-T la plus élevée se trouvait à l'aval de la rivière des Anglais, où la contamination en pesticides était la plus forte. Toutefois, l'amont de cette même rivière, qui affichait la plus faible contamination, présentait une valeur IBR-T supérieure à celles relevées dans la rivière Châteauguay, montrant l'importance d'étudier plus en profondeur les interactions complexes des mélanges de pesticides à faibles concentrations.

⁶ Les données historiques (2003-2016 ; Données Québec. s.d.) montrent que les concentrations d'ammoniac et de nitrates se situent généralement sous les critères de qualité établis pour la protection d'organismes aquatiques (ammoniac = 0,02-1,9 mg/L, nitrates = 3-13 mg/L à pH 7 et 20 °C) (CCME, 2010, 2012 ; EPA, 2013). En revanche, le phosphore dépasse parfois les seuils fixés pour limiter l'eutrophisation (MELCC, 2019). Les rivières étudiées comportent aussi des secteurs à faible courant où l'eau stagne, favorisant ainsi des phénomènes d'eutrophisation localisés. Toutefois, ce phénomène n'est pas observable là où un courant suffisant empêche l'accumulation de nutriment et la prolifération d'algues.

Pour évaluer les risques posés par les pesticides sur les organismes aquatiques, les gestionnaires environnementaux s'appuient encore largement sur la méthode traditionnelle, qui consiste à comparer la concentration mesurée d'un pesticide donné à son critère fixé pour la protection de la vie aquatique. Cependant, cette approche ne permet pas d'estimer précisément le risque global lorsque plusieurs pesticides se trouvent simultanément dans le milieu et restent sous les critères reconnus pour préserver la vie aquatique. Or, on sait que des mélanges, même à faibles concentrations, peuvent avoir des effets sur les organismes aquatiques. Pour remédier à cette lacune, nous avons développé une approche de diagnostic intégrant les données de contamination en pesticides et les données de biomarqueurs, notamment via l'indice de risque des pesticides et des réponses de biomarqueurs (IRPRB), afin d'évaluer le risque global pour la santé d'*E. complanata* (chapitre 5). Les indices de risque des pesticides (IRP) et de réponses des biomarqueurs (IRB), calculés au préalable, ont confirmé que l'IRP a suivi le gradient de contamination en révélant un risque « absent » dans la rivière Châteauguay et en amont de la rivière Des Anglais, puis un risque « majeur » en aval de la rivière Des Anglais. À ce dernier site, l'IRB indiquait aussi des effets « majeurs » sur les moules. Toutefois, dans les autres sites, l'IRB différait de l'IRP, montrant des effets « modérés » en amont de la rivière Des Anglais et des effets « faibles » en amont et en aval de la rivière Châteauguay. Lorsque ces deux indices ont été intégrés en un seul (IRPRB), le portrait global est apparu encore plus clair : le risque global pour la santé des moules était logiquement le plus élevé (risque « majeur ») en aval de la rivière Des Anglais, en cohérence avec le classement « majeur » de l'IRP et l'IRB. Dans les autres sites, le risque global était plus nuancé : « faible » en amont de la rivière Des Anglais, « absent » en amont de la rivière Châteauguay et « modéré » en aval de cette même rivière. Cette approche s'est donc révélée utile pour intégrer des données complexes (pesticides et biomarqueurs) et donner une vision d'ensemble des risques auxquels les moules sont exposées dans les agroécosystèmes.

Enfin, les objectifs de recherche – évaluer les effets de pesticides problématiques (glyphosate, thiaméthoxame, chlorantraniliprole et leurs mélanges) sur plusieurs fonctions biologiques essentielles d'*E. complanata*, établir des valeurs seuils de variation naturelle des biomarqueurs et proposer un outil simple et opérationnel de diagnostic du risque sur l'état de santé des moules dans les agroécosystèmes – ont tous été atteints. Ces travaux soulignent néanmoins la nécessité de considérer les effets combinés des pesticides dans les réglementations à venir.

6.2 Perspectives, limites et contributions scientifiques de cette étude

Ayant observé des effets sur les biomarqueurs en exposant les moules à des pesticides utilisés individuellement et en mélanges, cette étude ouvre de nombreuses perspectives pour des recherches

futures. Il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur la toxicocinétique et la toxicodynamique des pesticides, ainsi que sur leurs mécanismes d'interaction, notamment pour mieux comprendre comment les mélanges de ces substances interagissent au niveau moléculaire et amplifient les effets toxiques. L'élargissement des biomarqueurs utilisés, en intégrant par exemple des marqueurs liés à la génotoxicité tels que les dommages à l'ADN, et au métabolisme énergétique, comme l'allocation énergétique cellulaire (De Coen et Janssen, 2003 ; Gendron et al., 2023), pourrait considérablement enrichir les diagnostics environnementaux.

Dans notre étude, nous avons tenu compte du sexe des individus dans l'évaluation des effets des pesticides sur les biomarqueurs utilisés. Les résultats étaient très souvent similaires d'un sexe à l'autre surtout en milieu naturel. Toutefois, il convient aussi de garder à l'esprit que l'absence de différences notables dans nos résultats actuels n'exclut pas la possibilité de variations sex-spécifiques qui pourraient émerger avec d'autres biomarqueurs, d'autres pesticides, des conditions expérimentales différentes ou des expositions plus longues.

En outre, l'étude des valeurs seuils de biomarqueurs, qui consiste à examiner les réponses des biomarqueurs en tenant compte des variations écophysiologiques, représente une voie prometteuse en biosurveillance active. La production de données issues de divers biomarqueurs, obtenus pour d'autres espèces sentinelles provenant de divers habitats, est nécessaire pour déterminer ces valeurs seuils. Cela permettrait non seulement d'approfondir les connaissances en écophysiologie de ces espèces, mais aussi de favoriser une adaptation de l'IRPRB à ces espèces dans leurs habitats, offrant ainsi une biosurveillance plus éclairée.

Malgré les avancées de cette étude, certaines limites doivent être soulignées. Bien que nous ayons observé des « effets cocktails » avec les mélanges de faibles concentrations de pesticides au laboratoire, il est impossible de démontrer la nature réelle des interactions entre les pesticides. Il aurait fallu faire des expositions selon des modèles de prédiction d'effets pour des mélanges binaires et ternaire (Cedergreen, 2014). Techniquement, il aurait fallu déterminer des concentrations d'effet de chaque pesticides sur chaque biomarqueur, en premier. Ensuite, utiliser ces concentrations pour des expositions subséquentes par groupe de mélanges binaires de pesticides. Enfin, faire une dernière exposition au mélange des trois. Nous aurions ainsi pu déterminer à travers l'application de modèles statistiques appropriés, le synergisme, l'additivité, la potentialisation, l'antagonisme, ou l'interaction séquentielle, etc., de chaque mélange sur les variations des biomarqueurs dans leurs organes respectifs.

De plus, nos choix de pesticides et de biomarqueurs se sont concentrés sur un nombre limité de substances et de paramètres, ce qui restreint l'exploration de l'influence potentielle d'un éventail

plus large de pesticides sur les systèmes et fonctions biologiques de la moule *E. complanata*. Étendre ces recherches à davantage de pesticides et de biomarqueurs permettrait d'obtenir une vision plus complète des impacts toxicologiques, en particulier sur des processus biologiques encore sous-étudiés. Sur le plan écophysiologique, il convient de noter que différentes populations d'*E. complanata* pourraient réagir différemment lors d'une exposition *in situ*, possiblement en raison de la plasticité épigénétique héritée, comme observé par Lalouette (2023) chez *Gammarus fossarum*. En effet, ces auteurs ont documenté que les gammarus peuvent développer une tolérance accrue au cadmium lorsqu'ils sont exposés de façon chronique. Ils ont également remarqué que cette tolérance disparaissait une fois que les organismes n'étaient plus exposés pendant un certain temps, mais que ces derniers pouvaient la transmettre à leur descendance via des mécanismes non génétiques. Dans notre étude, les populations d'*E. complanata* des deux rivières étudiées étaient distinctes rendant plus complexe la comparaison des résultats entre les moules des deux rivières en appliquant des méthodes statistiques traditionnelles en écotoxicologie. Toutefois, pour pallier cette limite nous avons déterminé des valeurs seuils de variation des biomarqueurs à partir des données de trois populations distinctes de l'espèce. Bien que fondées sur un large ensemble de données, ces valeurs représentent une première tentative et mériteraient d'être affinées à l'aide d'un ensemble de données encore plus vaste provenant d'encore plus de populations distinctes d'*E. complanata*. Ce raffinement permettrait d'étendre l'application géographique de ces valeurs seuils, et de faciliter la comparaison de populations distinctes soumises aux expositions *in situ*, tout en minimisant les biais liés aux différences épigénétiques entre populations.

Les résultats de cette étude mettent en évidence la nécessité de revoir les critères reconnus pour préserver la vie aquatique afin de mieux prendre en compte les effets des mélanges de pesticides, souvent sous-estimés, et d'inclure les effets sur des biomarqueurs biochimiques pertinents dans les calculs de critères de qualité pour la vie aquatique. Cette étude contribue de manière significative à l'écotoxicologie et à la gestion des écosystèmes en apportant une meilleure connaissance sur l'écophysiologie d'*E. complanata* (notamment ses réponses physiologiques induites, par exemple, par un changement chimique de son environnement) et en réaffirmant son statut d'espèce bioindicatrice. L'établissement de valeurs seuils pour les biomarqueurs de cette moule représente une avancée notable dans la compréhension de sa physiologie en milieu naturel.

L'une des principales innovations de ce travail réside dans l'intégration des données de biomarqueurs et de contamination chimique afin de concevoir deux indices complémentaires : celui des réponses des biomarqueurs (IRB) et celui du risque des pesticides (IRP), encouru par l'espèce sentinelle en agroécosystème. Bien qu'inspirée de Piva et al. (2011), la méthode de calcul du risque

chimique – associée ici à l'IRP – s'avère particulièrement pertinente pour les gestionnaires de l'environnement, car elle inclut une pondération tenant compte à la fois du statut juridique et de la toxicité des pesticides. Elle permet de visualiser et de comparer les niveaux de risque liés aux pesticides dans des sites différents (par exemple, l'amont et l'aval d'un cours d'eau soumis à pression de contamination anthropique). Le nouvel indice IRB, axé sur les réponses des biomarqueurs, facilite la visualisation et la comparaison du niveau d'altération d'un ensemble de biomarqueurs au sein de différentes conditions d'exposition. En intégrant les données de ces deux indices, on obtient l'IRPRB, un outil pratique et innovant permettant d'évaluer et de représenter clairement les risques que subissent les espèces sentinelles dans leurs habitats respectifs. Appliqué aux écosystèmes aquatiques québécois, cet indice ouvre de nouvelles perspectives pour la biosurveillance active et la prise de décisions éclairée en matière de gestion des pesticides. De plus, en étant fondé sur des données d'effets précoces, l'IRPRB offre aux gestionnaires la possibilité d'intervenir rapidement pour protéger les écosystèmes avant que n'apparaissent des effets irréversibles à l'échelle des populations.

L'ensemble de nos résultats encourage à repenser la régulation des pesticides les plus toxiques et préconise une approche intégrée afin d'appréhender de manière globale l'impact des activités humaines sur la biodiversité aquatique. Les connaissances acquises pourront être étendues à d'autres espèces et écosystèmes, renforçant ainsi la portée des approches proposées pour la préservation de la fonctionnalité des milieux aquatiques. D'un point de vue opérationnel, l'IRPRB constitue un outil simple et efficace pour accompagner les décideurs et gestionnaires environnementaux dans l'identification des zones à prioriser pour préserver la biodiversité aquatique. Enfin, en enrichissant les connaissances sur l'écophysiologie d'*E. complanata*, cette étude souligne l'importance des espèces sentinelles dans la biosurveillance active de l'environnement. En conclusion, l'approche novatrice et pragmatique présentée ici contribue à la fois à l'avancement des connaissances scientifiques, à sensibiliser sur la prise en compte des mélanges de pesticides dans l'élaboration des critères de qualité pour la vie aquatique, et à intégrer des techniques pratiques d'évaluation des risques des pesticides pour les gestionnaires de l'environnement.

RÉFÉRENCES

- Abendroth, J. A., Blankenship, E. E., Martin, A. R., & Roeth, F. W. (2011). Joint Action Analysis Utilizing Concentration Addition and Independent Action Models. *Weed Technol.*, 25(3), 436-446. <https://doi.org/10.1614/WT-D-10-00102.1>
- Abidli, S., Pinheiro, M., Lahbib, Y., Neuparth, T., Santos, M. M., & Trigui El Menif, N. (2021). Effects of environmentally relevant levels of polyethylene microplastic on *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia): filtration rate and oxidative stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28(21), 26643-26652. doi:10.1007/s11356-021-12506-8
- Aebi H. (1984). Catalase In vitro. *Methods. Enzymol.* 105, 121-6.
- AFAC. (2024). L'eau est une source de vie. Association des femmes autochtones du Canada. Unité de l'Environnement. Retrieved from <https://nwac.ca/policy/water-is-a-source-of-life>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicol.*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alak, G., Ucar, A., Yeltekin, A. C., Ozgeris, F. B., Turkez, H., Günay, A., . . . Atamanalp, M. (2024). Physiological response of thiamethoxam and ulexite in rainbow trout: A neural network-mediated approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicol. Pharmacol.*, 275. doi:10.1016/j.cbpc.2023.109760
- Almeida, E. A., Bainy, A. C. D., Dafre, A. L., Gomes, O. F., Medeiros, M. H. G., & Di Mascio, P. (2005). Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 318(1), 21-30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.007>
- AlMisherfi, M. M., Moneer, A. A., Morshedy, M., El-Shahawi, F. I., & Khalifa, M. H. (2023). Exposure of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* to Chlorantraniliprole Inducing Biochemical Alterations and Histopathological Perturbations Aggravated in The Presence of Nano Zinc Oxide. *Egyptian J. Chem.*, 66(8), 227-237. <https://dx.doi.org/10.21608/ejchem.2022.155609.6870>
- Álvarez-Ruiz, R., Picó, Y., & Campo, J. (2021). Bioaccumulation of emerging contaminants in mussel (*Mytilus galloprovincialis*): Influence of microplastics. *Sci. Total Environ.*, 796, 149006. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149006>

- Aly, M. F. K., & Ali, A. (2024). Toxicity and biochemical effects of some insecticides on the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.)(Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory. *Egyptian Journal of Crop Protection*, 19(1), 27-46.
<https://doi.org/10.21608/ejcp.2024.264221.1026>
- Amanullah, B., Stalin, A., Prabu, P., & Dhanapal, S. (2010). Analysis of AchE and LDH in mollusc, *Lamellidens marginalis* after exposure to chlorpyrifos. *J. Environ. Biol.*, 31(4), 417-419. PMID: 21186713.
- Amiard, J.-C. & Amiard-Triquet, C. (2017). Les biomarqueurs : trois décennies de recherche et développement. In J.-C. Amiard & C. Amiard-Triquet (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie aquatique*. Lavoisier Tec & Doc. Vol. 2, pp. 323-349.
- Amiard-Triquet, C. & Amiard, J.-C. (2012). Behavioral ecotoxicology. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*, 253.
- Amiard-Triquet, C. & Berthet, B. (2017). Opérationnalité des biomarqueurs. In J.-C. Amiard & C. Amiard-Triquet (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie aquatique*. Lavoisier Tec & Doc. Vol. 2, pp. 323-349.
- Anderson, J. C., Martenson, S. C. & Prosser, R. S. (2021). Prioritization of Pesticides for Assessment of Risk to Aquatic Ecosystems in Canada and Identification of Knowledge Gaps. In P. de Voogt (Ed.), *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 259 (pp. 171-231). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/398_2021_81
- Ashauer, R., & Escher, B. I. (2010). Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment [10.1039/C0EM00234H]. *J. Environ. Monitoring*, 12(11), 2056-2061. <https://doi.org/10.1039/C0EM00234H>
- Babin, P. J. (2008). Conservation of a vitellogenin gene cluster in oviparous vertebrates and identification of its traces in the platypus genome. *Gene*, 413(1), 76-82.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.02.001>
- Babin, P. J., Carnevali, O., Lubzens, E., & Schneider, W.J. (2007). Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. In: Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. (Eds.) *The Fish Oocyte*. Springer, Dordrecht. 39-76. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3_2
- Barjhoux, I., Fechner, L. C., Lebrun, J. D., Anzil, A., Ayrault, S., Budzinski, H., Cachot, J., Charron, L., Chaumot, A., Clérandeau, C., Dedourge-Geffard, O., Faburé, J., François, A., Geffard, O., George, I., Labadie, P., Lévi, Y., Munoz, G., Noury, P., Oziol, L., Quéau, H., Servais, P., Uher, E., Urien, N., & Geffard, A. (2018). Application of a multidisciplinary and integrative weight-of-evidence approach to a 1-year monitoring survey of the Seine River. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(24), 23404-23429. doi:10.1007/s11356-016-6993-6

- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Benke, G. M., Cheever, K. L., Mirer, F. E., & Murphy, S. D. (1974). Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice. *Toxicol. applied pharmacol.*, 28(1), 97-109. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(74\)90135-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(74)90135-5)
- Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Pereira, L. C., & Dorta, D. J. (2015). Impact of pesticides on environmental and human health. In Andreazza and Scola (Eds.), *Toxicology studies-cells, drugs and environment*, 195-233. InTech. DOI: 10.5772/58714
- Bervoets, L., Voets, J., Smolders, R., & Blust, R. (2005). Metal accumulation and condition of transplanted zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in metal polluted rivers. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 8(4), 451-460. <https://doi.org/10.1080/14634980500360100>
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., & Geffard, O. (2013). Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Res.*, 47(2), 650-660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>
- Beutler, E. (1982). Catalase, in: E. Beutler (Ed.), *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, Grune and Stratton, Inc 1982, pp. 105–106.
- Beutler, E. (1975). *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods* Grune and Stratton, Inc 1982, New York. p. 188
- Bhalchandra, W., & Lomte, V. (2004). Impact of pesticides on lipid content from soft tissues of fresh water bivalve, *parreysia cylindrica*. EPS-Hero ID 8600291. *Asian. J. Microbiol. Biotech. Environ. Sci.*, 6(3), 497-501.
- Bitschinski, D., Warsneski, A., Rutkoski, C. F., Gonçalves, G. H. P., Giasson, L. O. M., Hasckel, R. P., Israel, N. G., da Silva, E. B., de Albuquerque, C. A. C., Lã, L., Alves, T. C., de Campos Guerreiro, F., & de Almeida, E. A. (2024). Exposure to pesticides used in rice farming (bentazone, chlorantraniliprole and tebuconazole) affects biochemical biomarkers and hepatic histopathological parameters of hammertoad tadpoles (*Boana faber*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 283, 109960. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2024.109960>

- Blaise C, Trottier S, Gagné F, Lallement C, Hansen PD. (2002). Evaluation of immunocompetence in hemocytes of bivalves with a miniaturized phagocytosis assay. *Environ. Toxicol.* In press.
- 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. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20(8), 5603-5614. doi:10.1007/s11356-013-1568-2
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251-272.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Bonacci, S., Brown, M.A., Dissanayake, A., Hagger, J.A., Corsi, I., Focardi, S., & Galloway, T.S. (2004). Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 445–455.
- Boryslawskyj, M., Garrood, A. C., Pearson, J. T., & Woodhead, D. (1988). Elevation of glutathione-S-transferase activity as a stress response to organochlorine compounds, in the freshwater mussel, *Sphaerium corneum*. *Mar. Environ. Res.*, 24(1), 101-104.
- Bose, S., Nath, S., & Sahana, S. (2011). Toxic impact of thiamethoxam on the growth performance and liver protein concentration of a freshwater fish *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Indian journal of fundamental and applied life sciences*, 1(4), 274-280.
- Bouchard, B. (2009). Impact des rejets urbains sur le système immunitaire et endocrinien chez la moule *Elliptio Complanata*. [Mémoire] Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, (Canada) ProQuest Dissertations & Theses, 2009. 30456739.
- Bouchard, B., Gagné, F., Fortier, M., & Fournier, M. (2009). An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Vol. 150, pp. 132-140.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.002>
- Bowers, N. G., & McComb, R. B. (1966). A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* 12(2), 70–89.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/12.2.70>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1), 248-254.
doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology*. 52, 302–310. Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

- Bärlocher, F., & Brendelberger, H. (2004). Clearance of aquatic hyphomycete spores by a benthic suspension feeder. *Limnol. Oceanogr.*, 49(6), 2292-2296. doi:10.4319/lo.2004.49.6.2292
- Camejo, G., Wallin, B., & Enojärvi, M. (1998). Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Amstrong, D. (Ed.), *Free Radical and Antioxidants Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 108. Humana Press, New Jersey, pp. 377–387.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:377>
- Campillo, J. A., Fernández, B., García, V., Benedicto, J., & León, V. M. (2017). Levels and temporal trends of organochlorine contaminants in mussels from Spanish Mediterranean waters. *Chemosphere*, 182, 584-594. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.025>
- Campillo, J. A., Sevilla, A., Albentosa, M., Bernal, C., Lozano, A. B., Cánovas, M., & León, V. M. (2015). Metabolomic responses in caged clams, *Ruditapes decussatus*, exposed to agricultural and urban inputs in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Sci. Total Environ.*, 524-525, 136-147. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.136
- Capkin, E., Terzi, E., Boran, H., Yandi, I., & Altinok, I. (2010). Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Tissue Cell*, 42(6), 376-382.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.10.001>
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41206-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41206-4)
- Carvalho, F. P., Villeneuve, J. P., Cattini, C., Tolosa, I., Thuan, D. D., & Nhan, D. D. (2008). Agrochemical and polychlorobiphenyl (PCB) residues in the Mekong River delta, Vietnam. *Mar. Pollut. Bull.*, 56(8), 1476-1485.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.04.042>
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, 58(1), 99-117.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
- Catteau, A., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Joachim, S., Palluel, O., Turies, C., Galet, C., Geffard, A., & Porcher, J.-M. (2020). An active biomonitoring approach using three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to assess the efficiency of a constructed wetland as tertiary treatment of wastewater. *Ecol. Indic.*, 114, 106238.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106238>
- Catteau, A., Le Guernic, A., Palos Ladeiro, M., Dedourge-Geffard, O., Bonnard, M., Bonnard, I., Delahaut, L., Bado-Nilles, A., Porcher, J.-M., Lopes, C., Geffard, O. & Geffard, A. (2023). Integrative biomarker response - Threshold (IBR-T): Refinement of IBRv2 to consider the

- reference and threshold values of biomarkers. *J. Environ. Manage.*, 341, 118049.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118049>
- CCME (Canada Council of Ministers of Environment) (2007). A protocol for the derivation of water quality guidelines for the protection of aquatic life 2007. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999. Winnipeg, Canada: Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999. No. 1299; PN 1452 (ISBN 1-896997-34-1). Retrieved from <https://ccme.ca/fr/res/protocole-delaboration-des-recommandations-pour-la-qualite-des-eaux-en-vue-de-proteger-la-vie-aquatique-2007-fr.pdf>
- CCME (Canada Council of Ministers of Environment) (2010). Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux visant la protection de la vie aquatique : ammoniac. Dans : Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 1999, Conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg. Extrait de la publication n° 1300; ISBN 1-896997-36-8. Retrieved from <https://ccme.ca/fr/res/ammoniac-fr-recommandations-canadiennes-pour-la-qualit-des-eaux-protection-de-la-vie-aquatique.pdf>
- CCME (Canada Council of Ministers of Environment) (2011). Protocols manual for water quality sampling in Canada. Winnipeg, Canada: Canadian Council of Ministers of the Environment. PN 46 (ISBN 978-1-896997- 7-0). Retrieved from <https://publications.gc.ca/site/eng/9.697889/publication.html>
- CCME (Canada Council of Ministers of Environment) (2012). Fiche d'information. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique – nitrate. Conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg. ISBN 1-896997-36-8. Retrieved from <https://ccme.ca/fr/res/ion-nitrate-fr-recommandations-canadiennes-pour-la-qualit-des-eaux-protection-de-la-vie-aquatique.pdf>
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS one*, 9(5), e96580.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Cerdeira, A. L., & Duke, S. O. (2006). The Current Status and Environmental Impacts of Glyphosate-Resistant Crops. *J. Environ. Qual.*, 35(5), 1633-1658.
<https://doi.org/10.2134/jeq2005.0378>
- Chapman, P. M., McDonald, B. G., & Lawrence, G. S. (2002). Weight-of-evidence issues and frameworks for sediment quality (and other) assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(7), 1489-1515. <https://doi.org/10.1080/20028091057457>
- Cheghib, Y., Chouahda, S., & Soltani, N. (2020). Side-effects of a neonicotinoid insecticide (actara®) on a non-target larvivorous fish *Gambusia affinis*: Growth and biomarker

- responses. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(2), 167-172.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.12.007>
- Chen, F., Ling, X., Zhao, Y., & Fu, S. (2022). Hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in gills of scaleless carp (*Gymnocypris przewalskii*). *Fish Physiol. Biochem.* 48 (4), 911-924.
<https://doi.org/10.1007/s10695-022-01091-3>
- Cheney, M. A., Fiorillo, R., & Criddle, R. S. (1997). Herbicide and estrogen effects on the metabolic activity of *Elliptio complanata* measured by calorimetry. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 118(2), 159-164.
[https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(97\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(97)00102-3)
- Chromcová, L., Blahová, J., Plhalová, L., Zivna, D., Stepanova, S., Praskova, E., Prokes, M., Zelnickova, L., Skoric, M., & Svobodová, Z. (2013). The effects of atrazine exposure on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Neuroendocrinol Lett*, 34(Suppl 2), 95-101.
- Cruz, F. V. d. S., Brant, H. S. C., Ohlund, L., Sleno, L., & Juneau, P. (2024). Tolerance and phytoremediation capacity of atrazine and S-metolachlor by two duckweeds. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 31(49), 59382-59397. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35122-8>
- Cui, F., Chai, T., Qian, L., & Wang, C. (2017). Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 169, 107-116.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.073>
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., & Viarengo, A. (2008). A weight-of-evidence approach for the integration of environmental “triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environ. Assess. Manage.*, 4(3), 314-326. https://doi.org/10.1897/IEAM_2007-067.1
- Day, K. E., Metacalfe, J. L., & Batchelor, S. P. (1990). Changes in intracellular free amino acids in tissues of the caged mussel, *Elliptio complanata*, exposed to contaminated environments. *Arch Environ Contam Toxicol*, 19(6), 816-827. <https://doi.org/10.1007/BF01055046>
- De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (2003). The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.: An International Journal*, 22(7), 1632-1641. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220727>
- de Souza, R. M., Seibert, D., Quesada, H. B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M. R., & Bergamasco, R. (2020). Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Saf. Environ. Prot.*, 135, 22-37. doi:

- De Zwaan, A., & Mathieu, M. (1992). Cellular biochemistry and endocrinology. In E. Gosling (Ed.), *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Developments in aquaculture and fisheries science. Vol. 25, pp. 223-307.
- Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol. Reports*, 5, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(1), 84-98. doi:10.1002/etc.5620200108
- Demetrio, P. M., Bonetto, C., et Ronco, A. E. (2014). The Effect of Cypermethrin, Chlorpyrifos, and Glyphosate Active Ingredients and Formulations on *Daphnia magna* (Straus). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 93(3), 268-273. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1336-0>
- Deneer, J. W. (2000). Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science*, 56(6), 516-520. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200006\)56:6%3C516::AID-PS163%3E3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200006)56:6%3C516::AID-PS163%3E3.0.CO;2-0)
- Di Fiori, E., Pizarro, H., dos Santos Afonso, M., & Cataldo, D. (2012). Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 81, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.024>
- Données Québec. (s.d.). Atlas de l'eau : suivi de la qualité de l'eau du fleuve et des rivières. Gouvernement du Québec: Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs. Retrieved from <https://www.donneesquebec.ca/recherche/fr/dataset/suivi-physicochimique-des-rivieres-et-du-fleuve>
- dos Santos, K. C., & Martinez, C. B. R. (2014). Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 100, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.014>
- Douville, M., Gagné, F., André, C., & Blaise, C. (2009). Occurrence of the transgenic corn cry1Ab gene in freshwater mussels (*Elliptio complanata*) near corn fields: evidence of exposure by bacterial ingestion. In *Ecotoxicol Environ Saf.* Vol. 72, pp. 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.006>
- Drewek, A., Lubawy, J., Domek, P., Polak, J., Słocińska, M., Dziegelewska, A., & Klimaszyk, P. (2024). Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides? *Water*, 16(13) (1882). <https://www.mdpi.com/2073-4441/16/13/1882>

- Du, J., Izquierdo, D., Xu, H.-F., Beisner, B., Lavaud, J., Ohlund, L., Sleno, L., & Juneau, P. (2023). Responses to herbicides of Arctic and temperate microalgae grown under different light intensities. *Environ. Pollut.*, 333, 121985. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121985>
- Du-Carrée, J. L., Morin, T., & Danion, M. (2021). Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides. *Aquatic Toxicology*, 230, 105687. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105687>
- Duchemin, Marc et Serge Hébert, (2014). Les métaux dans les rivières du sud-ouest du Québec (2008-2011), 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, ISBN 978-2-550-71296-1 (PDF), 24 pages, 17 annexes.
- Duke, S.O. (2021). Glyphosate: Uses Other Than in Glyphosate-Resistant Crops, Mode of Action, Degradation in Plants, and Effects on Non-target Plants and Agricultural Microbes. In: J. B. Knaak (Ed.), *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 255: Glyphosate (pp. 1-65). Springer Cham. https://doi.org/10.1007/398_2020_53
- Dupraz, V., Stachowski-Haberkorn, S., Wicquart, J., Tapie, N., Budzinski, H., & Akcha, F. (2019). Demonstrating the need for chemical exposure characterisation in a microplate test system: toxicity screening of sixteen pesticides on two marine microalgae. *Chemosphere*, 221, 278-291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.035>
- ECCC, (2013a). L'eau au Canada. Environnement et Changement climatique Canada. Retrieved from <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/eau-aperçu/publications/eau-au-canada.html>
- ECCC, (2013b). Sources d'eau : les eaux souterraines. Environnement et Changement climatique Canada. Retrieved from <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/eau-aperçu/sources/eaux-souterraines.html>
- EFSA. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorantraniliprole. *EFSA Journal*, 11(6) (3143). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3143>
- Eggens, M.L., Galgani, F., Klungøyr, J., & Everts, J. (1992). Hepatic EROD activity in dab, *Limanda limanda*, in the German Bight using an improved plate-reader method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91(1/3), 71–75. <http://www.jstor.org/stable/24832642>
- El-Gendy, K. S., Radwan, M. A., Gad, A. F., Khamis, A. E., & Eshra, E. H. (2019). Use of multiple endpoints to investigate the ecotoxicological effects of abamectin and thiamethoxam on *Theba pisana* snails. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 167, 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.027>

- Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V., & Feather-stone R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemic Pharmacol.* 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- EPA. (2013). Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria For Ammonia – Freshwater 2013. Retrieved from <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/aquatic-life-ambient-water-quality-criteria-for-ammonia-freshwater-2013.pdf>
- Esterbauer H., & Cheeseman K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
- European Commission (2011). Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Technical guidance for deriving environmental quality standards. Guidance document No. 27. European Commission, Technical Report - 2011 - 055, 204. Retrieved from <https://circabc.europa.eu/sd/a/0cc3581b-5f65-4b6f-91c6-433a1e947838/TGD-EQS%20CIS-WFD%2027%20EC%202011.pdf>
- Ewere, E. E., Reichelt-Brushett, A., & Benkendorff, K. (2020). The neonicotinoid insecticide imidacloprid, but not salinity, impacts the immune system of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Sci. Total Environ.*, 742, 140538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140538>
- Ewere, E. E., Reichelt-Brushett, A., & Benkendorff, K. (2021). Impacts of Neonicotinoids on Molluscs: What We Know and What We Need to Know. *Toxics*, 9(2), 21. <https://doi.org/10.3390/toxics9020021>
- Ewing, J. F., & Janero, D. R. (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical biochemistry*, 232(2), 243-248. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.0014>
- Fabrello, J., Grapputo, A., Munari, M., Marin, M. G., Masiero, L., Pacchioni, B., Millino, C., & Matozzo, V. (2020). Molecular and biochemical responses of vitellogenin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to the glyphosate-based herbicide Roundup® Power 2.0. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27(21), 26543-26553. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08985-w>
- FAO, (2024). Indicateurs des pesticides: Pesticides - Average use per area of cropland (1990-2022). Organisation des Nation Unies pour l'alimentation - Statistics Division (Environment Statistics). Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/EP/visualize>
- Farcy, E., Gagné, F., Martel, L., Fortier, M., Trépanier, S., Brousseau, P., & Fournier, M. (2011). Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio*

- complanata exposed to municipal effluents. *Environ. Res.* 111, pp. 1096-1106.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.07.009>
- Feng, X., Liu, Z., Vo Duy, S., Munoz, G., Parent, L. & Sauvé, S. (2024). Pesticides and transformation products in surface waters of western Montérégie, Canada: occurrence, spatial distribution and ecotoxicological risks. *Environ. Sci. Adv.*, 3(6), 861-874.
<https://doi.org/10.1039/d3va00231d>
- Flynn, K., & Spellman, T. (2009). Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 72(4), 1228-1233.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.013>
- Flynn, K., Wedin, M.B., Bonventre, J.A., Dillon-White, M., Hines, J., Weeks, B.S., André, C., Schreibman, M. P., & Gagné, F. (2013). Burrowing in the Freshwater Mussel *Elliptio complanata* is Sexually Dimorphic and Feminized by Low Levels of Atrazine. *J. Toxicol. Environ. Health A* 76 (20), 1168-1181. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.845865>
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., & Queen, C.A. (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin. Chem.* 18, 673-674.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/18.7.673>
- Frontera, J.L., Gilette, N., Hull, B., Korang, J., Amorin, C., Vatnick, I., & Rodriguez, E.M. (2014). Effects of glyphosate and polyoxyethylene amine on metabolic rate and energy reserves of *Procambarus clarkii* juveniles. *Arch. Open Environ. Sci.* 8(1), 49-53.
<http://dx.doi.org/10.2174/1876325101408010049>
- Frontera, J. L., Vatnick, I., Chaulet, A., & Rodríguez, E. M. (2011). Effects of Glyphosate and Polyoxyethylenamine on Growth and Energetic Reserves in the Freshwater Crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 61(4), 590-598. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9661-3>
- Fujimoto, Y., Sakuma, S., Inoue, T., Uno, E., & Fujita, T. (2002). The endocrine disruptor nonylphenol preferentially blocks cyclooxygenase-1. *Life sciences*, 70(19), 2209-2214.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01538-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01538-7)
- Fulton, M. H., & Key, P. B. (2009). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.: An International Journal*, 20(1), 37-45.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Fulton, T. (1904). The rate of growth of fishes. Twenty-second Annual Report of the Fishery Board for Scotland. Fishery Board for Scotland, Edinburgh, United Kingdom. 0, p 141-241.
- Fulton, T.W. (1902). The rate of growth of fishes. 20th Annu. Rep. Fish. Board Scotl. 3, 326-446.

- Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier M., & Garric, J. (2009). Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquat. Toxicol.*, 92(3), 155-167. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.012>
- Gagnon, C., Gagné, F., Turcotte, P., Saulnier, I., Blaise, C., Salazar, M. H., & Salazar, S. M. (2006). Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. *Chemosphere*. Vol. 62, pp. 998-1010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.055>
- Gagné, F. & Blaise, C. (2003). Biomarkers to assess endocrine disruption or reproduction in bivalves. In Mothensill, C. and Austin, B. (eds). *In vitro methods in aquatic toxicology*, 221–240. Springer. Chichester, UK: Praxis Publishing
- Gagné, F., & Blaise, C. (1995). Genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 217–229. <https://doi.org/10.1002/tox.2530100309>
- Gagné, F., & Blaise, C. (1998). Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 44(1-2), 83-91. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00066-6)
- Gagné, F., André, C., Bouchard, B., Fournier, M., & Gagnon, C. (2010). Neurotoxicological effects of aeration lagoon effluents for the treatment of domestic and hospital wastewaters on *Elliptio complanata*. In: Visser J.E., (ed). *Ecotoxicology around the globe*. NY, USA: Nova Science Publishers. p. 1-20.
- Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., & Fournier, M. (2011a). Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 154, pp. 100-107.
- Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., & Fournier, M. (2011b). Evidence of neuroendocrine disruption in freshwater mussels exposed to municipal wastewaters. *Sci Total Environ.*, 409(19), 3711-3718. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.037>
- Gagné, F., André, C., Fortier, M., & Fournier, M. (2012). Immunotoxic potential of aeration lagoon effluents for the treatment of domestic and hospital wastewaters in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. In *J Environ Sci.* 24(5):781-789.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C., Gagnon, C. & Salazar, M. (2007). Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment. *Chemosphere*. Vol. 68, pp. 731-743. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60862-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60862-0)

- Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P. & Salazar, M. (2002). Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environ Toxicol*, 17(3), 149-159. <https://doi.org/10.1002/tox.10046>
- Gagné, F., Blaise, C., & Hellou, J. (2004). Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 138, pp. 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.006>
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., & Fournier, M. (2009). Études de biomarqueurs chez la mye commune (*Mya arenaria*) du fjord du Saguenay: bilan de recherches (1997 à 2006). *Revue des sciences de l'eau*, 22(2), 253-269. <https://doi.org/10.7202/037484ar>
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S., & Hansen, P. D. (2001a). Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem and Physiol C Toxicol & Pharmacol*, 128(2), 213-225. doi:[https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(00\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(00)00189-7)
- Gagné, F., Bouchard, B., André, C., Farcy, E., & Fournier, M., 2011c. Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. 153 (1), 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.09.002>
- Gagné, F., Cejka, P., André, C., Hausler, R., & Blaise, C. (2007). Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. (Vol. 146, pp. 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.006>
- Gagné, F., Douville, M., Fortier, M., & Fournier, M. (2015). Effects of a municipal effluent on the freshwater mussel *Elliptio complanata* following challenge with *Vibrio anguillarum*. *J. Environ. Sci.*, 37, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.03.029>
- Gagné, F., & Blaise, C. (2003). Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 136, pp. 117-125. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00171-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00171-6)
- Gagné, F., Gélinas, M., Fortier, M., & Fournier, M. (2018). The effects of cyanobacterial blooms on the immune system of *Elliptio complanata* in urban and agricultural areas in the Yamaska River watershed. *Invertebrate Survival Journal*, 15(1), 39-51. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v15i1.39-51>

- Gagné, F., Marcogliese, D. J., Blaise, C., & Gendron, A. D. (2001b). Occurrence of compounds estrogenic to freshwater mussels in surface waters in an urban area. *Environ Toxicol.* Vol. 16, pp. 260-268. <https://doi.org/10.1002/tox.1032>
- Gagné, F., Turcotte, P., Auclair, J., & Gagnon, C. (2013). The effects of zinc oxide nanoparticles on the metallome in freshwater mussels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Vol. 158, pp. 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.04.001>
- Gajula, S. K., Kanthala, S. K., Narra, M. R., & Vanamala, V. D. (2023). Individual and interactive biochemical profile damages in *Labeo rohita* (Cyprinidae) by imidacloprid and clothianidin. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 271, 109689. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109689>
- Garcia-Muñoz, P., Dachtler, W., Altmayer, B., Schulz, R., Robert, D., Seitz, F., Rosenfeldt, R., & Keller, N. (2020). Reaction pathways, kinetics and toxicity assessment during the photocatalytic degradation of glyphosate and myclobutanil pesticides: Influence of the aqueous matrix. *Chem. Eng. J.*, 384, 123315. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123315>
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.-C., & Séralini, G.-E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicol.*, 262(3), 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>
- Gendron, A. D., Lacaze, É., Taranu, Z. E., Gouge, R., Larbi-Youcef, Y., Houde, M., André, C., Gagné, F., Triffault-Bouchet, G., & Giroux, I. (2023). The Comet Assay, a Sensitive Biomarker of Water Quality Improvement Following Adoption of Beneficial Agricultural Practices? *Environ. Toxicol. Chem.*, 42(10), 2201-2214. <https://doi.org/10.1002/etc.5711>
- Giese, A. C. (1966). Lipids in the economy of marine invertebrates. *Physiological Reviews*, 46(2), 244-298. <https://doi.org/10.1152/physrev.1966.46.2.244>
- Girotti, A. W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1(2), 87-95. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90011-X)
- Giroux, I. (2014). Présence de pesticides dans l'eau au Québec - Zones de vergers et de pommes de terre [...]. Québec, Développement durable, environnement et lutte contre les changements climatiques. 1 (73 pages) : illustrations en couleur, Collections de BAnQ. [En ligne] <https://numerique.banq.qc.ca/patrimoine/details/52327/2473197>
- 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, ISBN . 978-2-550-73603-5, 47 p. + 5 ann.

- Giroux, I. (2017). Présence de pesticides dans l'eau de surface au Québec – Zones de vergers, & de cultures maraîchères, 2013 à 2016. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction de l'information sur les milieux aquatiques, 47.
- Giroux, I. (2018). État de situation sur la présence de pesticides au lac Saint-Pierre. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction de l'information sur les milieux aquatiques, Québec.
https://belsp.uqtr.ca/id/eprint/1414/1/Giroux_2018_%C3%89tat_situation_pesticides_LSP.pdf
- Giroux, I. (2019). Présence de pesticides dans l'eau au Québec: portrait, & tendances dans les zones de maïs, & de soya 2015 à 2017. Québec, ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l'état de l'environnement, 64 p. + 6 ann.
- Giroux, I. (2022). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait, & tendances dans les zones de maïs, & de soya – 2018 à 2020. Québec, ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction de la qualité des milieux aquatiques, 71 p. + 15 ann.
- 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 Naturaliste canadien*, 140(2), 26-34. <https://doi.org/10.7202/1036500ar>
- Giroux, I., Roy, N., & Lamontagne, C. (2010). Présence de Pesticides dans l'Eau Souterraine en Milieu Agricole : Étude Pilote du Bassin Versant de la Rivière Châteauguay. *Canadian Water Resources Journal / Revue canadienne des ressources hydriques*, 35(4), 527-542. <https://doi.org/10.4296/cwrj3504527>
- Goldberg D. M., & Spooner R. J. (1983). Glutathione Reductase. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J Grabl M., (eds) 1983. *Methods of enzymatic analysis*. 3rd ed. Vol. 111 Weinheim, Germany: Verlag Chemie; p. 258-65.
- Gomes, M. P., & Juneau, P. (2016). Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *Environmental Pollution*, 218, 402-409.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.019>
- Gonçalves, A. M. M., Mesquita, A. F., Verdelhos, T., Coutinho, J. A. P., Marques, J. C., & Gonçalves, F. (2016). Fatty acids' profiles as indicators of stress induced by of a common herbicide on two marine bivalves species: *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) and

- Scrobicularia plana* (da Costa, 1778). *Ecological Indicators*, 63, 209-218.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.006>
- Gonçalves, B. B., Giaquinto, P. C., dos Santos Silva, D., de Lima, A. A., Darosci, A. A. B., Portinho, J. L., Carvalho W. F., & Rocha, T. L. (2019). Ecotoxicology of glyphosate-based herbicides on aquatic environment. In Ince and Ondrasek (Eds.), *Biochemical toxicology-heavy metals and nanomaterials*. IntechOpen. pp 25-48.
- Gouvernement du Québec. (2010). *Atlas du bassin versant de la rivière Châteauguay*.
 Gouvernement du Québec: Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs. Retrieved from
<https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/atlas/chateauguay/index.html>
- Gouvernement du Québec. (2021). *Inventaire de l'obovarie olivâtre (Obovaria olivaria) dans cinq cours d'eau de la Montérégie*. Bibliothèque et Archives nationales du Québec.
 Gouvernement du Québec Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs. 2024/08/11
 Collections de BAnQ. ISBN978-2-550-90163-1. Retrieved from
<https://numerique.banq.qc.ca/patrimoine/details/52327/4462816>
- Gouvernement du Québec. (2024). *Bilan des ventes de pesticides au Québec, Année (2022)*.
 Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). <https://cdn-contenu.quebec.ca/cdn-contenu/adm/min/environnement/pesticides/bilan-ventes-pesticides-quebec.pdf>
- Gowland, B. T. G., McIntosh, A. D., Davies, I. M., Moffat, C. F., & Webster, L. (2002). Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. *Mar. Environ. Res.*, 54(3), 231-235. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00129-0)
- Guo, D., Liu, W., Yao, T., Ma, M., Wang, Q., Qiu, J., & Qian, Y. (2021). Combined endocrine disruptive toxicity of malathion and cypermethrin to gene transcription and hormones of the HPG axis of male zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 267, 128864.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128864>
- Haag, W. R. (2012). *North American freshwater mussels: natural history, ecology, and conservation*: Cambridge University Press.
- Habig, W., Pabst, M., & Jakoby, W. (1974). Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

- Hackenberger, D. K., Palijan, G., Lončarić, Ž., Glavaš, O. J., & Hackenberger, B. K. (2018). Influence of soil temperature and moisture on biochemical biomarkers in earthworm and microbial activity after exposure to propiconazole and chlorantraniliprole. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.072>
- Hahn M. E., Woodward B. L., Stegeman J. J., Kennedy S. (1995). Rapid assessment of induced cytochrome P4501A (CYP1A) protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multi-well plates. Response to TCDD, TCDF, and two planar PCBs. *Environ Toxicol Chem.* 15, 582–591. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150425>
- Hanna, C., Boily, M., & Jumarie, C. (2022). Pesticides Inhibit Retinoic Acid Catabolism in PLHC-1 and ZFL Fish Hepatic Cell Lines. *Chem. Res. Toxicol.* 35 (6), 1045-1058. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00050>
- Hanna, N. S., & Shekha, Y. A. (2024). Acute Toxicity of Chlorpyrifos on the Freshwater Bivalves (*Unio Tigridis*) and Effects on Bioindicators. *Baghdad Science Journal*, 21(1) (0053). <https://doi.org/10.21123/bsj.2023.7951>
- Harris, K. A., Dangerfield, N., Woudneh, M., Brown, T., Verrin, S., & Ross, P. S. (2008). Partitioning of current-use and legacy pesticides in salmon habitat in British Columbia, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(11), 2253-2262. doi:10.1897/07-651.1
- Hassan, H. F., Mohammed, H. S., & Meligi, N. M. (2021). Potential impact of marjoram on coragen-induced physiological and histological alterations in male albino rats. *Egyptian Journal of Zoology*, 75(75), 25-38. <https://dx.doi.org/10.21608/ejz.2020.49316.1044>
- Hayes, T. B., & Hansen, M. (2017). From silent spring to silent night: Agrochemicals and the anthropocene. *Elementa-Sci. Anthropol.*, 5, 57. <https://doi.org/10.1525/elementa.246>
- Herceg-Romanić, S., Kljaković-Gašpić, Z., Klinčić, D., & Ujević, I. (2014). Distribution of persistent organic pollutants (POPs) in cultured mussels from the Croatian coast of the Adriatic Sea. *Chemosphere*, 114, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.017>
- Hill, E. F., & Fleming, W. J. (1982). Anticholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environ. Toxicol. Chem.* 1(1), 27-38. <https://doi.org/10.1002/etc.5620010105>
- Hopkins, J., & Tudhope, G.R. (1973). Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Br. J. Haematol.* 25, 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1973.tb01768.x>
- Huong, T. T. T., Hanh, N. T. H., Phuong, N. T., & Tong, N. X. (2024). Acute Toxicity of DDT on Embryo and Larval Growth of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793): A Case Study in the Saigon-Dongnai River, Vietnam. *Journal of Fisheries & Environment*, 48(1). <https://doi.org/10.34044/j.jfe.2024.48.1.09>

- Ilyaskina, D., Fernandes, S., Berg, M. P., Lamoree, M. H., Gestel, C. A. M., & Leonards, P. E. G. (2024). Exploring the Relationship Among Lipid Profile Changes, Growth, and Reproduction in *Folsomia candida* Exposed to Teflubenzuron Over Time. *Environ. Toxicol. Chem.*, 43(5), 1149-1160. <https://doi.org/10.1002/etc.5851>
- INERIS (Institut national de l'environnement industriel, & des risques) (2014). Valeur guide environnementale glyphosate. Verneuil-en-Halatte, France : Institut national de l'environnement industriel et des risques, Validation groupe d'experts. Novembre 2013 Version 2 : 03/03/2014. Institut DRC-11-112070-03978B. Retrieved from <https://substances.ineris.fr/fr/substance/getDocument/2984>
- ISQ, Institut des statistiques du Québec. (2018). Superficies des grandes cultures, rendement à l'hectare, & production, par région administrative, Québec (2016). Gouvernement du Québec. Retrieved from http://www.stat.gouv.qc.ca/statistiques/agriculture/grandes-cultures/gc_2016.htm
- 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. *Ecol. Indic.*, 93, 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.019>
- Iummato, M. M., Di Fiori, E., Sabatini, S. E., Cacciatore, L. C., Cochón, A. C., Ríos de Molina, M. d. C., & Juárez, Á. B. (2013). Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 95, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.024>
- Iummato, M. M., Sabatini, S. E., Rocchetta, I., Yusseppone, M. S., del Carmen Ríos de Molina, M., & Juárez, Á. B. (2024). Oxidative stress in the bivalve *Diplodon chilensis* under direct and dietary glyphosate-based formulation exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 31(16), 23610-23622. doi:10.1007/s11356-024-32639-w
- Jackson, J. E. (2005). A user's guide to principal components. John Wiley & Sons. p. 592. Retrieved from <https://download.e-bookshelf.de/download/0000/5847/69/L-G-0000584769-0002361571.pdf>
- Jactel, H., Verheggen, F., Thiéry, D., Escobar-Gutiérrez, A. J., Gachet, E., & Desneux, N. (2019). Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*, 129, 423-429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.045>
- Jeninga, A. J., Kooij, N., Harrahy, E., & King-Heiden, T. C. (2023). Binary mixtures of imidacloprid and thiamethoxam do not appear to cause additive toxicity in fathead minnow

- larvae (*Pimephales promelas*). *Frontiers in Toxicology*, 5, 1282817.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1282817>
- Jermyn, M.A. (1975). Increasing the sensitivity of the anthrone method for carbohydrate. *Anal. Biochem.* 68, 332-335. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90713-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90713-7)
- Ji, Y., Wu, P., Zhang, J., Zhang, J., Zhou, Y., Peng, Y., Zhang, S., Cai, G., & Gao, G. (2018). Heavy metal accumulation, risk assessment and integrated biomarker responses of local vegetables: A case study along the Le'an river. *Chemosphere*, 199, 361-371.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.045>
- Johnson, A. C., Jin, X., Nakada, N., & Sumpter, J. P. (2020). Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment. *Science*, 367(6476), 384-387.
<https://doi.org/10.1126/science.aay6637>
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160. doi: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Kakko, I., Toimela, T., & Tahti, H. (2003). The synaptosomal membrane bound ATPase as target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosphere* 51, 475–480. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00854-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00854-8)
- Kassotis, C.D., Kollitz, E.M., Ferguson, P.L., & Stapleton, H.M. (2017). Nonionic Ethoxylated Surfactants Induce Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Toxicol. Sci.* 162 (1), 124-136.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx234>
- Kaur, G. (2019). Herbicides and its role in induction of oxidative stress-a review. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4, 995-1004.
<http://dx.doi.org/10.22161/ijeab.4416>
- Keen, J.H., Habig, W.H., & Jakobi, W.B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Beyrem, H., & Mahmoudi E. (2016). Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 129, 83-88.
doi:10.1016/j.pestbp.2015.11.001
- Kim, J., Jeon, M., Paeng, K. J., & Paeng, I. R. (2008). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of catecholamine, dopamine in serum. *analytica chimica acta*, 619(1), 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.042>

- Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M., Takács, E., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., & Székács, A. (2024). Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to (2023). *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12302-024-00849-1>
- Kocamaz, D., & Oruc, E. (2020). Effect of Thiamethoxam and λ Cyhalothrin, Administered Individually and in Mixture on the Endocrine Function and Antioxidant Defense of Gonads of *Oreochromis niloticus*. *Pakistan Journal of Zoology*, 52(3). <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20181014161054>
- Kortenkamp, A., & Faust, M. (2018). Regulate to reduce chemical mixture risk. *Science*, 361(6399), 224-226. <https://doi.org/10.1126/science.aat9219>
- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N. R., & Cochon, A. C. (2010). Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. *Aquat. Toxicol.* 96, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.001>
- Kurelec, B., Smital, T., Pivecevic, B., Eufemia, N., & Epel, D. (2000). Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein and chemosensitizers. *Ecotoxicol.*, 9(5), 307–327.
- Köprücü, K., Yonar, S. M., & Şeker, E. (2010). Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fisheries science*, 76, 1007-1013. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0293-8>
- Köprücü, Ş. S., Yonar, E., & Seker, E. (2008). Effects of deltamethrin on antioxidant status and oxidative stress biomarkers in freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 81(3), 253-257. doi:10.1007/s00128-008-9474-x
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., & Geffard, O. (2011). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution*, 159(6), 1682-1691. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.038>
- Lagadic, L., Caquet, T., & Amiard, J.C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, 1-9.
- Lajoie, M. (1999). L'agriculture, & ses multiples usages de l'eau. Consultation publique sur la gestion de l'eau au Québec, Document de soutien à l'atelier de travail de la Commission du, 28 mai (1999). Bureau d'audiences publiques sur l'environnement (BAPE). <https://archives.bape.gouv.qc.ca/sections/archives/eau/docdeposes/lesdocumdeposes/gene108-4.pdf>

- Lalonde, B., & Garron, C. (2020). Temporal and Spatial Analysis of Surface Water Pesticide Occurrences in the Maritime Region of Canada. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 79(1), 12-22. doi:10.1007/s00244-020-00742-x
- Lalouette, A. (2023). Place de la plasticité dans la variabilité de la sensibilité toxicologique et des traits d'histoire de vie des populations de *Gammarus fossarum* exposées à la contamination chronique des cours d'eau par le cadmium. [Thèse de doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I] (Publication Number 2023LYO10212). Inee-cnrs. <https://theses.hal.science/tel-04813444>
- Lapointe, D., Sarrasin, B., & Guillemard, A. (2015). Changements climatiques et mise en tourisme du fleuve St-Laurent au Québec. *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement*, Hors-série 23. DOI : <https://doi.org/10.4000/vertigo.16575>
- Lasserre, F. (2009). Les aménagements hydroélectriques du Québec: le renouveau des grands projets. *Géocarrefour*, 84(1-2), 11-18. DOI : <https://doi.org/10.4000/geocarrefour.7186>
- Leprêtre, M., Geffard, A., Palos Ladeiro, M., Dedourge-Geffard, O., David, E., Delahaut, L., Bonnard, I., Barjhoux, I., Nicolaï, M., Noury, P., Espeyte, A., Chaumot, A., Degli-Esposti, D., Geffard, O., & Lopes, C. (2022). Determination of biomarkers threshold values and illustration of their use for the diagnostic in large-scale freshwater biomonitoring surveys. *Environmental Sciences Europe*, 34(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12302-022-00692-2>
- Limay-Rios, V., Forero, L. G., Xue, Y., Smith, J., Baute, T., & Schaafsma, A. (2016). Neonicotinoid insecticide residues in soil dust and associated parent soil in fields with a history of seed treatment use on crops in southwestern Ontario. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35(2), 303-310. doi:10.1002/etc.3257
- Lin, H., Lin, F., Yuan, J., Cui, F., & Chen, J. (2021). Toxic effects and potential mechanisms of Fluxapyroxad to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci. Total Environ.*, 769, 144519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144519>
- Liu, X., Bian, D.-D., Jiang, Q., Jiang, J.-J., Jin, Y., Chen, F.-X., Zhang, D.-Z., Liu, Q.-N., Tang, B.-P., & Dai, L.-S. (2024). Insights into chlorantraniliprole exposure via activating cytochrome P450-mediated xenobiotic metabolism pathway in the *Procambarus clarkii*: Identification of P450 genes involved in detoxification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134231>
- Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., & Jin, Y. (2016). Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 148, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.007>

- 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)
- Livingstone, D. R., Lips, F., Martinez, P. G., & Pipe, R. K. (1992). Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 112(2), 265-276. doi:10.1007/BF00702471
- Loi affirmant le caractère collectif des ressources en eau et visant à renforcer leur protection, (RLRQ, c. C-6.2).
- Loi concernant la conservation des milieux humides et hydriques, (LQ, (2017) c. 14).
- Loi sur la conservation du patrimoine naturel, (RLRQ, c-61.01).
- Loi sur la qualité de l'environnement, (RLRQ, c. Q-2).
- Loi sur les pesticides, (RLRQ, c. P-9.3).
- Lomte, V., & Alam, S. (1982). Changes in the biochemical components of the prosobranch, *Bellamia (Viviparous) bengalensis* on exposure to malathion. *Proc. Symp. Physiol. Resp. Ani. Pollutants*, Vol. 13, No. 4, pp. 120-126.
- Lu, Y., Ludsin, S. A., Fanslow, D. L., & Pothoven, S. A. (2008). Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 65 (10), 2233-2241. <https://doi.org/10.1139/F08-135>
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- L'Honoré, T., Mégevand, L., Hermet, S., M'colo, Z. A., Farcy, E., Bertin, L., Cadière, A., Lignot, J.-H., & Sucré, E. (2024). A multi-scale integrative approach to study the impact of a common pesticide, the dimethoate, on a mangrove fiddler crab *Tubuca urvillei*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 31(56), 64656-64674. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35489-8>
- Mahmood, I., Imadi, S.R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K.R. (2016). Effects of Pesticides on Environment. In: Hakeem, K., Akhtar, M., Abdullah, S. (Eds.), *Plant, Soil and Microbes*. Springer, Cham. pp. 253-269. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13
- MAPAQ. (2014). Portrait agroalimentaire de la Montérégie. Directions régionales de la Montérégie, secteurs Est et Ouest, 12. Retrieved from <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Regions/monteregie/md/publications/Pages/Details-Publication.aspx?guid=%7b026115f4-5137-446b-aa53-53933443d045%7d>
- Marins, A. T., Severo, E. S., Cerezer, C., Leitemperger, J. W., Müller, T. E., Floriano, L., Prestes, O. D., Zanella, R., & Loro, V. L. (2021). Environmentally relevant pesticides induce

- biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology*, 30(4), 585–598. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02368-8>
- Martel, A. L., McAlpine, D. F., Madill, J. B., Sabine, D. L., Paquet, A., Pulsifer, M. D., & Elderkin, M. F. (2010). Freshwater mussels (Bivalvia: Margaritiferidae, unionidae) of the Atlantic Maritime Ecozone. In McAlpine, D. F., & Smith, I. M. (Eds.), *Assessment of species diversity in the Atlantic Maritime Ecozone*. NRC Res. Press, Ottawa, Ont. Can. pp. 551–598.
- Mathieu, M., Bergeron, J.P., & Danet, A.M.A. (1982). L'aspartate transcarbamoylase, indice d'activité gamétogénétique chez la moule *Mytilus edulis* L. *Int. J. Invert. Reprod.* 5, 337–343.
- Matozzo, V., Fabrello, J., & Marin, M. G. (2020). The effects of glyphosate and its commercial formulations to marine invertebrates: a review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(6), 399. doi: <https://doi.org/10.3390/jmse8060399>
- Matozzo, V., Fabrello, J., Masiero, L., Ferraccioli, F., Finos, L., Pastore, P., Di Gangi, I. M., & Bogialli, S. (2018). Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Pollut.*, 233, 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.100>
- Matozzo, V.; Zampieri, C.; Munari, M.; & Marin, M.G. (2019). Glyphosate affects haemocyte parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Mar. Environ. Res.*, 146, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.03.008>
- Maul, J. D., Brennan, A. A., Harwood, A. D., & Lydy, M. J. (2008). Effect of sediment-associated pyrethroids, fipronil, and metabolites on *Chironomus tentans* growth rate, body mass, condition index, immobilization, and survival. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(12), 2582–2590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1897/08-185.1>
- McCord, J.M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte (hemocytin). *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- MELCC. (2018). À propos des pesticides. Gouvernement du Québec. Retrieved from <http://www.environnement.gouv.qc.ca/pesticides/apropos.htm>
- MELCC. (2019). Méthodes d'élaboration des critères de qualité de l'eau pour la protection de la vie aquatique relatifs aux substances toxiques. Retrieved from https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/index.asp
- MELCC. (2020a). Rapport sur l'état de l'eau, & des écosystèmes aquatiques au Québec - Édition 2014. Gouvernement du Québec : Bureau des connaissances sur l'eau, Ministère de

- l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs. Bibliothèque et Archives nationales du Québec ISBN 978-2-550-88239-8 (PDF).
<https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/rapport-eau/rapport-eau-2014.pdf>
- MELCC. (2020b). Rapport sur l'état des ressources en eau et des écosystèmes aquatiques du Québec. 480. 978-2-550-87855-1 (PDF). [https://doi.org/ISBN 978-2-550-87855-1](https://doi.org/ISBN%20978-2-550-87855-1)
- MELCC. (2022). ACTIONS CONCERTÉES SUR L'EAU (2022). Retrieved from <https://cdn-contenu.quebec.ca/cdn-contenu/adm/min/environnement/pesticides/bilan-ventes-pesticides-quebec-2020.pdf?1654876442>
- MELCCFP. (2024). Bilan des ventes de pesticides au Québec: Année (2022). Québec, Canada: Ministère de l'Environnement, de la lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs, 26. <https://cdn-contenu.quebec.ca/cdn-contenu/adm/min/environnement/pesticides/bilan-ventes-pesticides-quebec.pdf>
- MELCCFP. (s.d.). Règles générales d'utilisation des critères de qualité de l'eau. Québec. Retrieved 20-08-2024 from https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/criteres_eau/generales.htm
- Metcalf, J. L., & Charlton, M. N. (1990). Freshwater mussels as biomonitors for organic industrial contaminants and pesticides in the St. Lawrence River. *Sci. Total Environ.*, 97-98, 595-615. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(90\)90264-U](https://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90264-U)
- Milinkovitch, T., Geffard, O., Geffard, A., Mouneyrac, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Fisson, C., Minier, C., Auffret, M., Perceval, O., Egea, E., & Sanchez, W. (2019). Biomarkers as tools for monitoring within the Water Framework Directive context: concept, opinions and advancement of expertise. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26(32), 32759-32763. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06434-x>
- Milun, V., Grgas, D., & Dragičević, T. L. (2016). Assessment of PCB and chlorinated pesticide accumulation in mussels at Kaštela Bay (Eastern Adriatic). *Sci. Total Environ.*, 562, 115-127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.133>
- Minakshi, R., Mahajan, A., & Zambare, S. (2013). Biochemical alterations in protein contents of freshwater bivalve, *lamellidens marginalis* after exposure to thiamethoxam and triazophos. *Foot*, 75(3.45), 75 12.
- Mir, F. A., Shah, G. M., Jan, U., & Mir, J. I. (2012). Studies on influences of sublethal concentrations of organophosphate pesticide; dichlorvos (DDVP) On Gonadosomatic Index (GSI) of female common carp, *Cyprinus carpio Communis*. *American-Eurasian J Toxicol. Sci.*, 4(2), 67-71. 10.5829/idosi.ajejts.2012.4.2.63129
- Mir, F. A., Shah, G. M., Jan, U., Mir, J. I., & Dubey, V. K. (2011). Studies on influences of sublethal concentrations of organophosphate pesticide-Dimethoate (Rogor), on Gonado

- Somatic Index (GSI) of female common carp, *Cyprinus carpio communis*. *J. Ecophysiol. Occup. Health.*, 11(3/4), 117-121.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170-3175. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45228-9)
- Montiel-León, J. M., Munoz, G., Vo Duy, S., Do, D. T., Vaudreuil, M.-A., Goeury, K., Guillemette, F., Amyot, M., & Sauvé, S. (2019). Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers. *Environ. Pollut.*, 250, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.125>
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Pabic, C.L., Voiseux, C., Lebel, J.M., Serpentine A., Fievet B., & Costil, K. (2015). Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Mar. Pollut. Bull.* 95 (2), 665-677. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.026>
- Moulton, C. A., Fleming, W. J., & Purnell, C. E. (1996). Effects of two cholinesterase-inhibiting pesticides on freshwater mussels. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(2), 131-137. doi:10.1897/1551-5028(1996)015<0131:EOTCIP>2.3.CO;2
- Moustafa, M. A. M., Fouad, E. A., Ibrahim, E., Erdei, A. L., Kárpáti, Z., & Fónagy, A. (2023). The Comparative Toxicity, Biochemical and Physiological Impacts of Chlorantraniliprole and Indoxacarb on *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Toxics*, 11(3), 212. <https://www.mdpi.com/2305-6304/11/3/212>
- Mukherjee, D., Saha, S., Chukwuka, A. V., Ghosh, B., Dhara, K., Saha, N. C., Pal P., & Faggio, C. (2022). Antioxidant enzyme activity and pathophysiological responses in the freshwater walking catfish, *Clarias batrachus* Linn under sub-chronic and chronic exposures to the neonicotinoid, Thiamethoxam®. *Sci. Total Environ.*, 836, 155716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155716>
- Mundhe, A., & Pandit, S. (2014). Assessment of toxicity of monocrotophos in freshwater bivalve, *Lamellidens marginalis*, using different markers. *Toxicol. International*, 21(1), 51-56. doi:10.4103/0971-6580.128793
- Mundhe, A., Bhilwade, H., et Pandit, S. V. (2016). Genotoxicity and oxidative stress as biomarkers in fresh water mussel, *Lamellidens marginalis* (Lam.) exposed to monocrotophos. *Indian Journal of Experimental Biology*, 54(12), 822-828.
- Muñoz, J. P., Bleak, T. C., & Calaf, G. M. (2021). Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere*, 270, 128619. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619>

- Nandurkar, H. P., & Zambare, S. P. (2010). Effect of Trimethoprim on protein contents of the freshwater bivalves, *Lamellidens Corrianus* and *Parreysia cylindrica*. *J. Ecobiol.* 27(3/4), 369-376.
- Naoum, J., Lavoie, M., Gomes, M. P., & Juneau, P. (2023). Contrasting toxicity of a Fomesafen-based herbicide on three freshwater phytoplanktonic species. *Stresses*, 3(1), 102-124. <https://doi.org/10.3390/stresses3010009>
- Narbonne, J., Michel, X. (1997). Systèmes de biotransformation chez les mollusques aquatiques. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.): *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*. Collect. Ecol. Masson Editeur, Paris, 11-31.
- NCBI (2023). National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Retrieved August 26, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>
- NCBI (2024). National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 11271640, Chlorantraniliprole. Retrieved October 18, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11271640>
- NBCI (2025). National Center for Biotechnology Information: PubChem Compound Summary for CID 5821911, Thiamethoxam. Retrieved December 3, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiamethoxam>
- Neelamegam, P., Rajendran, A., Maruthanayagam, C., & Mohanraja, M. (2006). Study the protein variations induced by Monocrotophos in *Cyprinus carpio* using PIC16F877 microcontroller. *J. Sci. Ind. Res.*, 65(8), 655-658. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/4872>
- Nobles, T., & Zhang, Y. (2015). Survival, Growth, and Condition of Freshwater Mussels: Effects of Municipal Wastewater Effluent. *PLOS One*, 10(6), e0128488. [doi:10.1371/journal.pone.0128488](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128488)
- Nobles, T., Zhang, Y. (2011). Biodiversity loss in freshwater mussels: importance, threats, and solutions. In: G. Oscar, V. Gianfranco (Eds.), *Biodiversity loss in a changing planet*. Croatia: InTech, Vol. 318, pp. 17-162.
- Nogueira, L. R., Lira, V. S., Carvalho, M. M., & Francisco, R. F. (2024). Ecotoxicity of the chlorantraniliprole insecticide on *Ceriodaphnia dubia*. *STUDIES IN ENVIRONMENTAL AND ANIMAL SCIENCES*, 5(2), e7091. <https://doi.org/10.54020/seasv5n2-003>
- Nombré, Y. A., Gauthier, M., Boily, M., & Parent, L. (2025). Health effects of a glyphosate-based herbicide on *Elliptio complanata*: multi-biomarker approach. *J. Env. Sci.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2024.11.030>

- NORMAN. (2024). Environmental Quality Standards (EQS). NORMAN Ecotoxicology Database. Retrieved from <https://www.norman-network.com/nds/ecotox/lowestPnecsIndex.php>
- Odetti, L. M., Chacón, C. F., Siroski, P. A., Simoniello, M. F., & Poletta, G. L. (2023). Effects of glyphosate, 2,4-D, chlorantraniliprole, and imidacloprid formulations, separately and in mixtures in *Caiman latirostris* hatchlings. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 469, 116544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116544>
- Ohkawa H., & Ohishi N., Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 95:351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Olive, P.L. (1988). DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 487–495. <https://doi.org/10.1002/em.2850110409>
- Olsvik, P. A., & Søfteland, L. (2020). Mixture toxicity of chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, and nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocytes. *Toxicol. Reports*, 7, 547-558. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.03.008>
- Orsinger, A., Marichich, E.S., Molina, V.A., & Ramirez, O.A. (1980). A reliable and sensitive method for the simultaneous determination of dopamine, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxy-indol acetic acid in small brain samples. *Acta Physiol. Lat. Am.*, 30, 111–115.
- Osuna-Flores, I., Pérez-Morales, A., Olivos-Ortiz, A., & Álvarez-González, C. A. (2019). Effect of organophosphorus pesticides in juveniles of *Litopenaeus vannamei*: alteration of glycogen, triglycerides, and proteins. *Ecotoxicol.*, 28(6), 698-706. doi:10.1007/s10646-019-02066-6
- Palma, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Bohn, A., Soares, A. M. V. M., & Barbosa, I. R. (2009). Embryo-toxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos on the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72(6), 1714-1718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.026>
- Paquet, A., Desrosiers, N., & Martel, A. L. (2018). Rapport sur l'anodonte du gaspareau (*Anodonta imbecilis*) au Québec. Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, Direction générale de la gestion de la faune et des habitats, 54 p.
- Paquet, A., Picard, I., Caron, F., & Roux, S. (2005). Les mulettes au Québec. *Le Naturaliste Canadien*, 129(1), 78-85.
- Patil, A.G. (2011). Protein change in different tissues of freshwater bivalve *Parreysia cylindrica* after exposed to indoxcarb. *Recent Res. Sci. Technol.* 3 (3), 140 -142.

- Peddicord, R.K. (1977). Salinity and substratum effects on condition index of the bivalve *Rangia cuneata*. *Mar. Biol.* 39 (4), 351-360. <https://doi.org/10.1007/BF00391938>
- Pham, T.-T., & Proulx, S. (1997). PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence River. *Water Research*, 31(8), 1887-1896. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00025-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00025-0)
- Pilz, W. (1965). *Methods of Enzymatic analysis* (Ed.: H.U. Bergmeyer). New York, Academic Press. p. 765.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8(1), 17-29. doi:10.1007/bf02286399
- Piva, F., Ciaprin, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., & Regoli, F. (2011). Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, 83(4), 475-485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.064>
- Prémont, M.-C., & Proulx, M.-U. (2020). L'hydroélectricité du Québec et les grandes régions productrices. *Revue Organisations et territoires*, 29(1), 83-97. <https://doi.org/10.1522/revueot.v29n1.1128>
- Price, J. E., & Eads, C. B. (2011). Brooding Patterns in Three Freshwater Mussels of the Genus *Elliptio* in the Broad River in South Carolina. *American Malacological Bulletin*, 29(1/2), 121-126, 126. <https://doi.org/10.4003/006.029.0203>
- Pundir, C. S., & Chauhan, N. (2012). Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.*, 429(1), 19-31. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.025>
- Pytharopoulou, S., Sazakli, E., Grintzalis, K., Georgiou, C. D., Leotsinidis, M., & Kalpaxis, D. L. (2008). Translational responses of *Mytilus galloprovincialis* to environmental pollution: Integrating the responses to oxidative stress and other biomarker responses into a general stress index. *Aquat. Toxicol.*, 89(1), 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.013>
- Québec Government. (2010). *Atlas du bassin versant de la rivière Châteauguay*. Gouvernement du Québec: Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs. Retrieved from <https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/atlas/chateauguay/index.htm>

- Québec Government. (2020). Bilan de performance des ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées pour l'année 2018. Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques et Bureau de l'expertise en contrôle. Retrieved from <https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/ouvrages-municipaux/bilan-performance-omaeu-2018.pdf>
- Québec Government. (2021a). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2020. Direction des matières dangereuses et des pesticides du Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques. Bibliothèque et Archives nationales du Québec. ISBN 978-2-550-89616-6. Retrieved from https://www.bibliotheque.assnat.qc.ca/DepotNumerique_v2/AffichageFichier.aspx?idf=265712
- Québec Government. (2021b). Données historiques du débit moyen mensuel des rivières Chateaugay et Des Anglais, aux stations 030919 et 030921 respectivement. Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs. Retrieved from <https://www.cehq.gouv.qc.ca/atlas-hydroclimatique/stations-hydrometriques/index.htm>
- Québec Government. (2021c). Inventaire de l'obovarie olivâtre (*Obovaria olivaria*) dans cinq cours d'eau de la Montérégie. Bibliothèque et Archives nationales du Québec. Gouvernement du Québec Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs. 2024/08/11 Collections de BAnQ. ISBN978-2-550-90163-1. Retrieved from <https://numerique.banq.qc.ca/patrimoine/details/52327/4462816>
- Québec Government. (2023). Recettes monétaires agricoles au Québec, de 2012 à 2022. Statistiques: Agriculture, Issue. Gouvernement du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation. Retrieved from <https://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/statistiques/Pages/production.aspx>
- Québec Government. (2024). Bilan des ventes de pesticides au Québec, Année 2022. Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). Retrieved from <https://cdn-contenu.quebec.ca/cdn-contenu/adm/min/environnement/pesticides/bilan-ventes-pesticides-quebec.pdf>
- Relyea, R. A. (2009). A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*, 159(2), 363-376. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>
- Reyna, P. B., Ballesteros, M. L., Albá, M. L., Bertrand, L., González, M., Miglioranza, K. S. B., Tatián M., & Hued, A. C. (2019). A multilevel response approach reveals the Asian clam

- Corbicula largillierii as a mirror of aquatic pollution. *Sci. Total Environ.*, 692, 175-187.
doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.194
- Ribeiro, Y. M., Moreira, D. P., Weber, A. A., Sales, C. F., Melo, R. M. C., Bazzoli, N., Rizzo, E., & Paschoalini, A. L. (2022). Adverse effects of herbicides in freshwater Neotropical fish: A review. *Aquat. Toxicol.*, 252, 106293.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106293>
- Ricciardi, A., Neves, R. J., & Rasmussen, J. B. (1998). Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionoida) following the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion. *J. Animal Ecol.*, 67(4), 613-619.
- Ringnér, M. (2008). What is principal component analysis?. *Nature biotechnology*, 26(3), 303-304.
<https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
- Rittschof, D., & McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Pollut. Bull.*, 50(4), 369-373.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.008>
- Robillard, S., Beauchamp, G., & Laulier, M. (2003). The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 135(1), 49-59. doi:10.1016/S1532-0456(03)00049-8
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Bordalo, M. D., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M., & Pestana, J. L. T. (2017). Exposure to chlorantraniliprole affects the energy metabolism of the caddisfly *Sericostoma vittatum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 36(6), 1584-1591. <https://doi.org/10.1002/etc.3684>
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M., & Pestana, J. L. T. (2015). Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.*, 508, 506-513.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>
- Rodrigues, A. C. M., Henriques, J. F., Domingues, I., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M., & Pestana, J. L. T. (2016). Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquatic Toxicology*, 170, 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.018>
- Roesijadi, G., Anderson, J. (1979). Condition index and free amino acid content of *Macoma inquinata* exposed to oil-contaminated marine sediments. In Vernberg W. B. (Eds.), *Mar. Pollut.: Functional responses*. Academic Press, New York, pp. 69-83.

- Salazar, M., & Salazar, S. (2001). Standard guide for conducting in-situ field bioassays with marine, estuarine and freshwater bivalves. 2001 Annual Book of ASTM Standards.
- Salih, N. Y., & Al-Azawi, A. J. M. (2024). Haematological Alteration in Common Carp (*Cyprinus Carpio* L) Fish After Exposure for Two Pesticides Goldate, Alexander and Their Mixture. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Sciences*, 37(3), 106-114.
- Samanta, P., Im, H., Na, J., & Jung, J. (2018). Ecological risk assessment of a contaminated stream using multi-level integrated biomarker response in *Carassius auratus*. *Environ. Pollut.*, 233, 429-438. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.061>
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J.-M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, 2721-2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. d. M. G., & da Rosa, C. E. (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*, 130-131, 171-173. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.006>
- Schaeffer, A., & Wijntjes, C. (2022). Changed degradation behavior of pesticides when present in mixtures. *Eco-Environment & Health*, 1(1), 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2022.02.002>
- Scheuhammer, A. M., & Cherian M. G. (1986). Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol Appl Pharmacol.* 82 417–425.
- Schleicherová, D., Pastorino, P., Pappalardo, A., Nota, A., Gendusa, C., Mirone, E., Prearo, M., et Santovito, A. (2024). Genotoxicological and physiological effects of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, on the freshwater invertebrate *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*, 271, 106940. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106940>
- Schrack, D., Coquil, X., Ortat, A., et Benoit, M. (2009). Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l'Agriculture Biologique. *Innovations agronomiques*, 4, 259-268.
- Schulz, R. (2004). Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A review. *J. Environ. Qual.*, 33(2), 419-448.
- Schäfer, R. B., Jackson, M., Juvigny-Khenafou, N., Osakpolor, S. E., Posthuma, L., Schneeweiss, A., Spaak, J., & Vinebrooke, R. (2023). Chemical Mixtures and Multiple Stressors: Same but Different? *Environ. Toxicol. Chem.*, 42(9), 1915-1936. <https://doi.org/10.1002/etc.5629>
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V. F., França, S., Vasconcelos, R. P., Bebianno, M. J., & Cabral, H. N. (2012). Application of an integrated biomarker response index (IBR) to

- assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecological Indicators*, 19, 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.08.009>
- Serdar, O., Yildirim, N., & Yildirim, N. C. (2023). Single and combined effects of dimethoate and malathion on oxidative stress biomarkers in the non-target freshwater mussel. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 52(3), 333-342. doi:10.26881/oahs-2023.3.07
- Shen, W., Yang, G., Guo, Q., Lv, L., Liu, L., Wang, X., Lou, B., Wang, Q., & Wang, Y. (2021). Combined toxicity assessment of myclobutanil and thiamethoxam to zebrafish embryos employing multi-endpoints. *Environmental Pollution*, 269, 116116. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116116>
- Sherman, A.D. (1989). Isolation of metabolically distinct synaptosomes on Percoll gradients. *Neurochem. Res.* 14, 97–101.
- Shi, X., Wei, Y., Cui, J., Liu, X., Zhao, F., Zheng, L., Wang, P., & Liu, D. (2024). Toxic Effects of Chlorantraniliprole on Zebrafish (*Danio Rerio*) at Different Developmental Stages Under Antibiotic Pressure. (Preprint) Available at SSRN 4994738. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4994738>
- 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., Noome, D. A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J. P., Whitehorn, P. R., & Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(1), 5-34.
- Simoneau, M. (2007). État de l'écosystème aquatique du bassin versant de la rivière Châteauguay : faits saillants 2001-2004. <https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/bassinversant/bassins/chateauguay/FS-chateauguay.pdf>
- Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst*, 124(11), 1711-1718.
- Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst*, 124(11), 1711-1718. <https://doi.org/10.1039/A905904K>
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., et Blust, R. (2004). Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution*, 129(1), 99-112.

- Sparks, T. C., Watson, G. B., Loso, M. R., Geng, C., Babcock, J. M., & Thomas, J. D. (2013). Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(1), 1-7.
- Stanton, M.G. (1968). Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Anal. Biochem.* 22, 27-34.
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandova, M., Vazzana, I., Zuskova, E., Velisek, J., Matozzo, V., & Faggio, C. (2020). Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Science of The Total Environment*, 700, 134914.
- Stara, A., Pagano, M., Capillo, G., Fabrello, J., Sandova, M., Vazzana, I., Zuskova, E., Velisek, J., Matozzo, V., et Faggio, C. (2020). Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Sci. Total Environ.*, 700, 134914.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134914>
- Statistics Canada. (2022). Table 32-10-0249-01 Land use, Census of Agriculture, 2021, Montérégie, Québec.
- Stehle, S., Ovcharova, V., Wolfram, J., Bub, S., Herrmann, L. Z., Petschick, L. L., & Schulz, R. (2023). Neonicotinoid insecticides in global agricultural surface waters – Exposure, risks and regulatory challenges. *Sci. Total Environ.*, 867, 161383.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161383>
- 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*. *Sci. Total Environ.*, 806, 150920. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150920>
- Szabo, G., Kovacs, L., & Telegdy, G. (1983). A modified screening method for rapid simultaneous determination of dopamine, noradrenaline and serotonin in the same brain region. *Acta Physiol. Hung.* 61, 51–57.
- Séguin, A., Mottier, A., Perron, C., Lebel, J.M., Serpentine, A., & Costil, K. (2017) Sub-lethal effects of a glyphosate-based commercial formulation and adjuvants on juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) exposed for 35 days. *Mar. Pollut. Bull.* 117, 348–358.
- Telahigue, K., Rabeh, I., Hajji, T., Trabelsi, W., Fouzai, C., Nechi, S., Chelbi, E., El Cafsi, M'h., & Soudani, N. (2021). Assessment of the impacts of glyphosate and its commercial formulation Roundup® on the respiratory tree of the sea cucumber *Holothuria forskali* using a multivariate biomarker approach. *Chemosphere*, 269, 129376.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129376>

- Telahigue, K., Rabeh, I., Mhadhbi, L., Nechi, S., Chelbi, E., Ben Ali, M., Hedfi A., AL-Harbi M. S., & Hajji, T. (2022). Glyphosate exposure modulates lipid composition, histo-architecture and oxidative stress status and induces neurotoxicity in the smooth scallop *Flexopecten glaber*. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 184, 105099.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105099>
- Thompson, D. A., Lehmler, H.-J., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Vargo, J. D., Schilling, K. E., LeFevre, G. H. Peeples, T. L., Poch, M. C., LaDuca, L. E., Cwierny, D. M., & Field, R. W. (2020). A critical review on the potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environ.l Sci.: Processes & Impacts*, 22(6), 1315-1346.
<https://doi.org/10.1039/C9EM00586B>
- Tourisme Québec. (2002). *Nature et tourisme: L'écotourisme au Québec en 2002 (Sommaire)*.
<https://bel.uqtr.ca/id/eprint/309/>
- Trégouët, B., & Nirascou, F. (2006). Les pesticides dans les eaux, données 2003 et 2004. Les dossiers IFEN 2006, 5, 1–40. Retrieved from
https://sigessn.brgm.fr/IMG/pdf/ifen_pesticides_2003_2004.pdf
- Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18(3) (1112).
<https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Uddin, M. M., Mely, S. S., & Faruk, A. (2023). Toxicological effects of thiamethoxam on non-target aquatic organisms. *Int J Ecotoxicol Ecobiol*, 8(1), 9-12.
- Uddin, M.H., Ali, M.H., Sumon, K.A., Shahjahan, M., & Rashid, H. (2022). Effects of Pyrethroid Pesticide Cypermethrin on the Gonad and Hemato-biochemical Parameters of Female Gangetic *Mystus* (*Mystus cavasius*). *Aquaculture Studies*, 22, AQUAST819.
<http://doi.org/10.4194/AQUAST819>
- Ukhurebor, K. E., Aigbe, U. O., Onyancha, R. B., & Adetunji, C. O. (2021). Climate Change and Pesticides: Their Consequence on Microorganisms. In C. O. Adetunji, D. G. Panpatte, & Y. K. Jhala (Eds.), *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment: Volume 3* (pp. 83-113). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7459-7_5
- Ulusoy, Ş., Özden, Ö., & Pöpke, O. (2016). Distribution of OCPs and PCBs in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Marmara Sea Coastal Sites. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 97(2), 191-197. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1848-x>

- Umar, A. M., & Aisami, A. (2020). Acetylcholinesterase enzyme (AChE) as a biosensor and biomarker for pesticides: A mini review. *Bull. Environ.l Sci. Sustainable Management* (e-ISSN 2716-5353), 4(1), 7-12.
- Uren Webster, T. M., & Santos, E. M. (2015). Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, 16(1), 32.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1994). Short term methods for estimating chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-91/002. Environmental Monitoring Systems Laboratory, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullos, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64(2), 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Van Der Werf, H. M. G. (1997). Evaluer l'impact des pesticides sur l'environnement. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, 31(31), 5-22. Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01204849>
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Rev.* 33 (3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vaughn, C. C., Nichols, S. J., & Spooner, D. E. (2008). Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *J. North American Benthological Society*, 27(2), 409-423.
- Veedu, S. K., Ayyasamy, G., Tamilselvan, H., & Ramesh, M. (2022). Single and joint toxicity assessment of acetamiprid and thiamethoxam neonicotinoids pesticides on biochemical indices and antioxidant enzyme activities of a freshwater fish *Catla catla*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 257. doi:10.1016/j.cbpc.2022.109336
- Vehovszky, Á., Farkas, A., Csikós, V., Székács, A., Mörtl, M., & Győri, J. (2018). Neonicotinoid insecticides are potential substrates of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the non-target invertebrate, *Dreissena sp.* *Aquat. Toxicol.*, 205, 148-155.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.013>
- Viarengo, A., Ponzanon, E., Dondero, F., & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.

- Virk, A. L., Shakoor, A., Abdullah, A., Chang, S. X., & Cai, Y. (2024). Chapter Four - Pesticide effects on crop physiology, production and soil biological functions. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 187, pp. 171-212). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2024.05.003>
- Wakil, W., Kavallieratos, N. G., Eleftheriadou, N., Sami Ullah, M., Naeem, A., Rasool, K. G., Husain, M., & Aldawood, A. S. (2023). Treatment of Four Stored-Grain Pests with Thiamethoxam plus Chlorantraniliprole: Enhanced Impact on Different Types of Grain Commodities and Surfaces. *Insects*, 14(7), 619. <https://doi.org/10.3390/insects14070619>
- Wang, Y., Zhang, W., Shi, T., Xu, S., Lu, B., Qin, H., & Yu, L. (2020). Synergistic toxicity and physiological impact of thiamethoxam alone or in binary mixtures with three commonly used insecticides on honeybee. *Apidologie*, 51(3), 395-405. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00726-4>
- Waykar, B., & Shinde, S. (2019). A comparative study of changes in protein contents in freshwater bivalves after chronic exposure to cadmium. Paper presented at the National Conference on Challenges in Life Sciences and Agrobased Industries for Rural Development. *Int. J. Life Sci., Spec. Issue A13*, pp.178-182, ref. 29.
- Weisner, O., Frische, T., Liebmann, L., Reemtsma, T., Roß-Nickoll, M., Schäfer, R. B., Schäffer, A., Scholz-Starke, B., Vormeier, P., Knillmann, S., & Liess, M. (2021). Risk from pesticide mixtures – The gap between risk assessment and reality. *Sci. Total Environ.*, 796, 149017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149017>
- Weiss, B., Amler, S., & Amler, R. W. (2004). Pesticides. *Pediatrics*, 113(Supplement 3), 1030-1036. Retrieved from https://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/113/Supplement_3/1030.full.pdf
- WHO. (1993). International Programme on Chemical Safety Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. World health organization. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>
- Wided, O., Abdelhafidh, K., Ali, M., & Touaylia, S. (2021). Protective role of *Spirulina platensis* against glyphosate induced toxicity in marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Environ. Sci. Health C*, 39 (4), 373-387.
- Wills, E. D. (1987). Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Bioch. Toxicol.: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp. 127–150.
- Wilmot, L. L. L. M. (2023). Déclaration sur les droits autochtones pour un avenir écologique et équitable. *Vecteur Environnement*, 56(4), 14-15. Retrieved from

- <https://www.proquest.com/scholarly-journals/déclaration-sur-les-droits-autochtones-pour-un/docview/2904282048/se-2>
- Woff, R., & Klemish, H. (1991). Adaptation of an enzymatic fluorescence assay for L-glutamic acid decarboxylase. *Anal. Biochem.* 192, 78–81.
- 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*). *Environ. Pollut.*, 235, 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.120>
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., & Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.010>
- Yancheva, V., Georgieva, E., Velcheva, I., Iliev, I., Stoyanova, S., Vasileva, T., Bivolarski, V., Todorova-Bambaldokova, D., Zulkipli, N., & Antal, L. (2022). Assessment of the exposure of two pesticides on common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758): Are the prolonged biomarker responses adaptive or destructive? *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 261, 109446.
- Yang, J., Guo, C., Luo, Y., Fan, J., Wang, W., Yin, X., & Xu, J. (2023a). Effect of thiamethoxam on the behavioral profile alteration and toxicity of adult zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Science of The Total Environment*, 858, 159883. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159883>
- Yang, Y., Zhang, C., Wang, X., Yu, Q., He, L., Cai, X., Li, E., Qin, C., Qin, J., & Chen, L. (2023b). Adverse effects of thiamethoxam on the behavior, biochemical responses, hepatopancreas health, transcriptome and intestinal flora of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Chemosphere*, 340, 139853. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139853>
- Ye, W., Dai, M., Bian, D., Zhu, Q., Li, X., Sun, H., Li, F., Wei, J., & Li, B. (2023). Sublethal chlorantraniliprole exposure induces autophagy and apoptosis through disrupting calcium homeostasis in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 32(1), 36–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/imb.12811>
- Yoloğlu, E., Uçkun, M., Alkan Uçkun, A., & Barım Öz, Ö. (2024). Biochemical responses of crayfish exposed to imidacloprid: assessment of oxidative stress, osmoregulatory response and neurotoxicity. *Chemistry and Ecology*, 41(1), 50–68. <https://doi.org/10.1080/02757540.2024.2402294>
- Zhang, J.-G., Shi, W., Ma, D.-D., Lu, Z.-J., Li, S.-Y., Long, X.-B., & Ying, G.-G. (2023). Chronic Paternal/Maternal Exposure to Environmental Concentrations of Imidacloprid and

- Thiamethoxam Causes Intergenerational Toxicity in Zebrafish Offspring. *Environ. Sci. & Technol.*, 57(36), 13384-13396. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04371>
- Zhang, L., Chen, C., Li, X., Sun, S., Liu, J., Wan, M., Huang, L., Yang, D., Huang, B., Zhong, Z., Liu, F., Liao, X., Xiong, G., Lu, H., Chen, J., & Cao, Z. (2022). Exposure to pyrazosulfuron-ethyl induces immunotoxicity and behavioral abnormalities in zebrafish embryos. *Fish and Shellfish Immunology*, 131, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.063>
- Zhao, G.-P., Yang, F.-W., Li, J.-W., Xing, H.-Z., Ren, F.-Z., Pang, G.-F., & Li, Y.-X. (2020). Toxicities of Neonicotinoid-Containing Pesticide Mixtures on Nontarget Organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 39(10), 1884-1893. <https://doi.org/10.1002/etc.4842>
- Zhou, W., Li, M., & Achal, V. (2025). A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. *Emerging Contaminants*, 11(1), 100410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100410>
- Zhu, L., Li, W., Zha, J., Li, N., & Wang, Z. (2019). Chronic thiamethoxam exposure impairs the HPG and HPT axes in adult Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Docking study, hormone levels, histology, and transcriptional responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, 185, 109683. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109683>
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 12(5), e0176837.