



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
جامعة سكيكدة



Université de Skikda
Faculté des sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie
Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
(LMD)
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Toxicologie environnementale

Thème :

*Evaluation des effets secondaires d'un pesticide néonicotinoïde sur
un poisson d'eau douce, *Alburnus alburnus**

Présentée et soutenue

Le 10 juin 2025

Par

AGAGUENA Rania

Jury d'évaluation :

Président : Pr. MEZEDJRI Lyamine (Professeur, Université de Skikda)

Directrice de thèse : Pr. ZAIDI Nedjoudja (Professeur, Université de Skikda)

Examinatrice : Dr. AMIRA Akila (MCA, Université d'El Tarf)

Examineur : Dr. MEZIRI Fayçal (MCA, ENSET de Skikda)

Examineur : Dr. BOUHAYENE Salah (MCA, Université de Skikda)

Co-directrice de thèse : Pr. HAMDANI Amel (Professeur, Université de Annaba)

Année universitaire : 2024 - 2025

Remerciements

Avant tout, louange et gratitude à Dieu, pour m'avoir accordé la réussite au concours doctoral et m'avoir donné la force, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail scientifique.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury, pour avoir accepté de juger ce travail et pour le temps qu'ils ont consacré à sa lecture et son évaluation.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur MEZEDJRI Lyamine (Université de Skikda), président du jury, pour l'honneur qu'il me fait par sa présence.

Je remercie également Madame la Docteure AMIRA Akila (Maître de conférences A, Université d'El Tarf), Monsieur le Docteur MEZIRI Fayçal (Maître de conférences A, ENSET de Skikda), ainsi que Monsieur le Docteur BOUHAYENE Salah (Maître de conférences A, Université de Skikda), pour leur participation et leurs remarques constructives.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Professeure ZAIDI Nedjoudja (Université 20 Août 1955 – Skikda), ainsi qu'à ma co-directrice, Professeure HAMDANI Amel (Université de Annaba), pour leur encadrement, leur rigueur scientifique, leur accompagnement et leurs précieux conseils tout au long de cette recherche.

Je remercie du fond du cœur mes parents, pour leur soutien indéfectible depuis mes débuts académiques. Une pensée toute particulière à mon père, qui a joué un rôle fondamental, tant sur le plan moral que financier. Sans lui, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

Je tiens également à remercier Docteure AGAGUENA Amel (Université de Batna 1) pour son aide précieuse et sa disponibilité.

Mes remerciements les plus sincères vont à Professeure Elvira Brunelli (Université de Calabre, Italie), qui m'a chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire de zoomorphologie et écotoxicologie animale, et m'a offert l'opportunité d'y effectuer un stage appliqué, indispensable à l'achèvement de ce travail. Je remercie également les membres du laboratoire : Dr Rachele Macirella, Dr Vittoria Curcio et Dr AbdalMoiz Ahmed pour leur accueil, leur aide et leur bienveillance.

Je remercie aussi chaleureusement mes amies Melle HERMOUCH Abir et Melle TALBI Faiza pour leur soutien et leur aide précieuse tout au long de ce parcours. Je leur souhaite à mon tour une pleine réussite dans leurs projets académiques et personnels.

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, et que je n'ai pas pu citer nommément.

Mme AGAGUENA Rania

Sommaire

Sommaire

Titre	Page
1 Introduction	1
2 Matériel et méthodes	9
2.1 Matériel biologique	9
2.1.1 Morphologie externe d'A. alburnus	9
2.1.2 Anatomie générale d'un poisson d'eau douce :	10
2.1.3 Répartition géographique	12
2.1.4 Habitat	14
2.1.5 Régime alimentaire	16
2.1.6 Cycle biologique	16
2.2 Choix de l'espèce pour l'étude toxicologique	17
2.3 Technique d'élevage	17
2.3.1 Localisation et présentation du site d'élevage	17
2.3.2 Elevage des poissons	17
2.4 Présentation de l'insecticide	18
2.5.1 Toxicité aiguë de l'acétamipride	19
2.5.2 Analyse des résidus de l'acétamipride	20
2.5.3 Toxicité sublétales	21
2.5.4 Analyse histopathologique	22
2.5.5 Analyse moléculaire : analyse quantitative de la réaction en chaîne polymérase par transcription inverse (RT-qPCR)	26
3 Résultats	30
3.1.1 Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 24 heures d'exposition	30
3.1.2 Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 48 heures d'exposition	32
3.1.3 Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 72 heures d'exposition	34
3.1.4 Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 96 heures d'exposition	36
3.2 Détermination de résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage des poissons	38
3.3 Effets histologiques de l'acétamipride dans les organes des alevins d'Alburnus alburnus	41
3.3.1 Changements histologiques des branchies	41
3.3.2 Changements histologiques de foie	54

3.3.3 Changements histologiques des intestins	64
3.4 Effet moléculaires de l'acétamipride sur les organes des alevins d'alburnus alburnus	74
3.4.1 Effet sur l'expression du gène de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les branchies	74
3.4.2 Effet sur l'expression du gène de la SOD1 dans le foie	76
3.4.3 Effet sur l'expression du gène de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les intestines	77
4 Discussion	80
4.1 Toxicité aigue l'acétamipride chez A. Alburnus	80
4.2 Résidus de l'acétamipride l'eau d'élevage	81
4.3 Effet de l'acétamipride sur l'histologie des organes	83
- Effet de l'acétamipride sur l'histologie des branchies	83
- Effet de l'acétamipride sur l'histologie du foie	85
4.4 Effet de l'acétamipride sur l'expression génétique des organes	88
5 Conclusion et perspectives	94
Résumé	98
Abstract	99
Références	102
Valorisation scientifique	135

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Morphologie externe d' <i>A. alburnus</i>	9
02	Anatomie d'un poisson	12
03	Aire de répartition géographique d' <i>Alburnus alburnus</i>	13
04	Aire de répartition d' <i>A. alburnus</i> , espèce aliène en Algérie	14
05	Site ou premier élevage Ichmoul-BATNA-(Photo personnelle, 2023).	17
06	Structure chimique d'Acétamipride	18
07	Essai de la toxicité sublétales d'Acétamipride chez <i>A. alburnus</i> au laboratoire	22
08	Dissection d' <i>A. alburnus</i> (photo personnelle, 2023)	23
09	Etude histopathologique	25
10	Etude moléculaire	28
11	Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> en fonction de la concentration d'acétamipride après 24 heures d'exposition	31
12	Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins en fonction des logarithmes décimaux des doses après 24 heures de traitement avec l'Acétamipride	31
13	Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> en fonction de la concentration d'acétamipride après 48 heures d'exposition	33
14	Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins en fonction des logarithmes décimaux des doses après 48 heures de traitement avec l'Acétamipride	33
15	Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> en fonction de la concentration d'acétamipride après 72 heures d'exposition	35
16	Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins en fonction des logarithmes décimaux des doses après 72 heures de traitement avec l'Acétamipride	35
17	Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> en fonction de la concentration d'acétamipride après 96 heures d'exposition.	37
18	Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins en fonction des logarithmes décimaux des doses après 96 heures de traitement avec l'Acétamipride.	37
19	Chromatogrammes HPLC des extraits d'eau d'élevage après 96 heures d'exposition.	40
20	Micrographies des branchies des juvéniles d' <i>Alburnus alburnus</i> témoin(1)	42
21	Micrographies des branchies des juvéniles d' <i>Alburnus alburnus</i> témoin (2)	43
22	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (1)	45
23	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (2)	45

Liste des figures

24	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(3).	46
25	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(4).	47
26	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(5).	48
27	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (1).	49
28	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(2).	52
29	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (3).	51
30	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(4).	52
31	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(5).	53
32	Micrographies des branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (6).	54
33	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> dans le groupe témoin (1).	55
34	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> dans le groupe témoin (2).	56
35	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(1).	57
36	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(2).	58
37	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (3).	59
38	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride.	60
39	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride (1).	61
40	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride(2).	62
41	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride(3).	63
42	Micrographies du foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride(4).	64
43	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> dans le groupe témoin(1).	65
44	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> dans le groupe témoin(2).	66
45	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(1).	67
46	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(2).	68
47	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (3).	69

48	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(1).	70
49	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (2).	71
50	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (3).	72
51	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(4).	73
52	Micrographies des intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (5).	74
53	Expression génique (moyenne ± SD) dans les branchies d' <i>Alburnus alburnus</i> après exposition à différentes concentrations d'acétamipride (n = 4).	75
54	Expression des gènes (moyenne ± SD) dans le foie d' <i>Alburnus alburnus</i> après exposition à différentes concentrations d'acétamipride (n = 4).	76
55	Expression des gènes (moyenne ± SD) dans les intestins d' <i>Alburnus alburnus</i> après exposition à différentes concentrations d'acétamipride (n = 4).	78

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Position systématique d' <i>A.alburnus</i>	10
2	Fiche technique du l'Acetamipride TIMRID 20 % SP	19
3	Conditions opératoire d'analyse de résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage d' <i>Alburnus alburnus</i> .	21
4	Déshydratation d'échantillons et l'inclusion	24
5	Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 24 heures d'exposition.	30
6	Estimation de la CL ₅₀ à partir de la droite de régression chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 24 heures d'exposition à l'acétamipride	32
7	Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 48 heures d'exposition.	32
8	Estimation de la CL ₅₀ à partir de la droite de régression chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 48 heures d'exposition à l'acétamipride.	34
9	Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 72 heures d'exposition.	34
10	Estimation de la CL ₅₀ à partir de la droite de régression chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 72 heures d'exposition à l'acétamipride.	36
11	Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 96 heures d'exposition.	36
12	Estimation de la CL ₅₀ à partir de la droite de régression chez les alevins d' <i>A. alburnus</i> après 96 heures d'exposition à l'acétamipride.	38
13	Classes de toxicité des néonicotinoïdes chez les poissons (Échelle de Fishel 2005)	38
14	Temps de rétention de l'acétamipride	39
15	Concentrations d'acétamipride obtenus par HPLC/MS après 96 heures traitement	41
16	Comparaisons multiples de Tukey de l'expression de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase dans les branchies des alevins après 96 h exposition à l'acétamipride.	75
17	Comparaisons multiples de Tukey de l'expression de SOD1 dans le foie des alevins après 96 h exposition à l'acétamipride.	77
18	Comparaisons multiples de Tukey de l'expression de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase dans les intestins des alevins après 96 h exposition à l'acétamipride.	78

Introduction

1. Introduction

Les activités humaines, qu'elles soient industrielles ou agricoles, les taux de croissance démographique élevés, ainsi que les facteurs économiques et technologiques, ont eu un impact négatif sur les écosystèmes aquatiques en introduisant de nombreuses substances toxiques. Celles-ci peuvent affecter l'environnement, nuire à la santé humaine et perturber les écosystèmes aquatiques, ce qui peut entraîner la disparition d'espèces et le déséquilibre de la chaîne trophique (Wang *et al.*, 2022 ; Kumar et Sarower, 2024). En effet, la pollution de l'eau provient de multiples sources, tant naturelles qu'anthropiques. Les sources naturelles sont essentiellement liées à la décomposition de la végétation et des carcasses animales. Les sources anthropiques, quant à elles, regroupent plusieurs types de rejets. Parmi eux, on retrouve les rejets domestiques, tels que les fosses d'aisance, les eaux usées, les eaux grasses, ainsi que l'accumulation de déchets transportés par les eaux pluviales. À cela s'ajoutent les activités industrielles, qui représentent une menace majeure en raison de la prolifération d'installations non contrôlées, à l'origine de rejets de métaux lourds comme le plomb, le mercure et le cadmium. Enfin, les activités agricoles constituent également une source importante de pollution, à la fois d'origine bactériologique, en lien avec la présence de bétail, et d'origine chimique, liée à l'utilisation d'engrais et de pesticides persistants (Hébert et Légaré, 2000 ; Delolme *et al.*, 1992).

L'intensification et la modernisation de l'agriculture ont abouti à une utilisation massive des pesticides afin d'obtenir un résultat rapide, avec un maximum d'efficacité. De plus, quelque 20 000 produits phytosanitaires, y compris les pesticides, sont actuellement en usage à l'échelle mondiale, totalisant une consommation annuelle de plus de 4 millions de tonnes d'ingrédients actifs (Maggi *et al.*, 2019 ; FAOSTAT, 2019). L'utilisation massive et incontrôlée de pesticides, motivé par la nécessité de sécuriser les rendements agricoles face à une population en croissance, constitue une menace pour la santé humaine (Soudani *et al.*, 2020 ; Thany *et al.*, 2013 ; Sabrina *et al.*, 2012) et l'environnement (Crenna *et al.*, 2017 ; Rosell *et al.*, 2008 ; Collier *et al.*, 2016). En effet, il est très difficile d'évaluer les effets secondaires des pesticides sur les écosystèmes, en raison de la grande diversité des substances employées. On recense en effet des milliers de familles de pesticides, représentant des dizaines de milliers de composés différents. Leur impact varie selon leur mode d'action, leur persistance dans les sols et les milieux aquatiques, ainsi que la toxicité de leurs produits de dégradation, qui peuvent parfois être plus nocifs et plus persistants que la molécule d'origine. (Conlong et Mugoya, 1996).

Sur le plan international, les pesticides sont classifiés en diverses catégories en fonction de leur cible. Ces catégories comprennent les herbicides, insecticides, fongicides, rodenticides, molluscicides, nématocides ainsi que les régulateurs de croissance végétale. L'emploi non régulé des pesticides a des effets catastrophiques sur l'environnement. L'usage excessif des pesticides soulève de sérieuses préoccupations concernant la santé des humains et la préservation de la biodiversité (Agrawal *et al.*, 2010). En effet, les résidus de pesticides, tels que l'atrazine et les néonicotinoïdes, ont un impact délétère sur la biodiversité, tant terrestre qu'aquatique (Hayes *et al.*, 2002 ; Di Prisco *et al.*, 2013).

Les néonicotinoïdes développés dans les années 1980, ont émergé comme une nouvelle génération d'insecticides pour remplacer les composés toxiques et persistants tels que les organophosphorés et les carbamates (Simon-Delso *et al.*, 2015 ; Tomizawa et Casida, 2005 ; Cossi *et al.*, 2020). De par leur structure chimique distincte, ils constituent une classe d'insecticides systémiques largement utilisée à l'échelle mondiale, et sont optimisés pour cibler les récepteurs post-synaptiques de l'acétylcholine (ACh) dans le système nerveux des insectes (Jeschke *et al.*, 2011 ; Casida et Durkin 2013 ; Tomizawa et Casida, 2003). Leur action sur les récepteurs nicotiques (nAChR) induit une excitation neuronale anormale, des spasmes, une paralysie et la mort chez les insectes (Yamamoto et Casida, 1999 ; Tian *et al.*, 2020). Bien que leur efficacité contre les insectes soit avérée, les néonicotinoïdes suscitent des préoccupations environnementales, notamment concernant leur impact sur les organismes non ciblés, tels que les abeilles. En effet, des cas d'intoxication massive ont été rapportés, comme en Allemagne en 2008, lors de traitements des semis de maïs (Pistorius *et al.*, 2010). Ces événements ont conduit à des restrictions sur l'utilisation de certains néonicotinoïdes en Europe en 2013 (Fairbrother *et al.*, 2014). De plus, des études récentes mettent en évidence leur présence dans les systèmes aquatiques, souvent en combinaison avec d'autres substances toxiques, exacerbant leur impact environnemental (Morrissey *et al.*, 2015 ; Rohonczy *et al.*, 2020).

Les effets des néonicotinoïdes sur la faune aquatique et terrestre varient selon plusieurs facteurs, notamment la structure chimique, la voie d'exposition et la durée de celle-ci (Harding et Burbidge, 2013 ; McClure *et al.*, 2020), soulevant ainsi de nouvelles inquiétudes quant à leurs modes d'action non caractérisés sur les organismes non ciblés (Wei *et al.*, 2020). En algérie, quatre substances actives appartenant aux néonicotinoïdes : l'Imidaclopride, le Thiaclopride, le Thiaméthoxame et l'Acétamipride figurent dans l'index phytosanitaire de 2015 (DPVCT., 2015). Ces dernières font partie des 50 formulations commerciales d'insecticides identifiées (Bettiche *et al.*, 2020). Ces insecticides (NEOs) représentent des effets délétères

pour les pollinisateurs (Bettiche *et al.*, 2023 ; Benchaabane *et al.*, 2022), les mollusques (Aït Hamlet, 2019) et les poissons (Cheghib *et al.*, 2020).

L'acétamipride est un insecticide appartenant à la classe des néonicotinoïdes, développé par Nippon Soda Co. en 1989 suite à des recherches sur les dérivés du nitrométhylène. Il a été enregistré pour la première fois au Japon en 1995. Cet insecticide est utilisé mondialement en agriculture en raison de son large spectre d'efficacité, de son action systémique et translaminaire, qui il'sont essentiels pour la protection des cultures contre divers insectes nuisibles tels que les pucerons, qui causent des dommages importants aux plantes. Cependant, l'utilisation intensive de l'acétamipride a soulevé des préoccupations en raison de ses effets potentiels sur des organismes non ciblés. Des études ont démontré son impact sur les abeilles (Capela *et al.*, 2022), les bivalves (Mishchuk et Stoliar., 2008), les oiseaux (Humann-Guillemint *et al.*, 2019) et les gastéropodes (Cossi *et al.*, 2020), mettant en évidence les risques écologiques associés à son utilisation .

En Algérie, l'acétamipride est largement utilisé par les agriculteurs en raison de son coût relativement bas, de son efficacité et de sa disponibilité sur le marché (Rahmoune *et al.*, 2018). Cependant, les recherches sur ses impacts sur les espèces non ciblées et l'environnement local restent insuffisantes. Des études de laboratoire ont révélé sa toxicité pour certaines espèces de vers de terre, affectant leurs cellules épidermiques et intestinales, et induisant des changements morphologiques et comportementaux (Berrouk *et al.*, 2021; El Hadeff El Okki *et al.*, 2022). Chez les mammifères tels que les rats et les souris, l'exposition à l'acétamipride a été associée à des altérations neuronales, des changements dans les taux de neurotransmetteurs, et des dommages histopathologiques aux poumons et au foie (Gasmi *et al.*, 2019; Saadi *et al.*, 2019). Sa grande solubilité dans l'eau et sa stabilité environnementale font que l'acétamipride peut se retrouver dans les eaux de surface à des concentrations variant de 2 ng/L à 410 µg/L (Veedu *et al.*, 2022 ; Zoumenou *et al.*, 2019 ; Mutshekwa *et al.*, 2023),entraînant une accumulation potentielle et des effets néfastes sur la faune aquatique. Des études ont signalé des modifications de comportement et des altérations physiologiques chez des espèces aquatiques telles que *Caridina nilotica* et *Oreochromis mossambicus*, affectant notamment la teneur en protéines et en glucides de leurs tissus (Guner, 2013 ; Raj et Joseph, 2015 ; Veedu *et al.* , 2022). La présence continue de l'acétamipride dans l'environnement et son accumulation soulèvent des inquiétudes quant à sa toxicité à long terme, nécessitant une surveillance et une régulation accrues pour protéger à la fois l'agriculture et la biodiversité.

Les écosystèmes aquatiques subissent les effets de la pollution anthropique, émanant de sources variées telles que les ruissellements urbains, les émissions hospitalières, ainsi que les

rejets agricoles et industriels (Zhu *et al.*, 2017 ; Shao *et al.*, 2018; Karkman *et al.*, 2018). La biosurveillance des eaux douces est une pratique essentielle en écologie appliquée, destinée à évaluer l'impact des polluants chimiques sur les écosystèmes aquatiques.

Les programmes de biosurveillance, déployés à l'échelle nationale et internationale, sont cruciaux pour identifier et quantifier les risques associés à ces contaminants. Ces programmes sont souvent définis comme l'utilisation systématique d'organismes vivants, ou de leurs réactions biologiques, afin de déterminer l'état de l'environnement et ses variations (Yang *et al.*, 2008; Al-Alam, 2017). Ces initiatives reposent sur deux principales méthodologies l'emploi de bioindicateurs et de biomarqueurs. Les bioindicateurs sont des organismes ou des communautés d'organismes dont les réponses variées (biochimiques, génétiques, enzymatiques, physiologiques, morphologiques, comportementales, structurelles et/ou fonctionnelles) indiquent la présence et les effets des polluants dans leur habitat (IPCS, 2004 ; Fränze, 2006). Les poissons sont souvent utilisés comme bioindicateurs en raison de leur grande sensibilité aux modifications environnementales, qu'elles soient d'origine biotique ou abiotique. Leur capacité à refléter ces changements en fait des outils précieux pour détecter de manière précoce les signes de dégradation ou de réhabilitation des milieux aquatiques (Figueira *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010).

Les poissons contribuent à la régulation des réseaux alimentaires, des cycles des nutriments et de la production de biomasse, et jouent un rôle essentiel dans le maintien des performances et de la stabilité des écosystèmes (Su *et al.*, 2021 ; Macirella *et al.*, 2023). Les particules biologiques dissoutes dans l'eau pénètrent souvent dans les poissons par leurs branchies ou par ingestion directe (Afshan *et al.*, 2014 de Macirella et Brunelli., 2017)elles sont donc considérées comme des indicateurs essentiels pour détecter la présence de polluants dissous en raison de leur sensibilité. (Kiki *et al.*, 2020 ; Loczynska *et al.*, 2018 ; Maserella et Brunelli, 2017). L'utilisation des poissons comme bioindicateurs dans les études de biosurveillance permet d'évaluer efficacement la santé des cours d'eau et de surveiller l'impact des activités humaines sur ces écosystèmes. Leur réaction aux perturbations offre une compréhension globale de l'état écologique des habitats aquatiques, ce qui est fondamental pour la gestion environnementale et la prise de décisions éclairées concernant la conservation et la restauration des milieux naturels (Viarengo *et al.*, 2007; Carreira *et al.*, 2013).

L'ablette, *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758), est une petite espèce de poisson appartenant à la famille des cyprinidés, largement répandue en Europe et en Asie, connue pour sa répartition étendue et sa facilité d'adaptation à divers environnements aquatiques (Pérez-Bote *et al.*, 2004; Sousa-Santos *et al.*, 2018). Depuis le début du XXI^e siècle, cette espèce a été introduite dans

d'autres régions d'Europe ainsi qu'en Afrique du Nord, notamment en tant qu'espèce fourragère pour soutenir des populations de poissons gibier plus grandes. L'introduction accidentelle de l'ablette en Algérie a été documentée en 2006, où des spécimens accompagnant des cargaisons de carpes provenant de Hongrie ont été identifiés dans le réservoir de Hamiz, à l'est d'Alger (Attou et Arabe, 2013). Toutefois, des rapports antérieurs (2003) indiquent sa présence dans la rivière Kebir à Oum Toub, dans la province de Skikda, suggérant une introduction plus précoce ou non documentée (Tandjir et Djebar, 2010).

L'ablette est particulièrement sensible à la pollution, ce qui en fait un bioindicateur potentiel dans les études environnementales. Les effets toxiques de divers polluants sur cette espèce ont été largement étudiés, indiquant que l'ablette peut réagir de manière significative aux changements dans la qualité de l'eau (Duran *et al.*, 2003 ; Jovanović Marić *et al.*, 2020 ; Ionescu *et al.*, 2016). Dès 1979, des recherches telles que celles menées par Linden et al ont commencé à explorer l'utilisation de l'ablette dans des contextes toxicologiques pour évaluer l'impact des polluants aquatiques. En raison de son rôle dans les chaînes alimentaires aquatiques et de sa sensibilité aux changements environnementaux, l'ablette est devenue un sujet d'étude important pour les écologistes et les gestionnaires des ressources aquatiques, nécessitant des stratégies de gestion et de conservation adaptées pour protéger cette espèce face aux menaces anthropiques et environnementales.

Les biomarqueurs, définis comme des indicateurs moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux observables et quantifiables (Martínez-Morcillo *et al.*, 2020), sont devenus des outils complémentaires indispensables pour évaluer la qualité des environnements et la santé des organismes. Ils permettent la détection directe des effets toxiques, indiquant ainsi une exposition à des polluants, qu'elle soit récente ou ancienne. Ces marqueurs sont également reconnus pour leur capacité à identifier précocement les signes de dégradation environnementale (Amiard, 2017 ; Ferrat, 2011). Les biomarqueurs biochimiques et cellulaires, qu'ils soient spécifiques ou non spécifiques, ont été largement étudiés chez divers organismes bioindicateurs. Ces études ont exploré des biomarqueurs associés à la neurotoxicité (Guo *et al.*, 2021), au stress oxydatif (Vodiasova *et al.*, 2021), à la génotoxicité (Klingelfus *et al.*, 2017; Delmond *et al.*, 2019), ainsi qu'à des altérations morphologiques ou histopathologiques (Simonato *et al.*, 2016) et à la reprotoxicité (Gallo et Tosti, 2020; Xu *et al.*, 2022).

Les biomarqueurs associés à la génotoxicité et aux altérations morphologiques ou histopathologiques jouent un rôle essentiel dans l'évaluation des effets des agents toxiques sur l'organisme. La génotoxicité fait référence aux dommages causés à l'ADN, qui peuvent

conduire à des mutations et à la carcinogénèse, tandis que les altérations morphologiques ou histopathologiques révèlent les changements structurels dans les tissus, souvent indicateurs d'une perturbation fonctionnelle. L'expression des gènes spécifiques, tels que NAK ATPase et SOD1, permet de mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents aux réponses toxiques. Le gène NAK ATPase, qui encode une enzyme impliquée dans le maintien de l'homéostasie ionique, est souvent affecté par le stress cellulaire, tandis que SOD1 (superoxyde dismutase 1) est crucial pour la défense antioxydante contre les radicaux libres. Une altération de leur expression peut indiquer un stress oxydatif et une perturbation du métabolisme cellulaire, signes souvent associés à la toxicité environnementale et industrielle (Chauhan *et al.*, 2014; Shiloh et Ziv, 2013). Ces biomarqueurs sont ainsi précieux pour détecter les effets sublétaux des contaminants, permettant une intervention précoce dans les pathologies induites par les agents génotoxiques.

Selon les évaluations réalisées par l'EFSA (2016) et l'EPA (2002) sur les risques que présente l'acétamipride pour la faune aquatique, les insectes aquatiques sont considérés comme les plus sensibles. À l'inverse, les poissons sont considérés comme présentant un faible risque, notamment en raison de leur faible potentiel de bioaccumulation. Néanmoins, de nombreuses recherches plus récentes ont révélé des effets toxiques significatifs de cette substance chez les poissons, remettant ainsi en questions cette évaluation initiale (Malhotra *et al.*, 2021, Azadikhah *et al.*, 2023, Veedu *et al.*, 2022).

L'objectif de cette étude, qui fait partie du projet P.R.F.U « Valorisation des substances naturelles et biosurveillance de l'environnement » du Laboratoire de l'Optimisation de la Production Agricole et de l'Arboriculture Fruitière en Zone Subhumide (LOPAZS), est d'évaluer pour la première fois l'impact de l'acétamipride, un insecticide néonicotinoïde, sur les juvéniles d'un poisson d'eau douce non cible, *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758). La structure de la présentation des résultats est organisée en quatre parties principales :

- **Détermination de la toxicité aiguë de l'acétamipride**

La première partie vise à déterminer les concentrations létales (CL50 après 24, 48, 72 et 96 heures) de l'acétamipride sur les jeunes poissons d'eau douce, *Alburnus alburnus*, et d'identifier la relation dose-effet entre la concentration de pesticide et la mortalité, ce qui nous permet de classer ce pesticide en fonction de sa toxicité pour ces poissons.

- **Analyse de résidus d'acétamipride**

Cette section traite de l'examen des résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage d'*Alburnus alburnus* suite à 96 heures d'exposition à cet insecticide, en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS). Cette section vise à fournir une vue d'ensemble sur la biodégradation de ce pesticide dans l'eau et sa capacité de bioaccumuler chez les alevins de cette espèce, ce qui peut entraîner des effets néfastes.

- **Etude de l'effet histopathologique**

Cette section examine les impacts de l'exposition aiguë à l'acétamipride après 96 heures d'exposition. Cette recherche se concentre sur deux concentrations environnementales de cet insecticide (150 et 300 µg/L), déjà définies dans des publications antérieures. Les examens histologiques sont réalisés sur les tissus branchiaux, hépatiques et intestinaux des alevins d'*Alburnus alburnus*.

- **Etude de l'effet moléculaire**

La dernière section vise à identifier les modifications moléculaires provoquées par l'acétamipride à des concentrations environnementales (150 et 300 µg/L). Pour cela, nous avons procédé à l'analyse quantitative de la réaction en chaîne par polymérase par transcription inverse (RT-qPCR) afin de mesurer l'expression des gènes d'enzymes de sodium-potassium NaK ATPase dans les branchies et intestins, et superoxyde dismutase 1 (SOD 1) dans le foie des alevins d'*Alburnus alburnus* suite à une exposition de 96 heures.

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Morphologie externe d'*A. alburnus*

Les espèces du genre *Alburnus* sont communément appelées « bleaks » ou Ablette (Buj *et al.*, 2010), qui provient de l'ancien mot anglais « bleke », signifiant « pâle ». Son nom latin *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) fait référence à la couleur blanche (albus) et brillante des écailles qui donnent à l'ablette des reflets métalliques (Dunbar, 2005). Dans le passé, les écailles d'*A. alburnus* étaient utilisées pour produire l'« Essence d'Orient », un enrobage appliqué sur les perles artificielles (Latorre *et al.*, 2023).

A. alburnus possède un corps fusiforme, comprimé latéralement. La taille maximale de cette espèce peut atteindre une longueur totale de 250 mm et un poids de 60 g, avec une longueur moyenne de 150 mm (Billard, 1997). Le corps de l'espèce est généralement vert ou bleu, avec des flancs argentés, tandis que les nageoires sont de couleur jaune (Keith et Allardi, 2001). Il n'existe pas de dimorphisme sexuel observable chez cette espèce (Interesova et Chakimov, 2015). Toutefois, des études menées dans le bassin de l'Ob (Sibérie) ont révélé la présence de bases de nageoires anales et ventrales distinctes, avec des rayons de la nageoire anale significativement plus longs (Interesova et Chakimov, 2015).

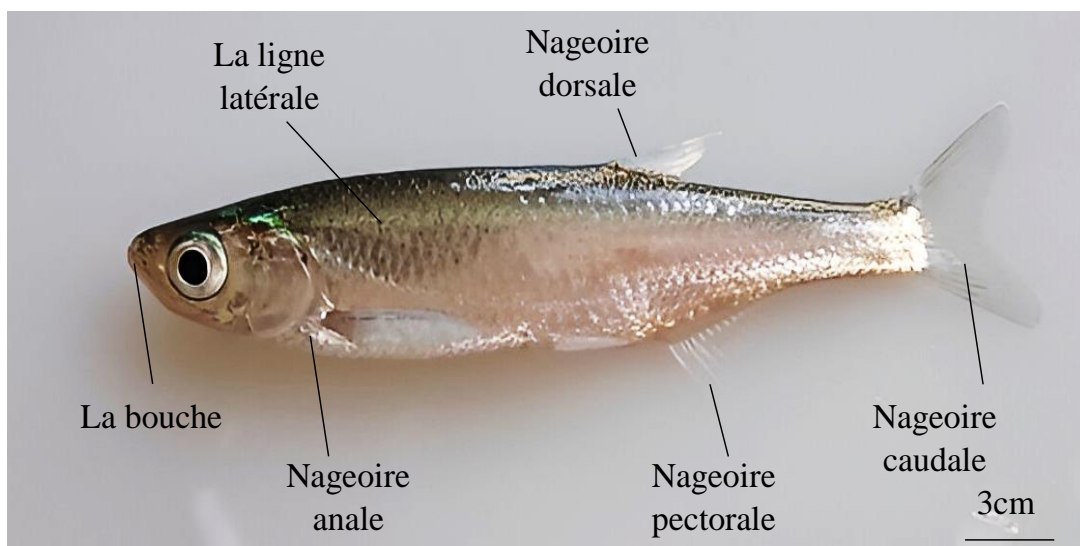


Figure 1 : morphologie externe d'*A. alburnus* (photo personnelle, 2023)

Tableau 1. Position systématique d'*A.alburnus* source :

(https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/67111/tab/taxo)

Domaine :	Biota Endl.(D.Don)
Règne :	Animalia (Linnaeus, 1758)
Sous-Règne :	Eumetazoa (Bütschli, 1910)
Infra-Règne :	Deuterostomia (Karl Grobben, 1908)
Phylum :	Chordata (Haeckel, 1874)
Sous-Phylum :	Craniata (Janvier, 1981)
Infra-Phylum :	Vertebrata (Linnaeus, 1758)
Super-Classe :	Gnathostomata (Gegenbaur, 1874)
Classe :	Actinopterygii (Klein, 1885)
Sous-Classe :	Neopterygii (Regan, 1923)
Infra-Classe :	Teleostei
ordre :	Cypriniformes
Sous-Ordre :	Cyprinoidei
Famille :	Leuciscidae (Bonaparte, 1835)
Sous-Famille :	Leuciscinae (Bonaparte, 1835)
Genre :	Alburnus (Rafinesque, 1820)
Espèce :	<i>Alburnus alburnus</i> (Linnaeus, 1758)

2.1.2. Anatomie générale d'un poisson d'eau douce :

En général, les organes majeurs chez les poissons sont : Le cœur se trouve sous les mâchoires, qui elles-mêmes sont situées en dessous des ouïes (Huss, 1988). Les gonades, qu'il s'agisse de testicules ou d'ovaires en fonction du sexe, sont des organes de forme allongée qui établissent une connexion avec l'extérieur par le biais du pore génital situé à proximité de l'anus (Davies *et al.*, 1986), qui est en réalité une papille réunissant les orifices urinaire, génital et anal (Daget, 1967). Les poissons disposent de deux reins asymétriques : un rein pronéphrique situé en amont, derrière la tête, et un rein métanéphrique placé au milieu, à la face ventrale de la colonne vertébrale (kobayashi *et al.*, 2008). La vessie natatoire, qui est un sac rempli de gaz composé d'un mélange d'oxygène, d'azote et de dioxyde de carbone en proportions variables, cette poche donne au poisson la capacité de nager en surface (Blanchard, 1966). Chez les cyprinides, l'estomac est absent (Prysiashniuk *et al.*, 2019).

Les organes concernés par cette recherche incluent les branchies, le foie et les intestins ont été décrits ci-dessus :

a. Les branchies :

Les branchies, qui sont un trait distinctif des poissons, influencent de manière significative l'anatomie et le fonctionnement du reste de l'organisme (Hughes ,2023). Elles ont un rôle crucial dans l'adaptation des poissons à leur milieu environnant. Les échanges gazeux et l'élimination des déchets sont les fonctions primordiales des branchies, tandis que l'épithélium branchial contribue aussi à la régulation osmotique (Diaz *et al.*, 2009 ;Evans *et al.*,2005). Les poissons aquatiques utilisent généralement leurs branchies comme organes pour l'échange de gaz. Le système branchial est limité à deux chambres interconnectées. Les chambres sont bordées ventralement par la mandibule, dorsalement par le plafond des cavités orales et pharyngiennes, et sur les côtés par l'opercule. Sur le plan médical, elles sont continues.

Chez les poissons téléostéens, la majorité des branchies sont arrangées de manière latérale à médiale, comme en témoignent la première, la deuxième, la troisième et la quatrième branchie (Bassuoni ,2021 ; Alsafy, 2013 ; Hanafy, 2020). Chaque branchie avait une forme semi-circulaire, composée d'un arc branchial sur lequel se trouvaient des branchiospines sur son côté concave et des filaments branchiaux sur son côté convexe (Alsafy *et al.*, 2025).

b. Le foie :

Les poissons dépourvus d'estomac, tels que les Cyprinidae, se nourrissent de plancton, de végétation et de débris en petites quantités après de brèves périodes, c'est pourquoi leur foie joue un rôle crucial dans le processus digestif (Prysiashniuk *et al.*, 2019). Le foie a une place importante dans la physiologie des poissons, tant pour l'anabolisme que pour le catabolisme (Bruslé et Anadon, 2017). La forme, la taille et le volume de cet organe se modifient en fonction de l'espace disponible entre les autres organes internes dans la cavité abdominale (Bertolucci *et al.*, 2008).le foie est un organe amphicrine qui se compose de deux parties distinctes : le foie et le pancréas. (Kouassi *et al.*, 2017).

Les poissons ont une grande sensibilité aux changements environnementaux et réagissent intensément à la pollution. Le foie de poisson constitue un exemple très intéressant. Ainsi, les traits morphologiques du foie ont été reliés à la condition physiologique des poissons (Caballero *et al.*, 1999) et employés comme indicateur de la qualité environnementale (Rocha *et al.*, 1994 ; Al-Youseif *et al.*, 2000 ; Gochfeld, 2003).

c. Les intestines

Chez les poissons en général, l'intestin joue un rôle central dans la digestion et l'absorption. Au-delà de la transformation et de l'assimilation des aliments, il joue un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre hydrique et électrolytique, ainsi que dans le contrôle endocrinien de la digestion et du métabolisme, sans oublier son importance pour le système immunitaire (Ringø *et al.*, 2003).

La phylogénie, la morphologie et les dimensions corporelles, ainsi que l'alimentation influencent la configuration et la longueur proportionnelle du système digestif chez les téléostéens (Junger *et al.*, 1989). Chez les cyprinidés, l'intestin présente une configuration en boucle qui se tord proportionnellement à sa longueur relative et à la place disponible dans la cavité corporelle (Junger *et al.*, 1989) ; la longueur de l'intestin reflète généralement une base alimentaire spécifique (Karachle et Stergiou, 2010). L'intestin est court chez les espèces carnivores (Cahu, 2004), semblable à celle de l'ablette. Même si l'ablette est essentiellement carnivore et possède un intestin court, elle est capable de manger des végétaux (Schiemer, 1985).

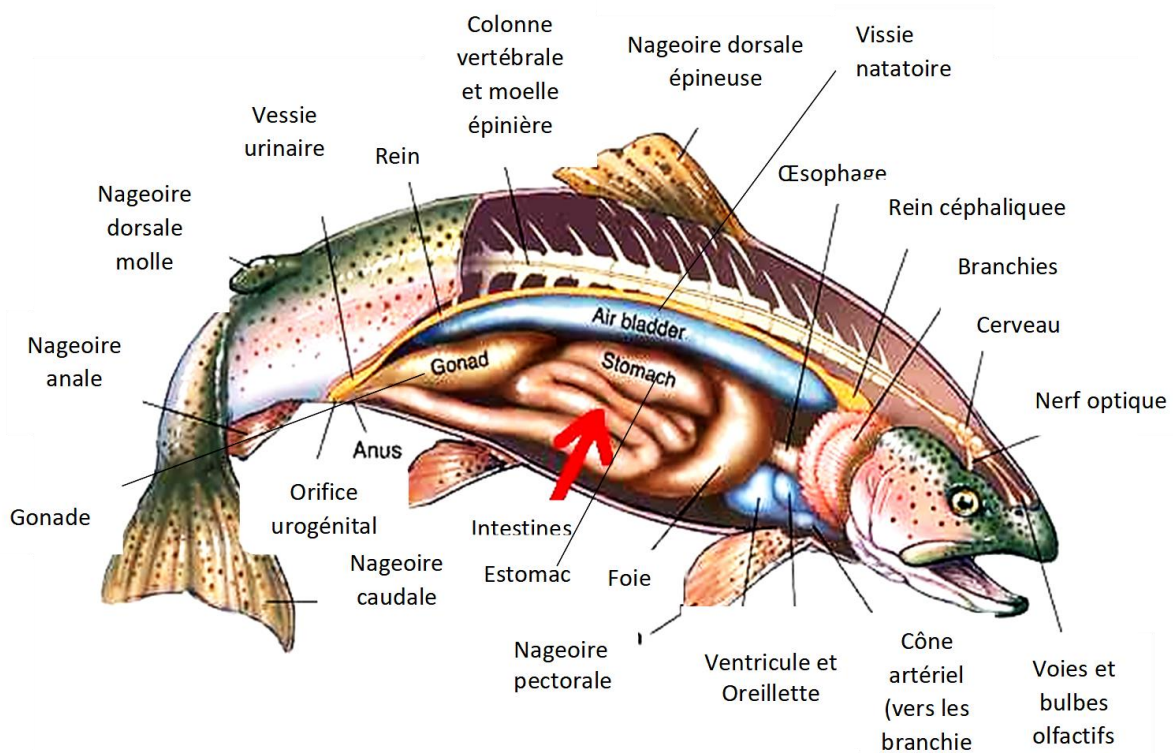


Figure 2 : Anatomie générale d'un poisson d'eau douce.

2.1.3. Répartition géographique

a. A l'échelle internationale

L'aire de répartition naturelle d'*Alburnus alburnus* s'étend depuis les montagnes de l'Oural en Russie et la rivière Emba au Kazakhstan (Balzani *et al.*, 2020) jusqu'à l'est de l'Angleterre (Dodd *et al.*, 2019). Cette espèce a été introduite dans plusieurs régions du monde, avec des populations non indigènes recensées depuis la Sibérie jusqu'à Chypre (Welcomme, 1988 ; Zogaris *et al.*, 2012). Elle a également été signalée en Italie (Nocita, 2007 ; Balzani *et al.*, 2020), en Espagne, au Portugal (Vinyoles *et al.*, 2007 ; Sousa Santos *et al.*, 2018), et au Maroc (Clavero *et al.*, 2015). De plus, l'espèce est présente dans de nombreux bassins hydrographiques européens, notamment ceux de la Tamise et de l'estuaire du Humber en Angleterre (Wheeler, 1977 ; Dodd *et al.*, 2019), (Figure 3).

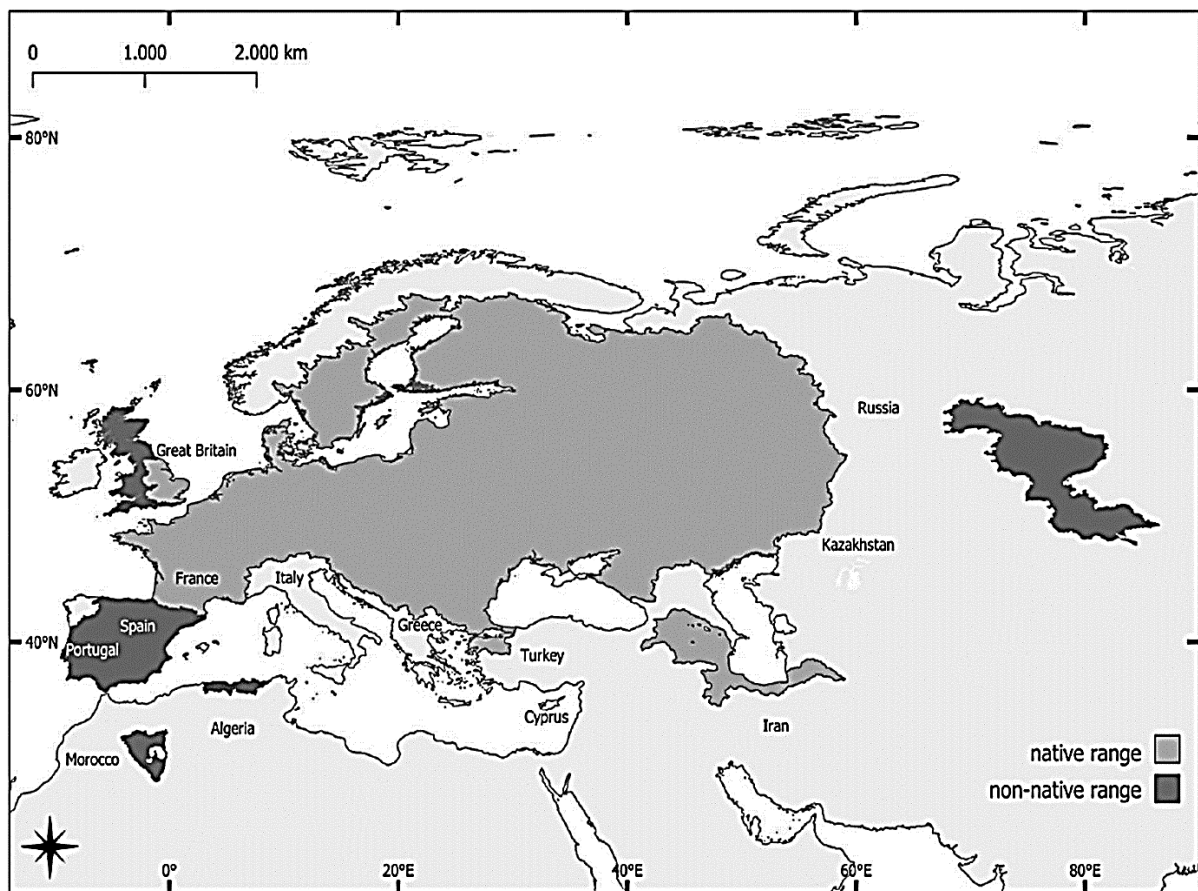


Figure 3 : Aire de répartition géographique d'*Alburnus alburnus* (Latorre *et al.*, 2022)

b. A l'échelle nationale

Alburnus alburnus est une espèce introduite de manière accidentelle en Algérie. Selon Kara (2011), son introduction s'inscrit dans la troisième phase d'introduction d'espèces dans le pays, couvrant la période de 1985 à 2009. Elle a été introduite pour la première fois dans le réservoir du barrage de Hamiz en 2006, à la suite d'une opération d'ensemencement de carpes importées de Hongrie (Kara, 2012 ; Attou et Arab, 2019). La première capture de ce poisson a été signalée en mai 2008 dans le barrage de Keddara. Il est important de souligner que les barrages de Hamiz et de Keddara sont reliés par la galerie de transfert d'eau Hamiz-Keddara, ce qui a probablement facilité la dispersion de l'espèce (Attou et Arab, 2010 ; 2012 ; 2013). Selon Attou et Arab (2013), *A. alburnus* est présent dans plusieurs barrages à travers le pays, notamment ceux de Hamiz, Keddara, Cap Djinet, Guenitra (wilaya de Skikda), Ghrib (wilaya de Aïn Defla) et Bakhadda (wilaya de Tiaret), (Figure 4).

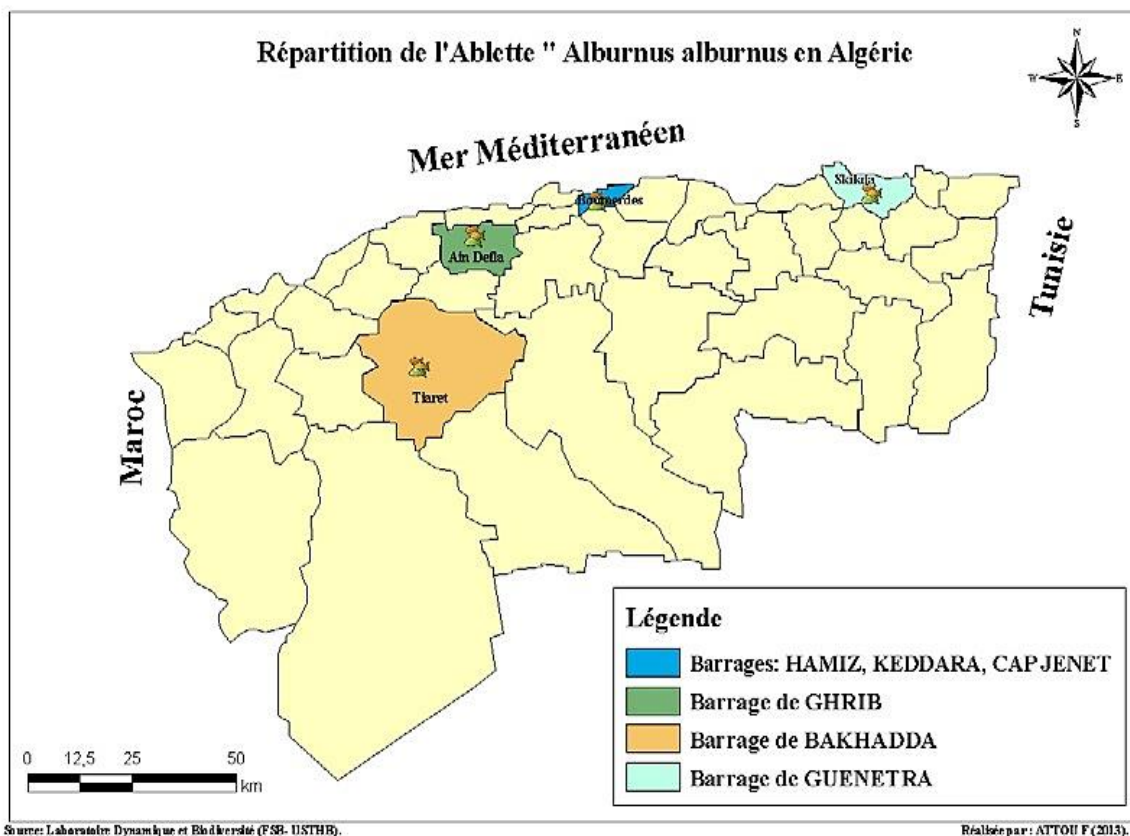


Figure 4 : Aire de répartition d'*Alburnus alburnus*, espèce alien en Algérie.

2.1.4. Habitat

A. alburnus est principalement trouvé dans des environnements lotiques et sub-lotiques, tant dans ses aires de répartition indigène que non indigène (Mann ,1996 ; Wolter et Bischoff ,2001 ; Mehner *et al.*, 2005 ; Latorre *et al.* 2016). Dans son aire indigène, il occupe des eaux eutrophes à mésotrophes jusqu'à 1800 mètres d'altitude et peut être qualifié d'espèce euryhaline (Stefanov ,2007). Ce poisson peut survivre dans des eaux ayant des concentrations en oxygène aussi basses que 1,5-3,0 mg/L (Blanck *et al.*, 2007).

Dans son habitat naturel, *A. alburnus* se rencontre dans les réseaux fluviaux adjacents aux chenaux principaux, dans les cours d'eau à faible débit (Williams 1965), les canaux latéraux (Grift *et al.* 2003), et les cours d'eau semi-naturels (Copp et Peňáz 1988 ; Copp 1992 ; Roux et Copp 1996). Il fréquente également les voies d'eau connectées et périodiquement inondées (Hohausová *et al.*, 2003 ; Penczak *et al.*, 2004 ; Scharbert et Borchering 2013). Outre les lacs et réservoirs, les cours d'eau plus rapides des affluents constituent un habitat privilégié pour la reproduction (Řiha *et al.*, 2013). On le trouve aussi dans les eaux stagnantes de plans d'eau, marais adjacents, réservoirs, lacs, et canaux dans les plaines inondables (Bohl ,1979 ; Copp 1989, 1992 ; Gozlan *et al.*, 1998 ; Cerny *et al.*, 2003 ; Blan et Lamoureux 2007 ; Navodaru *et al.*, 2002 ; Pehlivanov *et al.*, 2011 ; Balzani *et al.*, 2020 ; Martelo *et al.*, 2021).

La migration de *A. alburnus* est influencée par les variations de la qualité de l'eau (Santos *et al.*, 2002 ; Lilja *et al.*, 2003 ; Kotusz *et al.*, 2006 ; Brodersen *et al.*, 2008 ; Taylor et Cooke 2012 ; Benitez *et al.*, 2015). Les densités élevées de ces poissons dans divers habitats d'eau douce (Masó *et al.*, 2016) sont caractéristiques, tout comme leur adaptation à des régimes hydrologiques variés (Almeida *et al.*, 2014 ; Amat-Trigo *et al.*, 2019). Leur capacité à se déplacer sur de longues distances est liée à des traits biologiques tels qu'un régime alimentaire diversifié, une fécondité élevée, et une grande tolérance thermique (Chappaz *et al.*, 1987 ; Latorre *et al.*, 2016, 2018, 2020). Les œufs de l'espèce peuvent supporter des températures de 14 à 31°C, avec une fenêtre optimale de développement embryonnaire entre 21 et 27°C (Alabaster et Lloyd ,1980). Les températures supérieures à 20°C peuvent être critiques pour les adultes, avec une tolérance maximale observée à 38°C dans des lacs artificiellement chauffés (Alabaster et Lloyd ,1980).

2.1.5. Régime alimentaire

Alburnus alburnus est un carnivore opportuniste qui se nourrit de zooplancton en surface (Herzig 1994 ; Vinni *et al.*, 2000 ; Vašek et Kubečka 2004), de chironomes et de crustacés (Bíró et Muskó 1995 ; Latorre *et al.*, 2016), ainsi que d'invertébrés nectoniques. Il peut aussi consommer des arthropodes terrestres et volants tombés à la surface de l'eau. Dans les eaux peu profondes, il se nourrit d'invertébrés benthiques tels que des larves, des escargots, et des nymphes (Haberlehner 1988 ; Latorre *et al.*, 2016 ; Almeida *et al.*, 2017), ainsi que de détritiques et de matériel végétal (Vøllestad 1985 ; Bíró et Muskó 1995). Il est également connu pour se nourrir d'œufs d'autres espèces de poissons, faisant de lui un prédateur (Šmejkal *et al.*, 2017). La consommation alimentaire varie avec la température, diminuant en hiver et augmentant durant les mois chauds (Politou *et al.*, 1993).

2.1.6. Cycle biologique

Alburnus alburnus est un poisson dioïque à fécondation externe. Les adultes atteignent la maturité sexuelle entre 2 et 3 ans, avec une taille de 85 à 100 mm pour les mâles et jusqu'à 120 mm pour les femelles (Politou, 1993). La période de frai se déroule principalement au printemps et au début de l'été, lorsque la température de l'eau varie entre 14 et 28 °C (Alabaster et Lloyd, 2013). Cependant, le début de la reproduction peut fluctuer selon les régions géographiques, certaines populations initiant le frai dès que la température atteint environ 17 °C (Mann, 1996).

La reproduction a lieu dans des zones peu profondes, généralement sur des substrats tels que la végétation aquatique submergée, les débris ligneux et la vase (Balon, 1975). Les œufs sont déposés directement sur ces substrats, où la fécondation externe a lieu. Après la fécondation, le temps d'incubation des œufs varie entre 3 et 7 jours, selon la température de l'eau. À des températures plus élevées, le développement embryonnaire est accéléré, réduisant ainsi la durée d'incubation (Mann, 1996).

Les larves nouvellement écloses mesurent environ 5 à 7 mm et se nourrissent initialement des réserves contenues dans le sac vitellin. Après résorption de ce dernier, les larves passent à une alimentation planctonique, se nourrissant principalement de zooplancton (Politou, 1993). Cette phase planctonique est cruciale pour la survie et la croissance des juvéniles avant leur transition vers un régime alimentaire plus varié à l'âge adulte.

2.2. Choix de l'espèce pour l'étude toxicologique

Cette espèce est caractérisée par un métabolisme rapide et une activité élevée, ce qui peut conduire à une accumulation substantielle de polluants dans les tissus. Elle est également sensible à la pollution (Duran *et al.*, 2003 ; Jovanović Marić *et al.*, 2020 ; Ionescu *et al.*, 2016), facile à échantillonner et à identifier sur le terrain grâce à ses caractéristiques morphologiques distinctes, et bien adaptée aux travaux en laboratoire .

2.3. Technique d'élevage

2.3.1 Localisation et présentation du site d'élevage

Des géniteurs d'*A.alburnus* ont été obtenus de la ferme aquacole de Ziban, Wilaya de Biskra (nord-est de l'Algérie), et élevés en mai 2023 dans l'un des bassins d'irrigation de la commune d'Ichmoul (bassin personnelle), située dans la wilaya de Batna, à l'est de l'Algérie. Ces bassins sont alimentés par des eaux souterraines naturellement pures et exemptes de sources de contamination (Figure 5). Pendant cette période, les poissons ont été nourris quotidiennement avec du germe de blé (L'alimentation initiale utilisé dans la ferme de Ziban). Au début du mois de juillet, les alevins issus de ces géniteurs ont été capturés à l'aide de filets de pêche traditionnels, puis transportés au laboratoire dans un réservoir de capacité 100 litres, équipé d'une pompe à oxygène et de packs de glace afin de maintenir une température stable et modérée.



Figure 5 : Site de premier élevage Ichmoul-BATNA-(Photo personnelle, 2023).

2.3.2 Elevage des poissons

Des alevins, avec un poids moyen de $0,90 \pm 0,02$ g, ont été placés dans un aquarium en verre de 200 litres. Ils étaient nourris deux fois par jour avec 1,5 g de Tertamine (un aliment composé de mollusques, crustacés, sous-produits de poissons, levures, céréales, huiles, algues, sucres et minéraux). Les paramètres physiques et chimiques ont été surveillés, notamment la concentration en oxygène dissous ($8,3 \pm 1$ mg/L), la température (22 ± 2 °C), le pH ($8,1 \pm 0,2$) et l'ammoniac ($\text{NH}_3 < 0,01$ mg/L). La concentration totale des solides dissous était de 403 ± 2 mg/L, avec une photopériode de 14 heures de lumière suivie de 10 heures d'obscurité. Les alevins ont été acclimatés pendant 10 jours conformément à la ligne directrice 203 de l'OCDE.

2.4. Présentation de l'insecticide

L'acétamipride((E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N2-cyano-N1-méthylacétamidamide), numéro CAS [135410-20-7], est la deuxième substance active de première génération de la classe des néonicotinoïdes (Figure 6). C'est un insecticide systémique, volatil, polyvalent et très soluble dans l'eau. Il agit par contact ou ingestion, affectant ainsi le système nerveux central des organismes cibles. Son mode d'action consiste en un blocage irréversible des récepteurs nicotiniques post-synaptiques de l'acétylcholine, entraînant ainsi la paralysie puis la mort des organismes nuisibles (Matsuda *et al.*, 2009). L'acétamipride est fortement toxique pour les espèces aviaires et les oligochètes, et moyennement toxique pour les mammifères et la plupart des espèces aquatiques (USEPA, 2011).

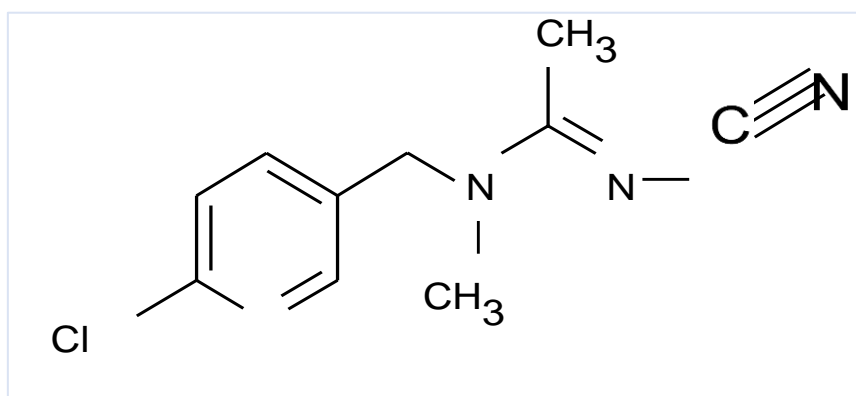


Figure 6 : Structure chimique de l'Acétamipride

Tableau 2: Fiche technique de l'Acétamipride TIMRID 20 % SP

Nom chimique	Acétamipride
Nom commercial	TIMRID 20 %SP
Type de pesticide	Insecticide
Type d'utilisation	Phytoprotecteur
Groupe chimique	Néonicotinoïde
Formule chimique	(E)-N-[(6-Chloro-3-pyridinyl) méthyl] -N'-cyano-N-méthyléthanimid
Hydrosolubilité	très soluble dans l'eau.
Mode d'action :	Effets sur les fonctions physiologiques : nerf et muscle. Mode et site d'action : agoniste/antagoniste du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Fixation sur le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, avec interruption de la transmission de l'influx nerveux. Agonistes du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR).

2.5. Application de l'insecticide :

Pour la réalisation de ce travail sept doses ont été utilisées : les cinq premières (25, 35, 40, 45 et 50 mg/L) retenues pour la détermination des concentrations létales de l'acétamipride. Des concentrations environnementales ont été utilisées pour l'analyse des résidus de l'acétamipride par chromatographie liquide haute performance et l'évaluation moléculaire et histologique de l'effet de cet insecticide sur les branchies, le foie et l'intestin. L'insecticide utilisé pour la réalisation de cette étude est le Timrid 20 % SP la formulation commerciale de l'acétamipride. La solution d'essai a été préparée en diluant cette formulation dans de l'eau de robinet et additionnée à l'eau d'élevage des alevins pour atteindre les concentrations finales souhaitées.

2.5.1. Toxicité aiguë de l'acétamipride

Un total de 90 alevins d'ablette a été sélectionné aléatoirement et réparti dans 6 aquariums en verre (60 × 30 × 40 cm), chacun contenant 30 litres d'eau aérée à l'aide d'une

pompe à oxygène (Nubios, Chine). Selon les lignes directrices de l'OCDE (OCDE, 2019). Les concentrations d'acétamipride testées dans cette expérience étaient de 0, 25, 35, 40, 45 et 50 mg/L. L'essai a duré 96 heures, avec un enregistrement de la mortalité des poissons effectué à 24, 48, 72 et 96 heures après l'exposition à l'acétamipride. Les paramètres physico-chimiques de l'eau ont été surveillés quotidiennement (et se sont avérés similaires à ceux observés pendant la période d'acclimatation). Afin de maintenir la qualité de l'eau, 50 % du volume de chaque aquarium a été renouvelé chaque jour avec de l'eau fraîche contenant les mêmes concentrations de pesticide (semi-static system).

L'évaluation de la toxicité aiguë de cet insecticide est réalisée par le calcul de la CL50, en utilisant la concentration létale d'acétamipride déterminée selon la méthode de Miller et Tainter (1944) ainsi que celle de Muhammad (2009). Cette méthode repose sur le tracé du pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la concentration sur du papier Log-Probit. Lorsque les valeurs probits de 0 % et 100 % tendent vers l'infini, elles sont corrigées à l'aide des formules suivantes :

- pour une mortalité de 0 % : $100 * 0,25/n$
- pour 100 % de mortalité : $100 * (n-0,25)/n$

Standard d'erreur approximative de la CL50 = $(\text{Log CL84} - \text{Log CL16}) / \sqrt{2N} \dots (a)$

Où N est le nombre d'animaux dans chaque groupe.

2.5.2 Analyse des résidus de l'acétamipride

Le protocole est réalisé selon Zaidi et Soltani (2013). La concentration de l'insecticide dans l'eau d'élevage des poissons soumis à l'exposition à l'acétamipride (300 µg/L) pendant 96 heures. Pour ce faire, 3 ml d'eau d'élevage ont été évaporés jusqu'à l'obtention d'une siccité complète ensuite conservé à -10 °C jusqu'au dosage. L'extrait sec est repris dans 200 µl du mélange acétonitrile-eau (50-50). Les échantillons contenant le mélange acétonitrile-eau ont été par la suite évaporés à sec dans une centrifugeuse sous vide. Le résidu obtenu a été dissous dans 200 µL de solvant d'extraction (formiate d'ammonium 5 mM, 0,1 % d'acide formique dans de l'eau ultrapure) et injecté dans le système LC-MS/MS.

Les résidus de l'acétamipride, ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) avec un détecteur à triple quadrupole. Des

Matériel et méthodes

solutions étalons certifiées ont été préparées à cinq concentrations différentes (0–50 ng/mL) pour établir les courbes d'étalonnage. L'identification des composés ciblés repose sur :

- Les temps de rétention,
- Les rapports ion principal / ions de confirmation,
- Les profils de fragmentation issus des échantillons enrichis (matrix spike).

La quantification a été réalisée en traçant la surface des pics chromatographiques en fonction des concentrations standards. Cette méthode garantit une grande précision et exactitude. L'équipement utilisé comprend un système Agilent 1260 Infinity LC couplé à un Agilent 6460 Triple Quadrupole MS/MS avec une source ionisante Jet Stream ESI (Tableau 3).

Tableau 3 : conditions opératoire d'analyse de résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage d'*Alburnus alburnus*.

Chromatographie HPLC /MS	Chromatographie liquide Agilent 1260 Infinity et système MS/MS triple quadripôle Agilent 6460	
Détection	ESI+Agilent Jet Flux (ionisation electrospray)	
Colonne	10 µm×100 mm × 2.1 mm	
Tension capillaire	3500 V	
Pression de nébulisation	40 (psi)	
Température de gaz	325°C	
Débit de gaz	10 L/min	
Quantité injectée	5 µL	
Mode	Scan de 56,2 à 223,1 /Scan de 126,1 à 223,1	
Débit de pompe	0,5 ml /min	
Programmation de solvant		
Temps (min)	A (Eau)	B (Acétonitrile)
1.00	95%	5%
7.00	5%	95%
10.00	5%	95%
10.01	0%	100%
12.00	0%	100%
12 :10	95%	5%

2.5.3 Toxicité sublétales

Des analyses moléculaires et histologiques ont été réalisées sur des individus exposés à deux doses sublétales d'acétamipride pendant 96 h (Figure 7). Les concentrations sélectionnées (150 µg/L et 300 µg/L) correspondent respectivement à 0,46 et 0,92 % de la concentration létale médiane à 96 h (CL50 -96 h). En outre, la sélection des doses était basée sur des données préexistantes sur la concentration mondiale d'acétamipride dans les eaux de surface, garantissant ainsi que les doses peuvent être considérées comme très faibles et réalistes sur le plan environnemental (Zoumenou *et al.*, 2019 ; Veedu *et al.*, 2022 ; Mutshekwa *et al.*, 2023).

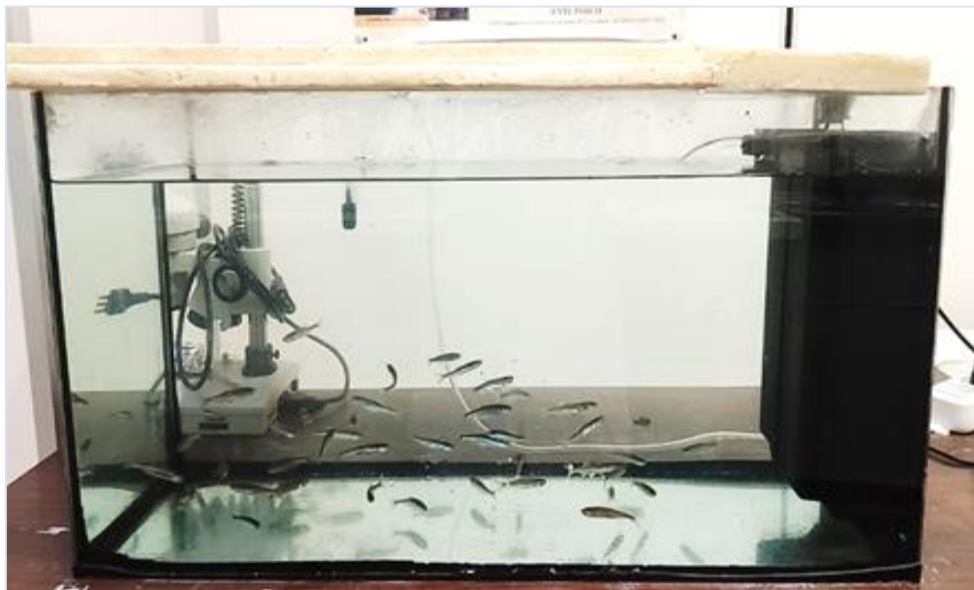


Figure 7 : Essai de la toxicité sublétales d'Acétamipride chez *A. alburnus* au laboratoire (Photo personnelle).

Pour chaque concentration testée, y compris le contrôle, 10 poissons ont été placés dans des réservoirs en verre de 20 L contenant la solution de traitement appropriée. Le groupe témoin a été maintenu dans l'eau du robinet. Après 96 heures d'exposition, les poissons ont été euthanasiés avec du méthanesulfonate de 3-aminobenzoate d'éthyle (MS 222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) et les branchies les intestins et le foie ont été rapidement excisées et traitées pour des analyses moléculaires et histologiques ultérieures (Figure 8).

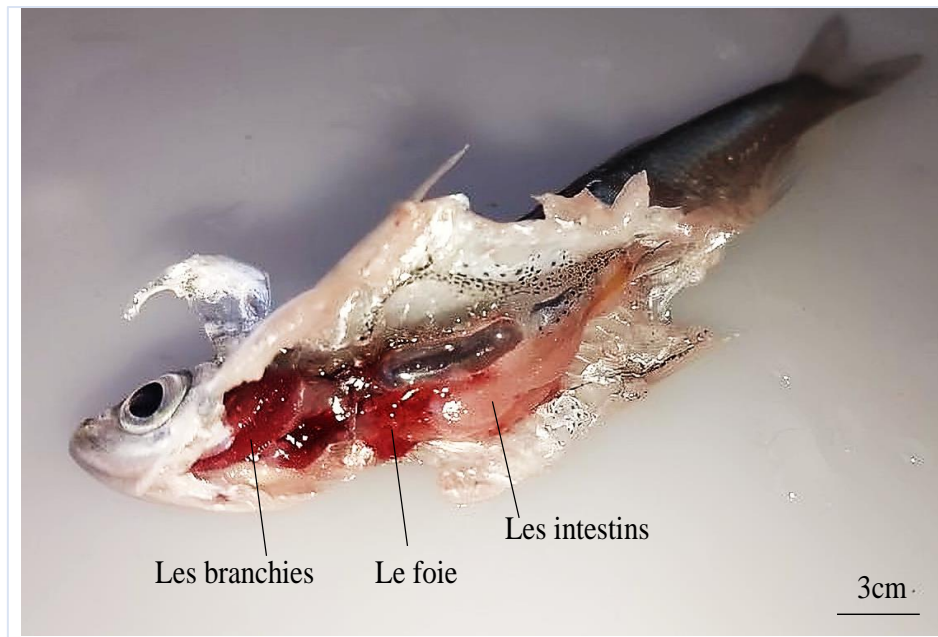


Figure 8: Dissection d'*A. alburnus* (photo personnelle, 2023)

2.5.4 Analyse histopathologique

Le protocole histopathologique a été réalisé en plusieurs étapes (figure 9) :

- Fixation** : Les branchies, intestins et foies ont été prélevés et lavés avec un tampon phosphate composé de 9,5 mL de phosphate monobasique, 40,5 mL de phosphate bibasique et 4 g de sel. La première étape a consisté à fixer les organes dans du glutaraldéhyde à 4 % (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) pendant 3 heures. Les échantillons ont ensuite été rincés trois fois pendant 5 minutes avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS 0,1 M, pH 7,2), puis post-fixés dans du tétroxyde d'osmium à 2 % (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) pendant 2 heures à 4°C, avant d'être rincés de nouveau trois fois pendant 5 minutes avec du PBS.
- Pré-inclusion** : Dans cette étape, les échantillons ont été déshydratés avec une série d'éthanol de concentrations croissantes (Tableau 4), puis imprégnés d'oxyde de propylène.
- Inclusion** : Les échantillons ont été inclus dans de l'Epon-Araldite (Araldite 502/Embed 812, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).
- Réalisation des coupes** : Des sections semi-fines (1 μm) ont été obtenues à l'aide d'un ultramicrotome Leica UltraCut UCT (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne).

Matériel et méthodes

- e. **Coloration** : Les coupes ont été colorées avec une solution de bleu de toluidine (1 % de toluidine dans 2 % de borate) et observées avec un microscope optique (DM1000 LED ; Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'une caméra numérique Optika HDMI (Optika, Ponteranica, Italie)

Tableau 4 : Désydratation d'échantillons et l'inclusion

Glutéraldéhyde 4%	3 heures au réfrigérateur
PBS	5 min 3 passage
Tétroxyde d'osmium 2 %	2 heures au réfrigérateur
PBS	5 min 3 passage
Ethanol 30 %	10 min
Ethanol 50 %	10 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 90 %	15 min
Ethanol 100 %	15 min
Ethanol 100 %	15 min
Oxyde de propylène	1 heure
Oxyde de propylène	1 heure
Tube vide (Séchage)	1min
Oxyde de propylène : résine (1 :1)	4 heures
Résine /résine	16 heures/5heurs
Inclusion	



Figure 9 : Etude histopathologique

(A) prélèvement des organes, (B) Fixation des organes, (C) pré-inclusion par déshydratation des échantillons, (D, E, F et G) inclusion des échantillons, (H) réalisation des coupes.

2.5.5. Analyse moléculaire : analyse quantitative de la réaction en chaîne polymérase par transcription inverse (RT-qPCR)

I. principe de la technique

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet l'amplification et la quantification simultanée d'une séquence d'ADN cible. Cette technique repose sur l'utilisation de deux amorces spécifiques qui se fixent de manière complémentaire en amont et en aval de la région à amplifier. L'enzyme ADN polymérase prolonge les amorces en incorporant des nucléotides à leurs extrémités 3'OH, indispensables à la synthèse du brin complémentaire. Une stérilisation stricte de l'environnement est nécessaire pour éviter toute contamination, et le port de masques et de gants est recommandée pour préserver la validité des résultats. La RT-qPCR est une technique qui permet d'utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR quantitative. Cette technique a été réalisée en suivant le procédé de fabricant et comprend trois étapes principales (figure 10) :

a. 1^{er} étape : extraction de l'ARN

Les branchies, les intestins et le foie des alevins ont été lavés avec du PBS, puis conservés dans une solution RNA later™ (Thermo Fisher Scientific, Lituanie) pour stabilisation, avant d'être stockés à -80°C pendant 24 heures. Les tissus ont été ensuite placés dans un mortier (sur de la glace), puis 1 ml de Trizol a été ajouté pour l'extraction de l'ARN. Après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant contenant l'ARN a été récupéré dans de nouveaux tubes Eppendorf. Une phase de séparation a été réalisée en ajoutant 200 µl de chloroforme, suivie d'une agitation vigoureuse et d'une incubation à température ambiante pendant 2-3 minutes. Une seconde centrifugation à vitesse maximale (15 minutes, 4°C) a permis de séparer les phases, et la phase aqueuse contenant l'ARN a été isolée. L'ARN a été précipité avec 500 µl d'isopropanol (100%), suivi d'une incubation de 10 minutes et d'une centrifugation à vitesse maximale pendant 20 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol à 75 %, centrifugé 5 minutes à 7 500 g à 4°C, puis séché à l'air libre pendant 5-10 minutes. Le culot a été resuspendu dans 20-50 µl d'eau exempte de nucléases, incubé dans un bloc thermique à 55-60°C pendant 10-15 minutes, puis stocké à -80°C.

b. 2^{ème} étape : Rétrotranscription

Les échantillons d'ARN ont été décongelés sur de la glace. Pour l'extraction de l'ARN total des organes, les kits PureLink™ RNA Mini et PureLink™ DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été utilisés selon les protocoles du fabricant. La quantité et la qualité de l'ARN ont été vérifiées avec le spectrophotomètre NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. Le kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a été utilisé pour la synthèse de 2 µg d'ARN total en ADNc de premier brin. L'ADNc obtenu a été conservé à -20°C.

c. 3^{ème} étape : transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (RT-PCR)

L'ADNc a servi de matrice pour l'analyse quantitative par RT-qPCR afin de mesurer l'expression des gènes suivants : Na⁺/K⁺-ATPase, sous-unité de transport alpha 1a (atplala.1, séquence de référence NCBI : NM_131686.1) pour les branchies et intestins, et superoxyde dismutase 1 (sod1, séquence de référence NCBI : NM_131294.1) pour le foie. Les tests d'expression génique TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été effectués en triplicat dans un Light Cycler (Applied Biosystems StepOne, Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA). Chaque réaction contenait 2 µl d'ADNc, 10 µl de master mix (TaqMan Universal Master Mix II, Applied Biosystems), 1 µl de test mix (TaqMan Gene Expression Assay) et 7 µl d'eau exempte de RNase et DNase.

Le protocole du fabricant a été suivi : un cycle à 50°C pendant 2 minutes, 40 cycles à 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute. Les gènes de référence internes, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (gapdh, séquence de référence NCBI : NM_001115114.1) et l'actine bêta 1 (actb1, séquence de référence NCBI : NM_131031.2), ont été utilisés pour normaliser l'expression génique en utilisant la méthode comparative 2- Δ Ct (Livak et Schmittgen., 2001).

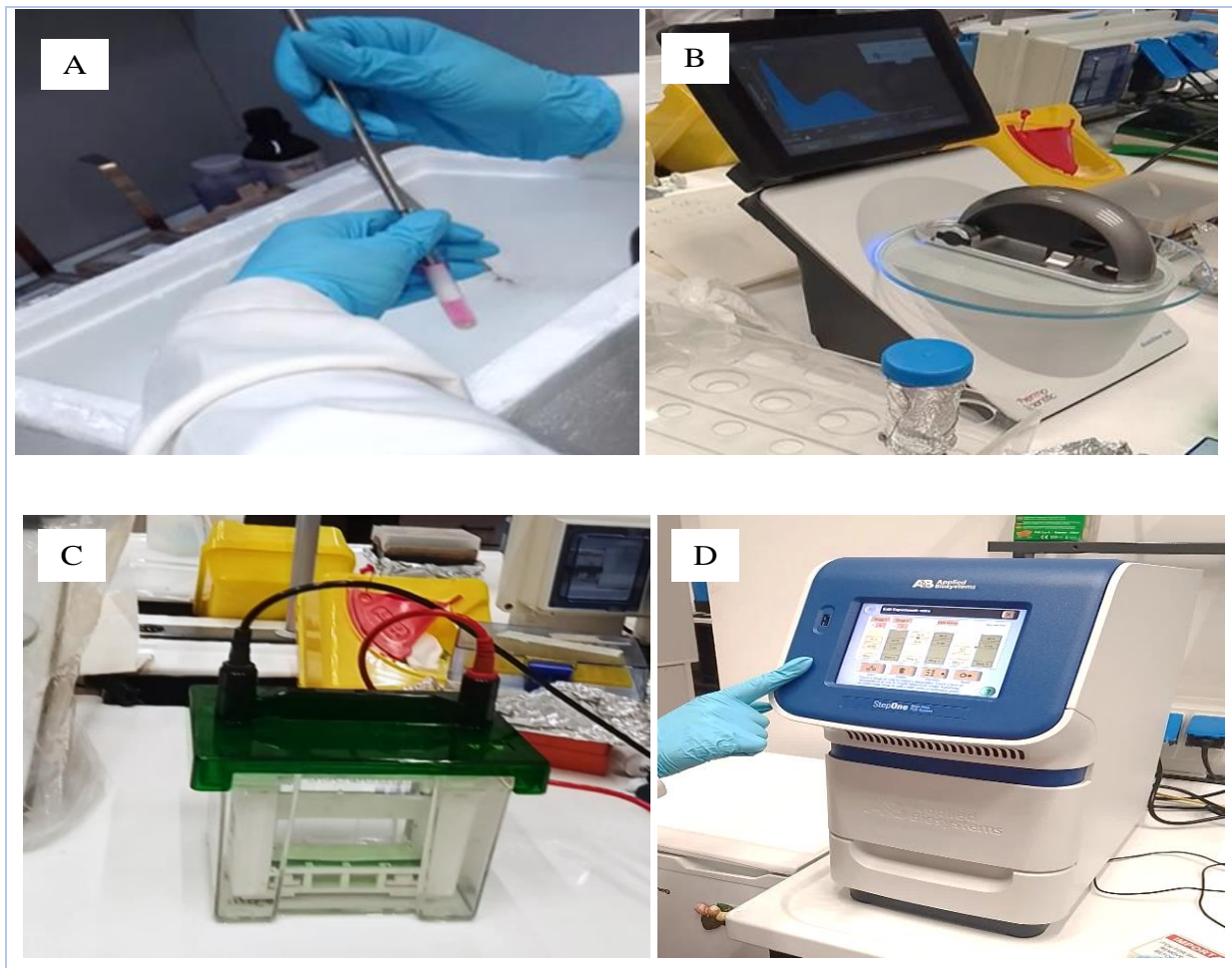


Figure 10 : Etude moléculaire

(A) extraction d'ARN (broyage des tissus), (B) vérification de la quantité d'ARN par Spectrophotomètre, (C) vérification de la qualité d'ARN électrophorés par l'électrophorés, (D) transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (RT-PCR).

II. Analyse statistique

Le programme Graph Pad Prism 8.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Californie, États-Unis) a été utilisé pour l'évaluation statistique ($p = 0,05$). La distribution des mesures suit une loi normale et ces paramètres sont exprimés par leur moyenne et leur écart-type, calculés sur un nombre de répétitions bien indiqué dans le document. La régression linéaire a été utilisée pour la détermination des droites de régression de la toxicité de l'insecticide. Une analyse de variance à un critère (traitement) de classification (ANOVA) suivie de test Tukey HSD (post hoc), a été mise en œuvre pour comparer statistiquement les différences significatives des niveaux d'expression de l'ARNm entre les groupes traités par l'acetamipride et le groupe témoin.

Résultats

3. Résultats

3.1 Détermination de la CL50 de l'acetamipride chez les alevins d'*A.alburnus*

L'acetamipride a été appliqué à différentes concentrations (0, 25, 35, 40, 45 et 50 mg/L) dans l'eau d'élevage des poissons, répartie dans six bacs, chacun contenant 15 individus d'*A.alburnus*.

3.1.1. Détermination de la CL 50 de l'acetamipride après 24 heures d'exposition

Les pourcentages de mortalité observée et de mortalité corrigée au cours des tests de toxicité varient de 0 % à 100 % et de 1,66% à 73,33 %, respectivement. Aucun cas de mortalité n'a été enregistré dans la série témoin (Tableau 5, Figure 11).

Tableau 5 : Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d'*A.alburnus* après 24 heures d'exposition (N=15).

Concentrations (mg/L)	Nombre de mortalité	% de mortalité observé	% de mortalité corrigé	Log concentration	Probits
0	0	0	0	/	/
25	0	0	1,66	1,397	2,855
35	2	13,33	13,33	1,544	3,887
40	5	33,33	33,33	1,602	4,568
45	8	53,33	53,33	1,653	5,082
50	11	73,33	73,33	1,698	5,621

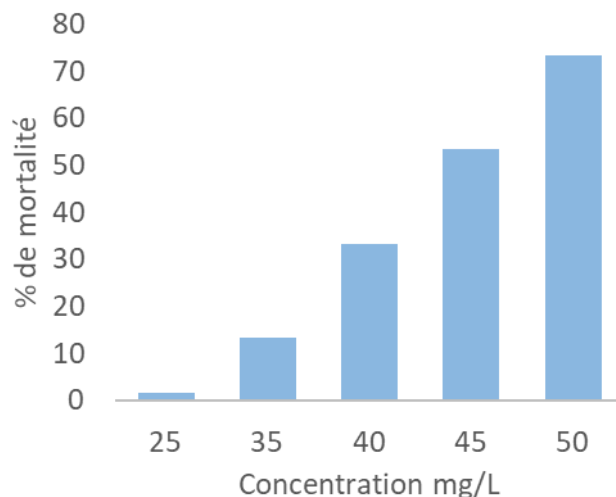


Figure 11 : Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d'*A. alburnus* en fonction de la concentration d'acétamipride après 24 heures d'exposition

La courbe de référence, exprimant le probit de mortalité corrigée des alevins d'*A.alburnus* en fonction du logarithme de la concentration appliquée après 24 heures d'exposition, a permis d'estimer la concentration à $44,059 \pm 0,032$ mg/L (Figure 12, Tableau 6).

Le coefficient de détermination ($R^2= 0,984$) révèle une corrélation positive entre les mortalités et les doses testées.

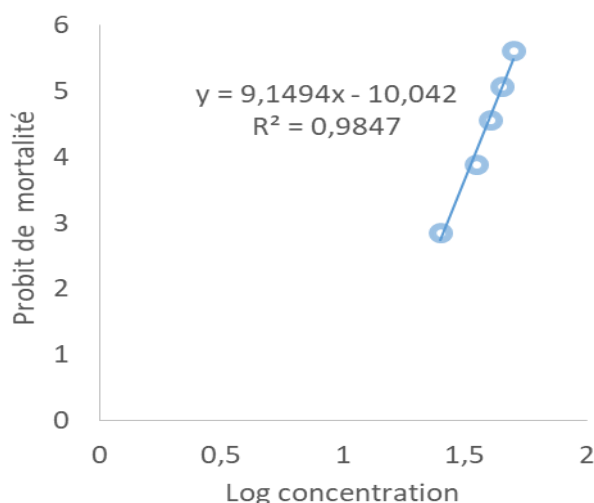


Figure 12 : Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins (en probit) en fonction des logarithmes décimaux des doses après 24 heures de traitement avec l'Acétamipride.

Résultats

Tableau 6 : Estimation de la CL50 à partir de la droite de régression chez les alevins d'*A.alburnus* après 24 heures d'exposition à l'acétamipride.

Exposition (24 h)	Droite de régression	R ²	CL 50
Acétamiprid	Y = 9,149 x - 10,04	0,9847	44,059 ± 0,032

3.1.2. Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 48 heures d'exposition

Lors des testes de toxicité, les pourcentages de mortalité observée et de mortalité corrigée varient respectivement de 0 % à 100 % et de 1,66% à 98,33 %. Le pourcentage de mortalité naturelle enregistrée chez la série témoin est nul (Tableau 7, figure 13).

Tableau 7 : Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d'*A.alburnus* après 48 heures d'exposition (N=15).

Concentrations (mg /L)	Nombre de mortalité	% de mortalité observé	% de mortalité corrigé	log concentration	Probits
0	0	0	0	/	/
25	0	0	1,66	1,397	2,855
35	4	26,66	26,66	1,544	4,375
40	11	73,33	73,33	1,602	5,621
45	13	86,66	80,66	1,653	6,107
50	15	100	98,33	1,698	7,12

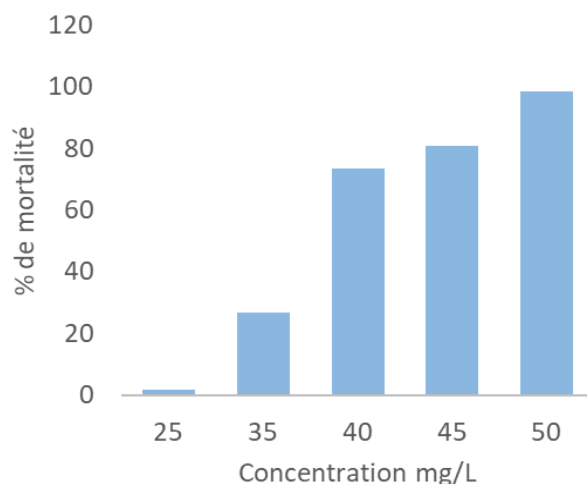


Figure 13 : Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d'*A. alburnus* en fonction de la concentration d'acétamipride après 48 heures d'exposition.

La droite de régression qui exprime la mortalité corrigée en fonction des logarithmes décimaux des doses de l'Acétamipride appliqué sur les alevins d'*A. alburnus* après 48 heures est représentée dans la figure 14. Le coefficient de détermination ($R^2 = 0,977$) révèle une corrélation positive entre les mortalités et les doses testées. La concentration CL50 déterminée à partir de la droite de régression est estimée à $36,559 \pm 0,025$ mg/L (Figure 14, Tableau 8).

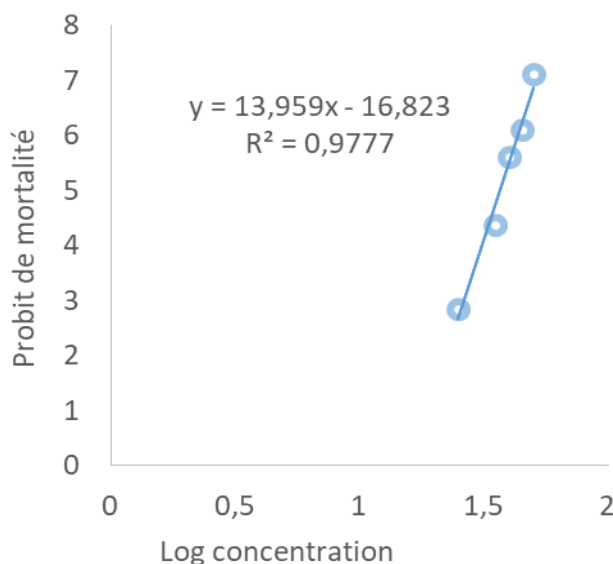


Figure 14 ; Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins (en probit) en fonction des logarithmes décimaux des doses après 48 heures de traitement avec l'Acétamipride.

Résultats

Tableau 8 : Estimation de la CL50 à partir de la droite de régression chez les alevins d'*A.alburnus* après 48 heures d'exposition à l'acétamipride.

Exposition (48 h)	Droite de régression	R ²	CL 50
Acétamiprid	$Y = 13,96 x - 16,82$	0,9777	$36,559 \pm 0,025$

3.1.3. Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 72 heures d'exposition

Les pourcentages de mortalité observée et de mortalité corrigée au cours des tests de toxicité varient de 0 % à 100 % et de 1,66% à 98,33 %, respectivement. Le pourcentage de mortalité naturelle enregistrée chez la série témoin est nul (Tableau 9, figure 15).

Tableau 9 : Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d'*A alburnus* après 72 heures d'exposition (N=15).

Concentrations (mg/L)	Nombre de mortalité	% de mortalité observé	% de mortalité corrigé	Log concentration	Probit
0	0	0	0	/	/
25	0	0	1,66	1,397	2,855
35	8	53,33	53,33	1,544	5,082
40	13	86,66	86,66	1,602	6,107
45	14	93,33	93,33	1,653	6,498
50	15	100	98,33	1,698	7,12

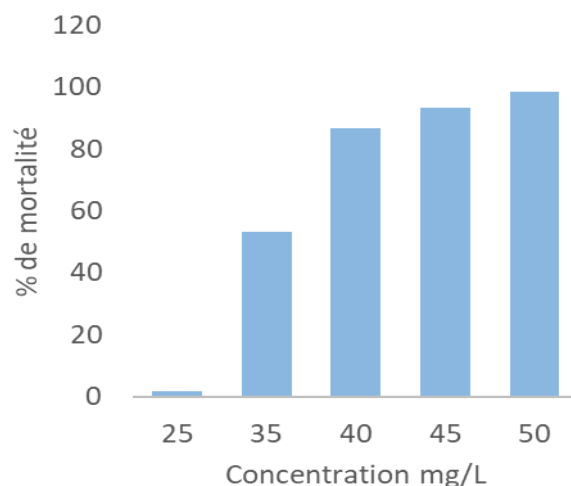


Figure 15 : Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d'*A. alburnus* en fonction de la concentration d'acétamipride après 72 heures d'exposition.

La courbe de référence, exprimant le probit de mortalité corrigée des alevins d'*A.alburnus* en fonction du logarithme de la concentration appliquée après 72 heures d'exposition, a permis d'estimer la concentration létale (CL50) à $36,559 \pm 0,025$ mg/L (Figure 16, Tableau 10).

Le coefficient de détermination ($R^2= 0,991$) révèle une corrélation positive entre les mortalités et les doses testées.

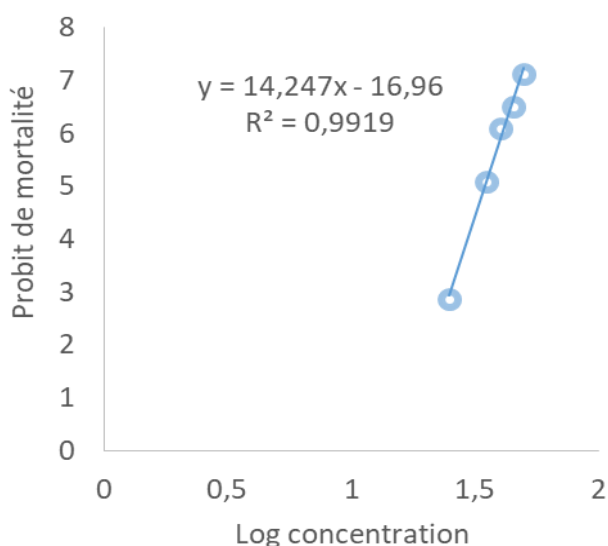


Figure 16 : Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins (en probits) en fonction des logarithmes décimaux des doses après 72 heures de traitement avec l'Acétamipride.

Résultats

Tableau 10 : Estimation de la CL50 à partir de la droite de régression chez les alevins d'*A.alburnus* après 72 heures d'exposition à l'acétamipride.

Exposition (72 h)	Droite de régression	R ²	CL 50
Acétamiprid	Y = 14,25 x - 16,96	0,9919	34,753 ± 0,025

3.1.4. Détermination de la CL 50 de l'acétamipride après 96 heures d'exposition

Lors des testes de toxicité, les pourcentages de mortalité observée et de mortalité corrigée varient respectivement de 0 % à 100 % et de 1,66% à 98,33 %. Le pourcentage de mortalité naturelle enregistrée chez la série témoin est nul (Tableau 11, figure 17).

Tableau 11 : Effet toxique de l'acétamipride (mg/L) sur les alevins d'*A.alburnus* après 96 heures d'exposition (N=15).

Concentrations (mg /L)	Nombre de mortalité	% de mortalité observé	% de mortalité corrigé	log concentration	Probit
0	0	0	0	/	/
25	0	0	1,66	1,397	2,855
35	10	66,66	66,66	1,544	5,268
40	13	86,66	86,66	1,602	6,107
45	14	93,33	93,33	1,653	6,498
50	15	100	98,33	1,698	7,12

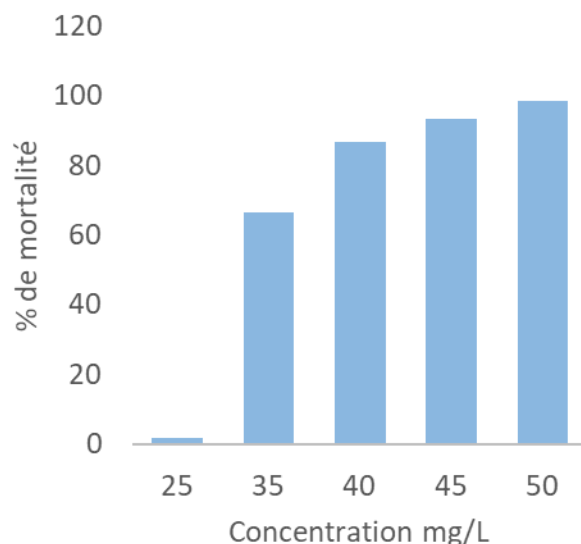


Figure 17 : Évolution du taux de mortalité corrigée (%) chez les alevins d'*A. alburnus* en fonction de la concentration d'acétamipride après 96 heures d'exposition.

La droite de régression qui exprime la mortalité corrigée en fonction des logarithmes décimaux des doses de l'Acétamipride appliqué sur les alevins d'*A.alburnus* après 96 heures est représentée dans la figure 18. Le coefficient de détermination ($R^2= 0,987$) révèle corrélation positive entre les mortalités et les doses testées. La concentration CL50 déterminée à partir de la droite de régression est estimée à $34,546 \pm 0,025$ mg/L (Figure 18, Tableau 12).

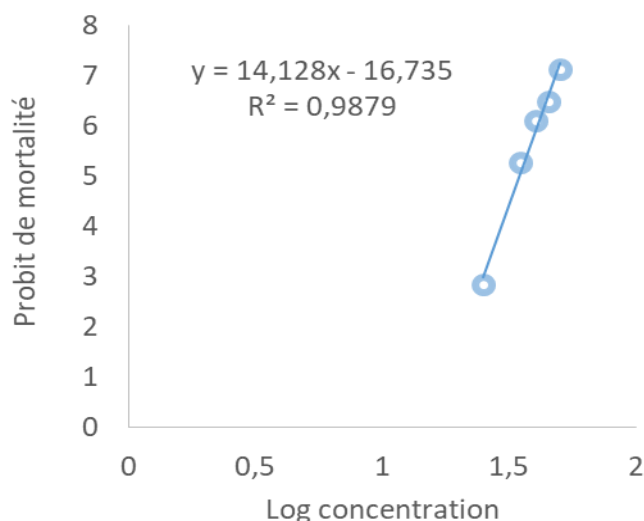


Figure 18 : Courbe de référence représente la mortalité corrigée des alevins (en probits) en fonction des logarithmes décimaux des doses après 96 heures de traitement avec l'Acétamipride.

Résultats

Tableau 12 : Estimation de la CL50 à partir de la droite de régression chez les alevins d'*A.alburnus* après 96 heures d'exposition à l'acétamipride.

Exposition (96 h)	Droite de régression	R ²	CL 50
Acétamiprid	$Y = 14,13 x - 16,74$	0,9879	$34,546 \pm 0,025$

Selon Fishel (2005), les valeurs de CL50 de 24, 48, 72 et 96 heures indiquent que l'acétamipride, est légèrement toxique pour les alevins d'*Alburnus alburnus* dans les conditions de cette étude (Tableau 13).

Tableau 13 : Classes de toxicité des néonicotinoïdes chez les poissons (Échelle de Fishel 2005).

LC 50	Toxicité
$CL50 < 0,1ppm$	Très hautement toxique
$0,1ppm \leq CL50 \leq 1ppm$	Hautement toxique
$1ppm \leq CL50 \leq 10ppm$	Modérément toxique
$10ppm \leq CL50 \leq 100ppm$	Légèrement toxique
$100ppm > CL50$	Pratiquement non toxique

3. 2. Détermination de résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage des poissons

L'analyse des résidus de l'acétamipride additionné dans l'eau d'élevage des poissons à la dose de 300 µg /L à pour but de détecter la quantité de matière active dans l'eau d'élevage au cours d'une exposition continu et par conséquent de déterminer la dégradation et la bioaccumulation de l'insecticide dans les alevins. Les quantités de l'acétamipride ont pu être déterminées à partir des chromatogrammes de l'acétamipride utilisé comme standard.

Résultats

Les résultats de l'analyse des résidus extraits des échantillons d'eau d'élevage traitée avec l'acétamipride sont mentionnés dans la figure 19. Dans nos conditions expérimentales, le temps de rétention de l'acétamipride est de 5,98 minutes (Tableau 14). La présence de ce composé est détectée dans les extraits d'eau douce traitée (Figure 19), et la quantification des pics chromatographiques indique que les concentrations en résidus diminuent au cours du temps. En effet, le taux des résidus varie de 300 µg/L (concentration de départ) à seulement 19,01± 5,28 µg/L à la fin du traitement (Figure 19). De plus, nos résultats (Tableau 15) montrent que 93,66 % de la concentration de cette insecticide est dégradé au bout 96 heures d'essai. Le taux de dégradation est calculé par différence entre la quantité de départ et la quantité détectée dans l'eau d'élevage après 96 heures d'exposition. Sachant que le calcul est basé sur la quantité de l'acétamipride non métabolisé. L'ANOVA à un critère de classification des taux de résidus détectés indique un effet temps ($p < 0,001$) hautement significatives.

Tableau 14 : Temps de rétention de l'acétamipride

Time Segment 1											
Scan Segments											
Cpd Name	ISTD?	Prec Ion	MS1 Res	Prod Ion	MS2 Res	Frag (V)	CE (V)	Cell Acc (V)	Ret Time (min)	Ret Window	Polarity
Acephate	No	184	Unit/Enh (6490)	143	Unit/Enh (6490)	90	4	7	2.37	1.5	Positive
Acephate	No	184	Unit/Enh (6490)	95	Unit/Enh (6490)	90	20	7	2.37	1.5	Positive
Acetamiprid	No	223.1	Unit/Enh (6490)	126.1	Unit/Enh (6490)	100	17	7	5.98	1.5	Positive
Acetamiprid	No	223.1	Unit/Enh (6490)	56.2	Unit/Enh (6490)	100	11	7	5.98	1.5	Positive

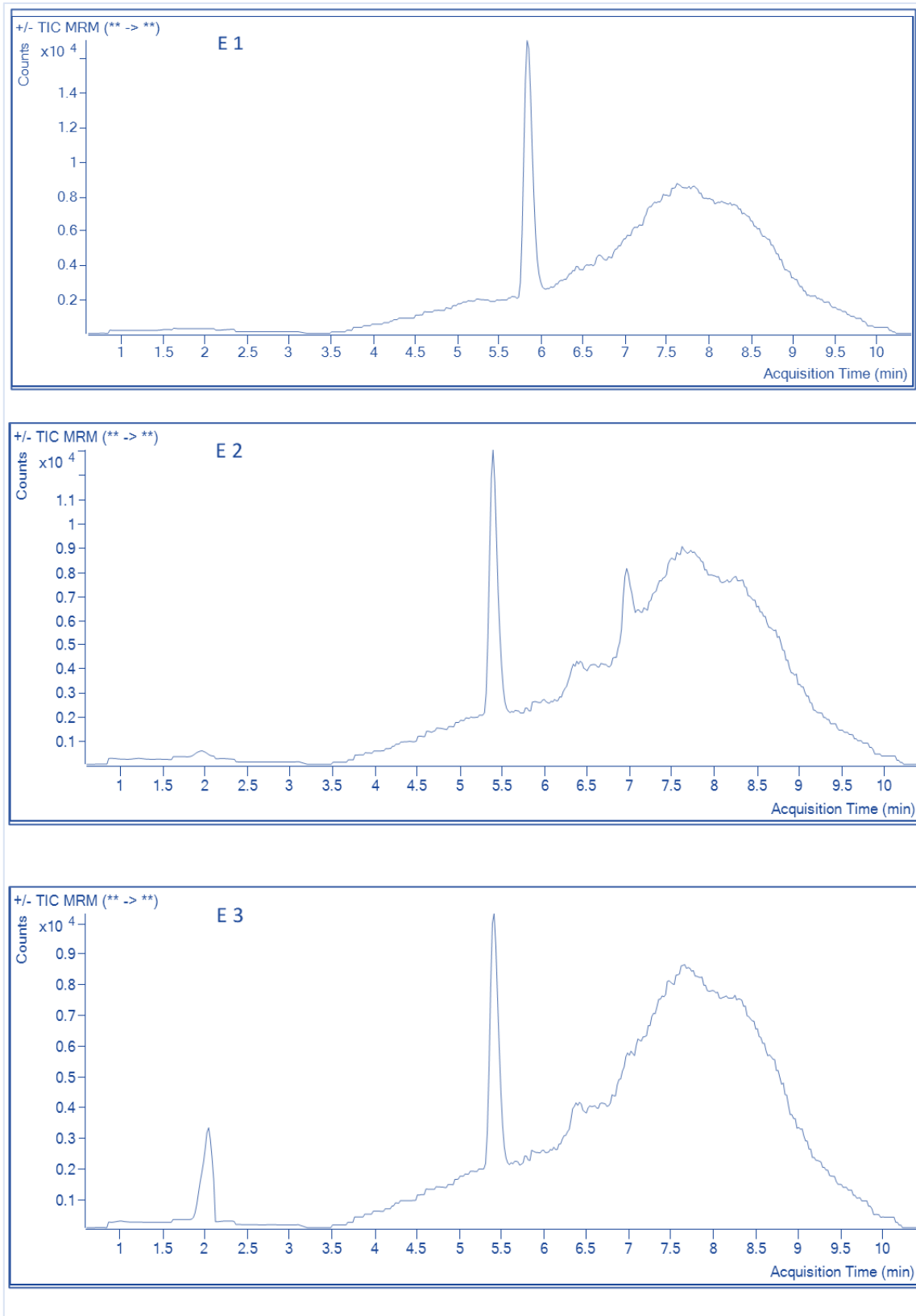


Figure 19 : Chromatogrammes HPLC des extraits d'eau d'élevage après 96 heures d'exposition.

(E1) échantillon 1, (E2) échantillon 2, (E3) échantillon 3

Tableau 15 : Concentrations d'acétamipride obtenus par HPLC/MS après 96 heures traitement
(m ± s, n=3)

Echantillon	Concentration finale ng/ml	Concentration moyenne	SEM	Taux de dégradation(%)	SEM
Concentration de départ	300	/	/	0	/
C 96	24,79	19,01	5,28	91,73	93,66
C 96	17,81			94,06	
C 96	14,42			95,19	

3. 3. Effets histologiques de l'acétamipride dans les organes des alevins d'*Alburnus alburnus*

3.3.1. Changements histologiques des branchies

- Chez le groupe témoin**

L'analyse histologique a révélé une structure branchiale normale, sans anomalies morphologiques. Les branchies d'*Alburnus alburnus* sont composées de quatre arcs branchiaux, chacun portant une paire de filaments primaires, eux-mêmes constitués d'une série de filaments secondaires (Figure 20a). Ces filaments sont formés de cellules basales situées immédiatement sous la lame basale (Figure 21c). L'épithélium primaire comprend des cellules de pavement (Figure 20b) ainsi que des cellules spécialisées telles que les cellules à chlorure, de forme sphérique et présentant un cytoplasme vésiculaire, localisées dans la région basale des lamelles. Les cellules à globules, plus claires que les cellules à chlorure et riches en granules de mucus, sont dispersées dans tout l'épithélium (Figure 21c). Le filament branchial est traversé par des vaisseaux sanguins, dont le flux est régulé par les cellules à piliers (Figure 20b).

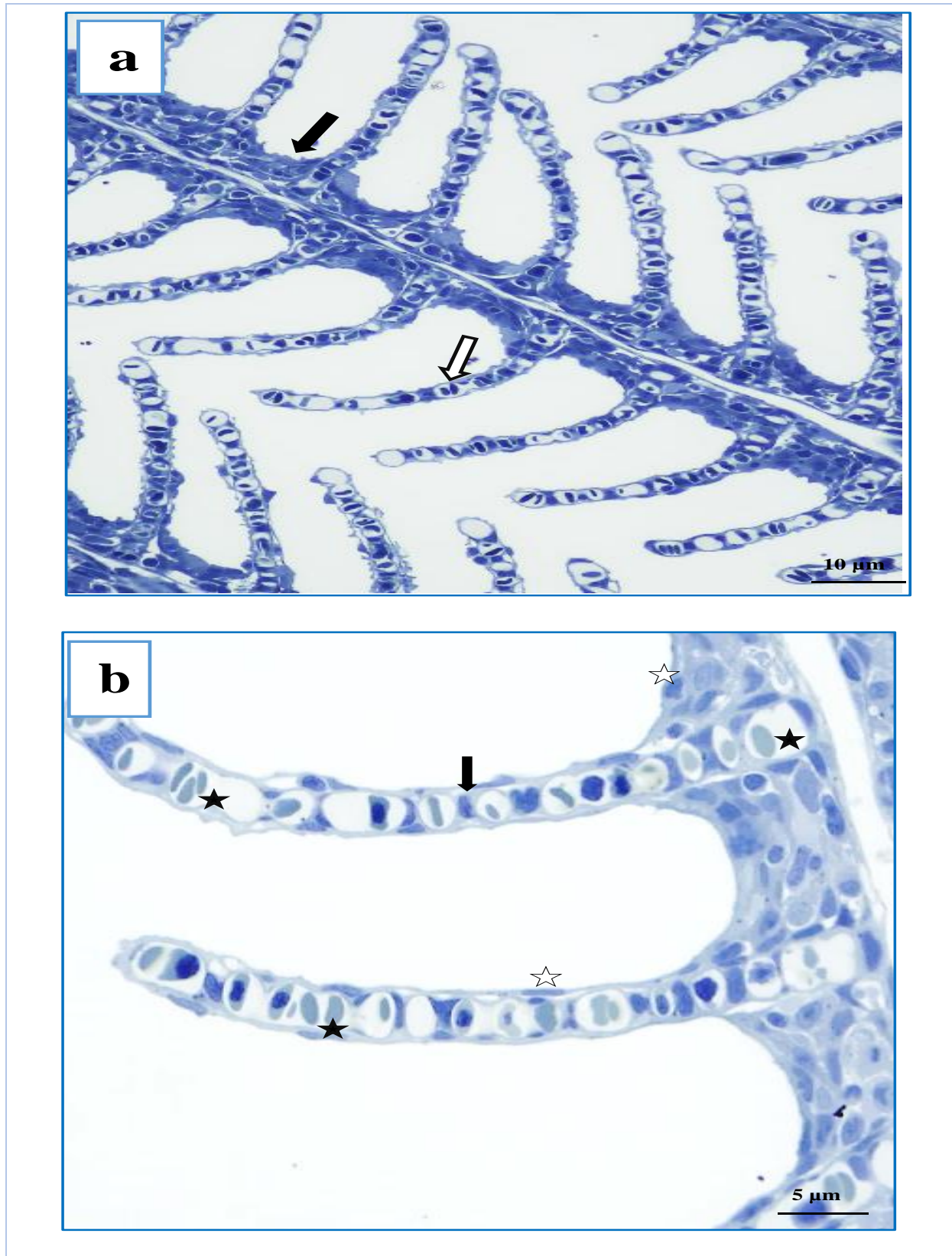


Figure 20. Micrographies des branchies des juvéniles d'*Alburnus alburnus* témoin. (1)
(a) Disposition normale des filaments branchiaux primaires (flèche noire) et secondaires (flèche blanche). (b) Présence de cellules pavimenteuses (étoiles blanches), de cellules piliers (flèche noire) et d'érythrocytes (étoiles noires).

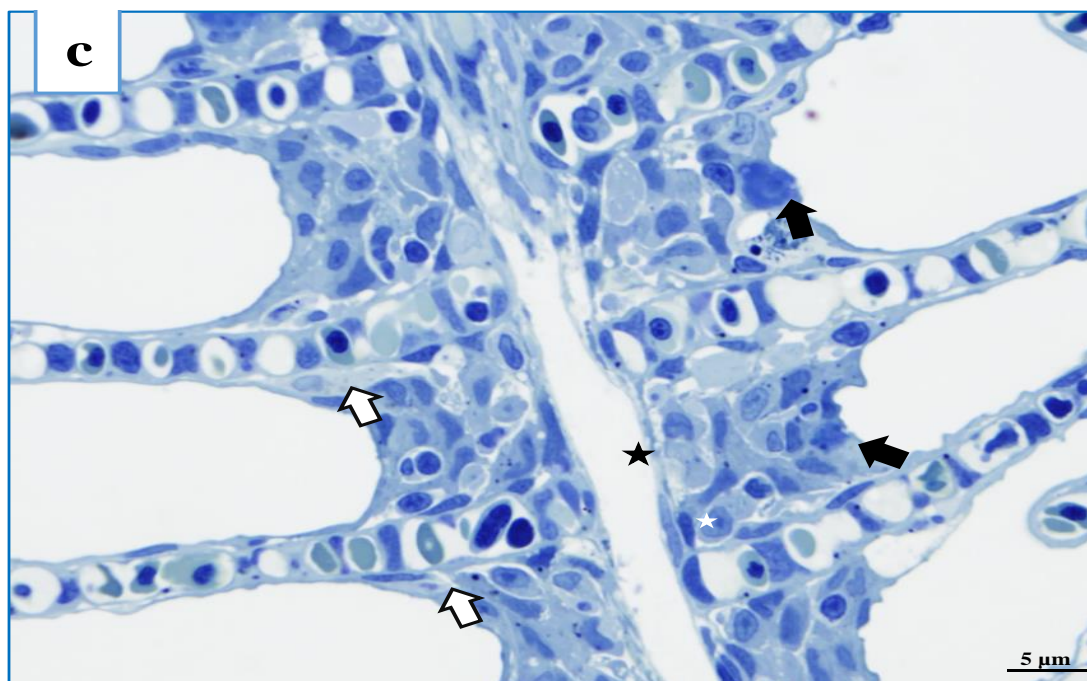


Figure 21. Micrographie des branchies des juvéniles d'*Alburnus alburnus* témoin (2).
 (c) Observation des cellules à mucus (flèches blanches), des cellules à chlorure (flèches noires) et des cellules basales (étoile blanche). Présence d'un vaisseau sanguin (étoile noire).

- **Chez le groupe à faible concentration (150 μg/L)**

L'exposition à une faible concentration d'acétamipride a induit de nombreuses altérations morphologiques par rapport au groupe témoin. Après 96 heures d'exposition et une détérioration de la structure générale des filaments (Figure 22a) et une vasodilatation des filaments primaires ont été observées (Figure 22a, b). À l'échelle cellulaire, une infiltration de leucocytes dans les filaments secondaires ainsi qu'une hyperplasie et une hypertrophie des cellules à chlorure et des cellules à globules ont été constatées sur le bord externe des filaments. Ces cellules se sont proliférées et dispersées le long des marges des filaments secondaires (Figure 22 et 23b, c). Les filaments secondaires présentaient diverses altérations, notamment un soulèvement de l'épithélium, la formation d'oedèmes, une hyperplasie et une reptation épithéliale, conduisant à d'importantes hémorragies (Figure 22, 23 et 25b, c, g). Certains filaments adoptaient une forme bouclée. Des anévrismes ont été observés à l'extrémité apicale des filaments, provoquant une congestion (Figure 23 et 24 d, f). Une atrophie et une dégénérescence des cellules à piliers ont été constatées dans les filaments secondaires (Figure 24e). Dans les filaments primaires, des signes d'atrophie et de dégénérescence de certaines cellules ont été relevés, accompagnés de la formation de larges espaces interlamellaires et de vacuoles intra-épithéliales (Figure 25h). Une congestion marquée était également visible dans le système veineux central (Figure 26i).

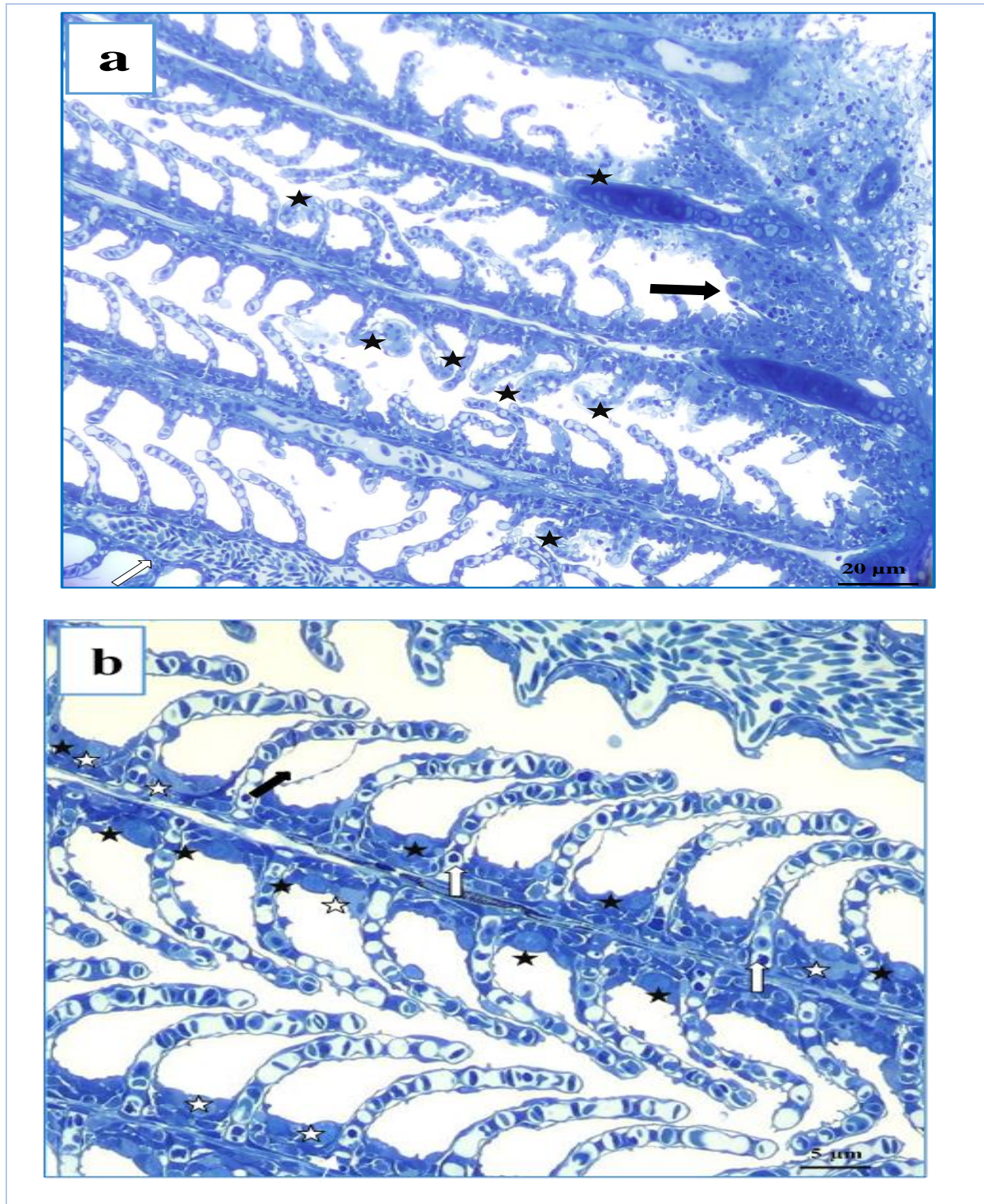


Figure 22. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (1).

(a) Hypertrophie de la région basale des lamelles primaires (flèche noire), déformation de la structure des lamelles secondaires (étoiles) et vasodilatation des vaisseaux sanguins (flèche blanche). (b) Hyperplasie et hypertrophie des cellules à chlorure (étoiles noires) et des cellules à mucus (étoiles blanches), œdème lamellaire (flèche noire) et infiltration leucocytaire (flèches blanches).

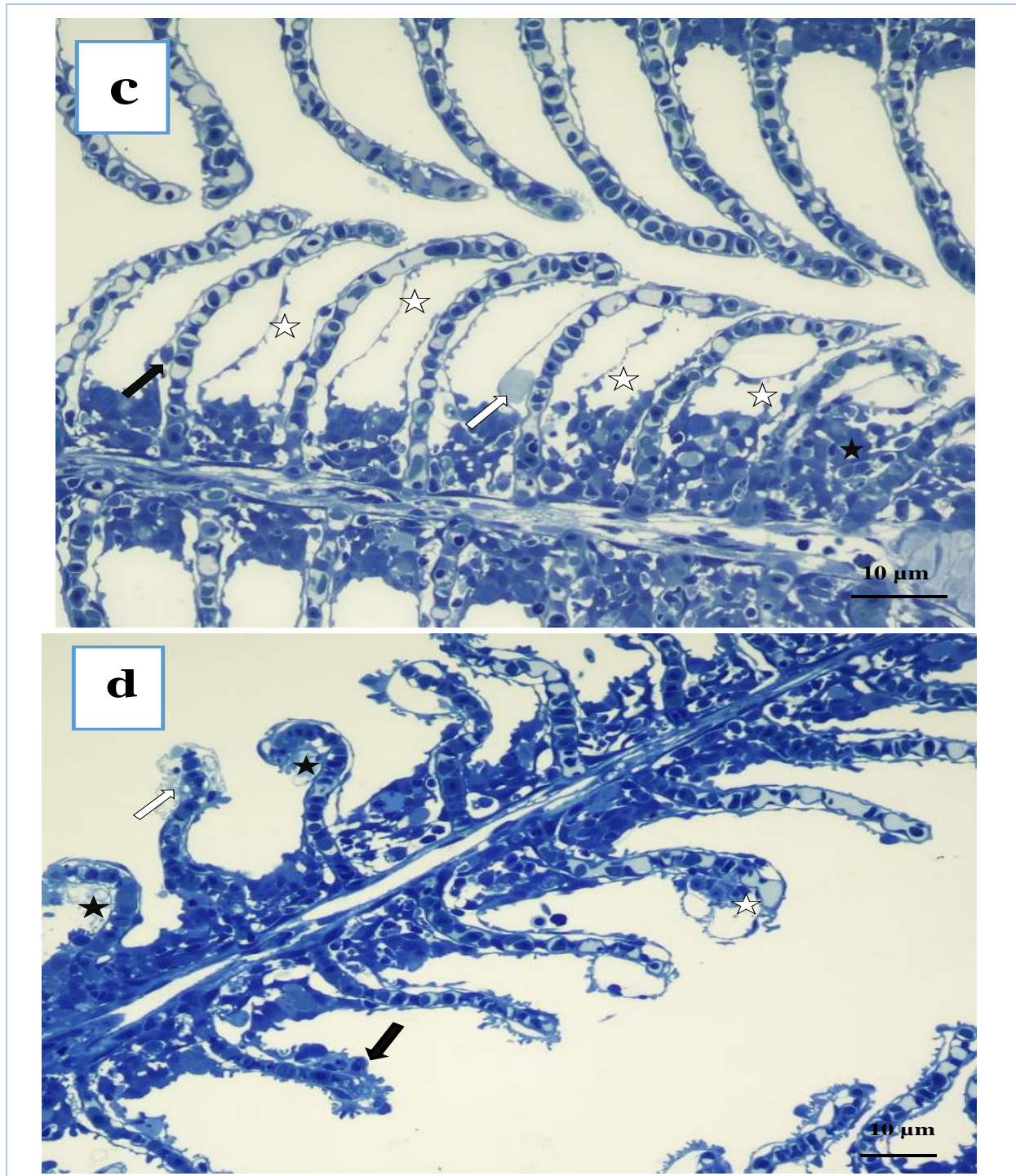


Figure 23. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (2).

(c) Soulèvement épithélial des lamelles secondaires (étoiles blanches), fusion des lamelles primaires (étoile noire), migration des cellules à chlorure (flèche noire) et des cellules à mucus (flèche blanche) vers les lamelles secondaires.(d) Courbure des lamelles secondaires (étoiles noires), formation d'anévrismes (étoile blanche), hyperplasie épithéliale dans les lamelles secondaires (flèche noire) et dégénérescence de l'épithélium lamellaire (flèche blanche).

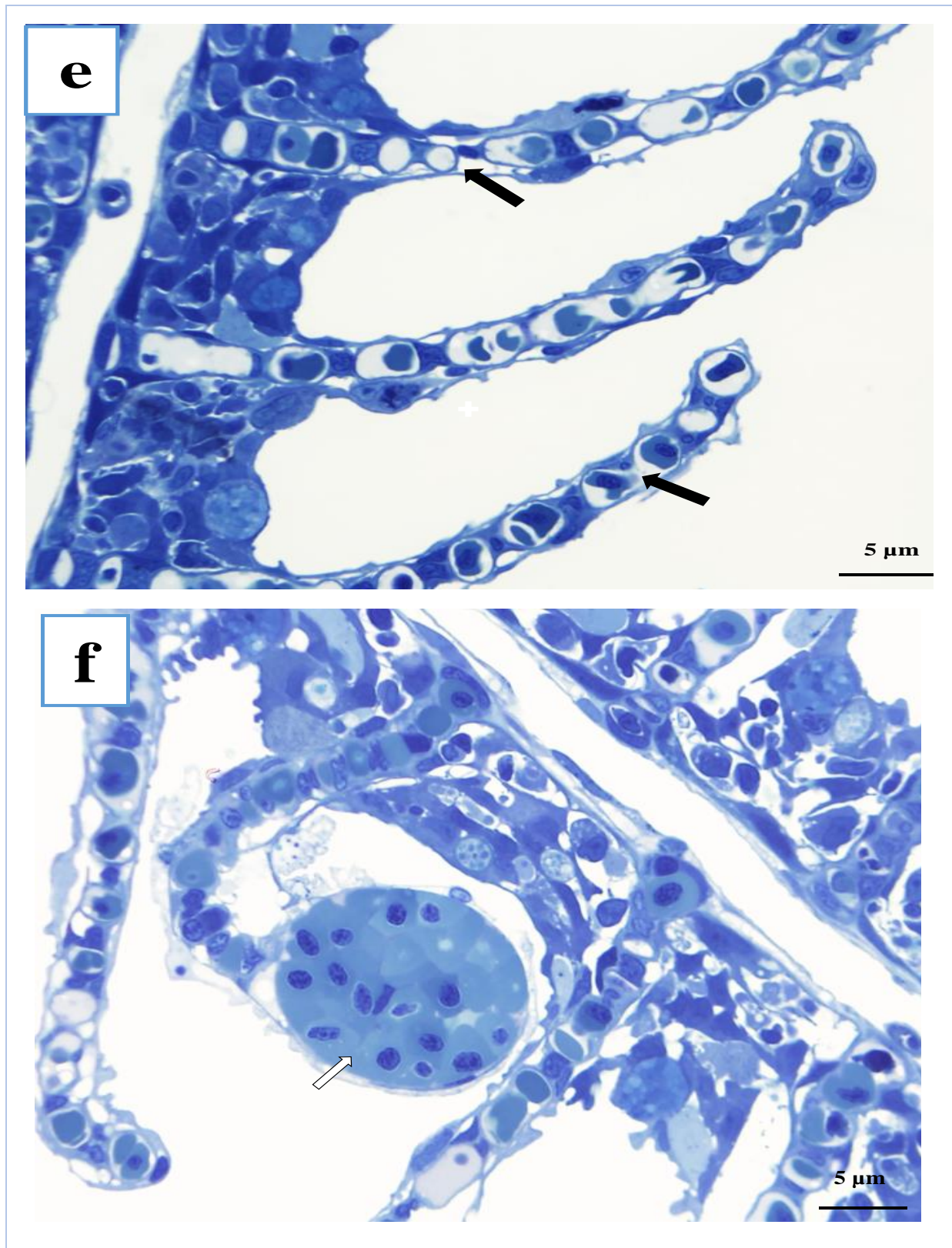


Figure 24. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(3).

(e) Dégénérescence des cellules piliers (flèches). (f) Congestion sanguine dans la région apicale du filament secondaire (flèche).

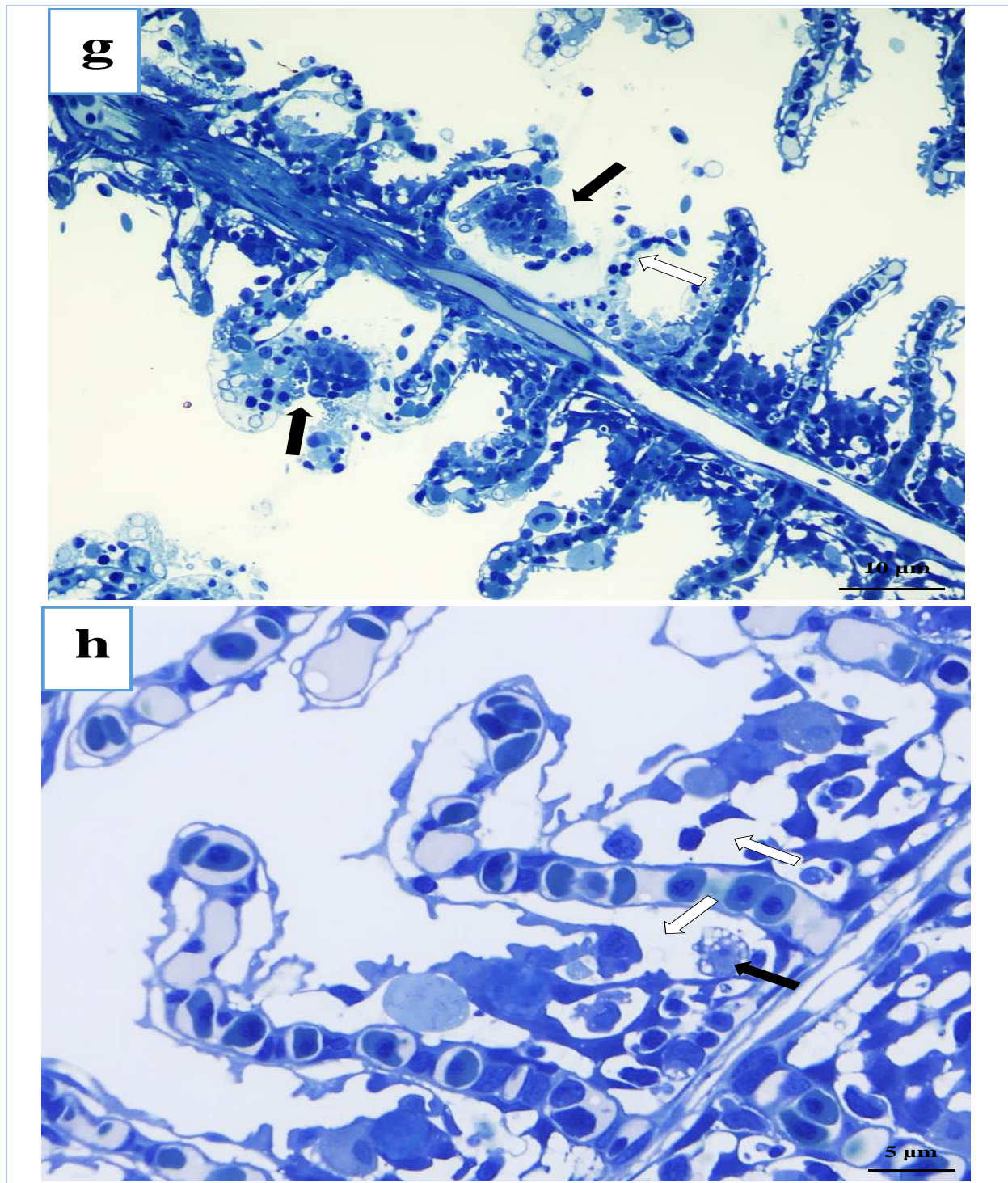


Figure 25. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(4).

(g) Hyperplasie et reptation de l'épithélium du filament secondaire entraînant une hémorragie majeure (flèches noires). Présence d'un anévrisme lamellaire caractérisé par une extravasation sanguine hors de la lamelle secondaire (flèche blanche). (h) Présence de cellules nécrotiques (flèche noire) et de larges lacunes intraépithéliales (flèches blanches).

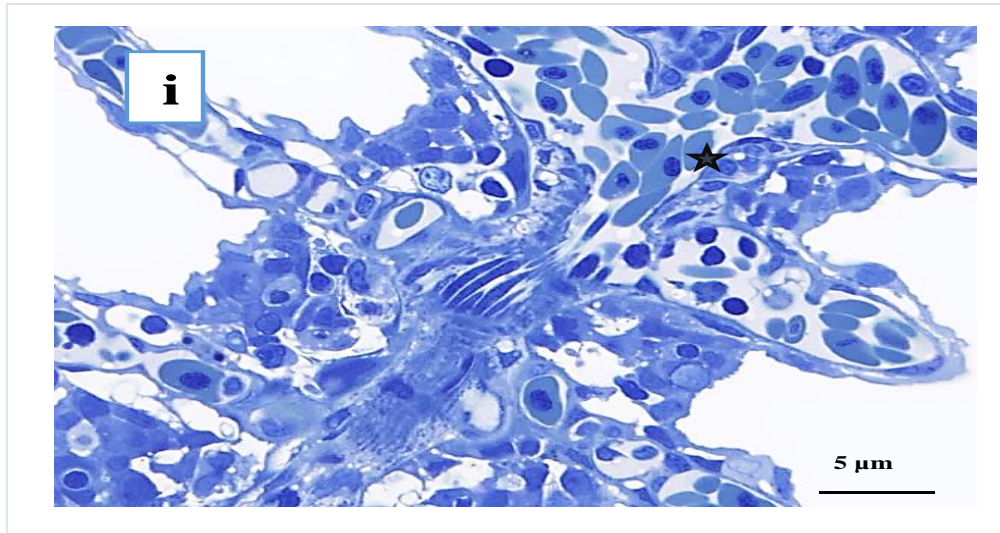


Figure 26. Micrographie des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(5).

(i) Congestion du sinus veineux central (étoile noire).

- **Chez le groupe à forte concentration (300 µg/L)**

Après 96 heures d'exposition à une concentration élevée d'acétamipride, l'analyse histologique a révélé une destruction marquée de l'architecture des lamelles branchiales par rapport aux groupes à faible concentration et témoin. Une vasodilatation accrue et une congestion sanguine marquée dans la région apicale des lamelles ont été observées, ainsi que la présence de grands kystes parasitaires (Figure 27, 28 et 29 a, b, f). De vastes espaces se sont formés entre le cartilage et les lamelles primaires (Figure 27 b). La vascularisation des lamelles était interrompue dans la plupart des cas (Figure 27, 28). Une fusion apicale totale des lamelles était présente sur l'ensemble des filaments primaires (Figure 28). Une prolifération intense de leucocytes a été notée, avec une augmentation significative de leur nombre par rapport au groupe à faible concentration (Figure 28d). Les anévrismes étaient nombreux aux extrémités supérieures des filaments secondaires (Figure 29, 30 et 31 e, h, i). Une atrophie de nombreux filaments secondaires a été signalée, certains apparaissant hypertrophiés et collés les uns aux autres, tandis que d'autres étaient courbés (Figure 29 et 30 e, g). Une migration et une hyperplasie des cellules à globules ont été relevées (Figure 30 h). L'hypertrophie des cellules à chlorure a conduit à leur immersion et à leur atrophie dans la couche interne des lamelles primaires, certaines de ces cellules ayant migré vers la partie supérieure des lamelles secondaires (Figure 30 h). De nombreuses cellules présentaient des signes d'atrophie, formant de larges lacunes, et des cellules nécrosées étaient présentes dans de nombreuses lamelles secondaires (Figure 32j, k).

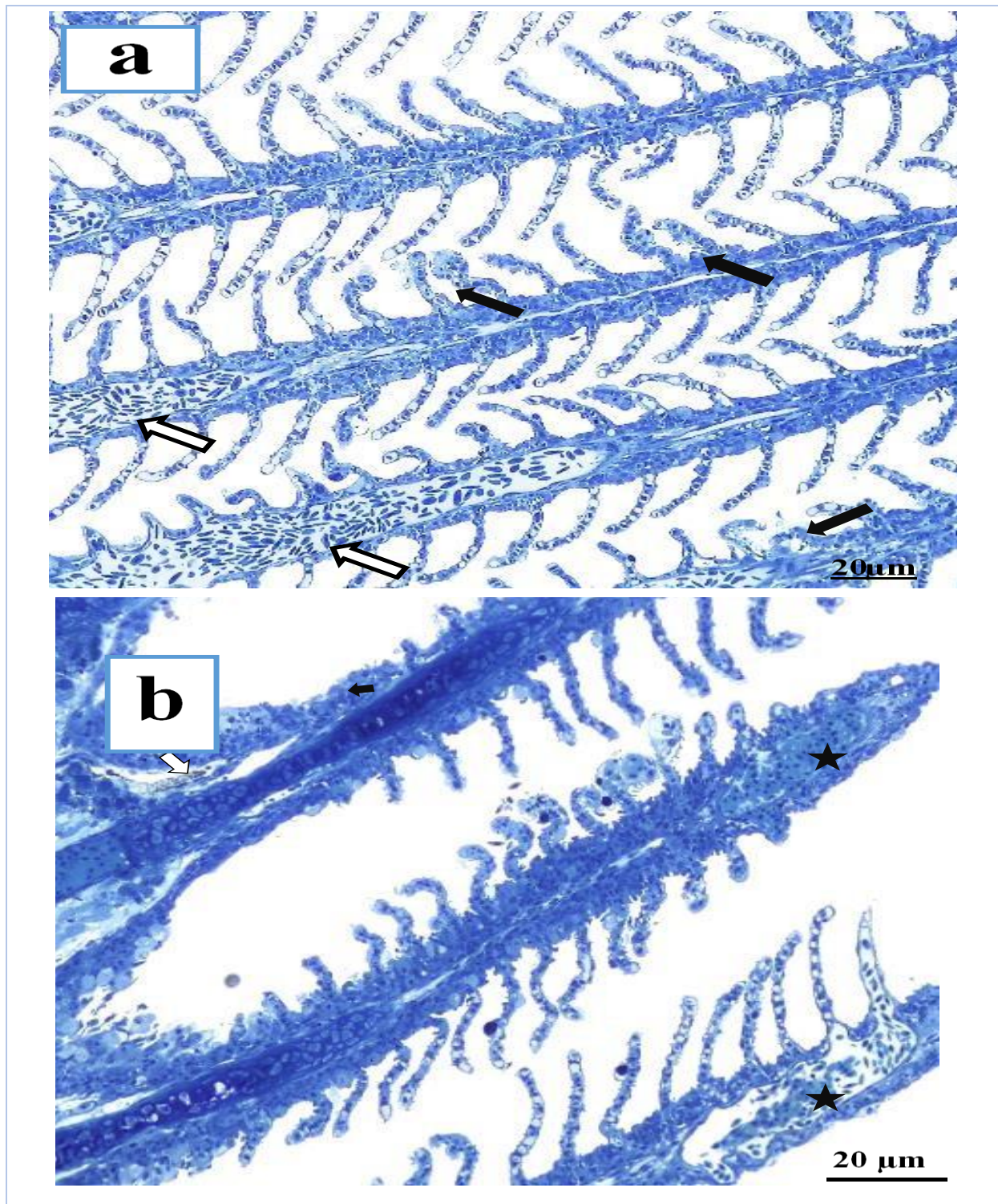


Figure 27. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (1).

(a) Déformation structurelle de nombreux filaments branchiaux (flèches noires), vasodilatation marquée des vaisseaux sanguins (flèches blanches) et présence de cartilage (étoile blanche). (b) Apparition d'espaces intertissulaires anormaux (flèche noire), hypertrophie de la région basale des lamelles primaires (flèche blanche) et congestion marquée dans les zones apicales des vaisseaux sanguins (étoiles noires).

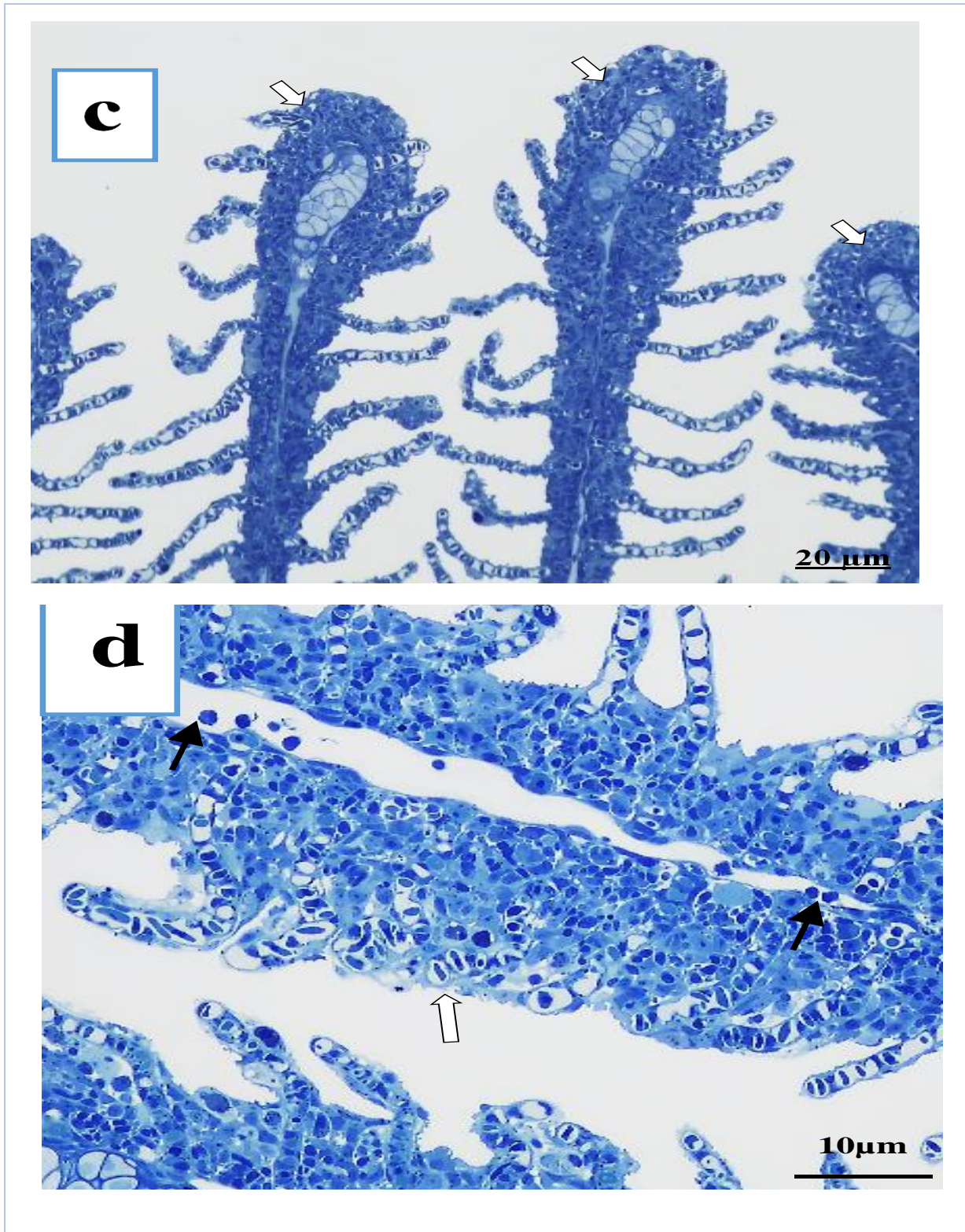


Figure 28. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(2).

(c) Fusion apicale de plusieurs filaments primaires (flèches). (d) Prolifération leucocytaire (flèches noires) et fusion complète de plusieurs lamelles secondaires (flèche blanche).

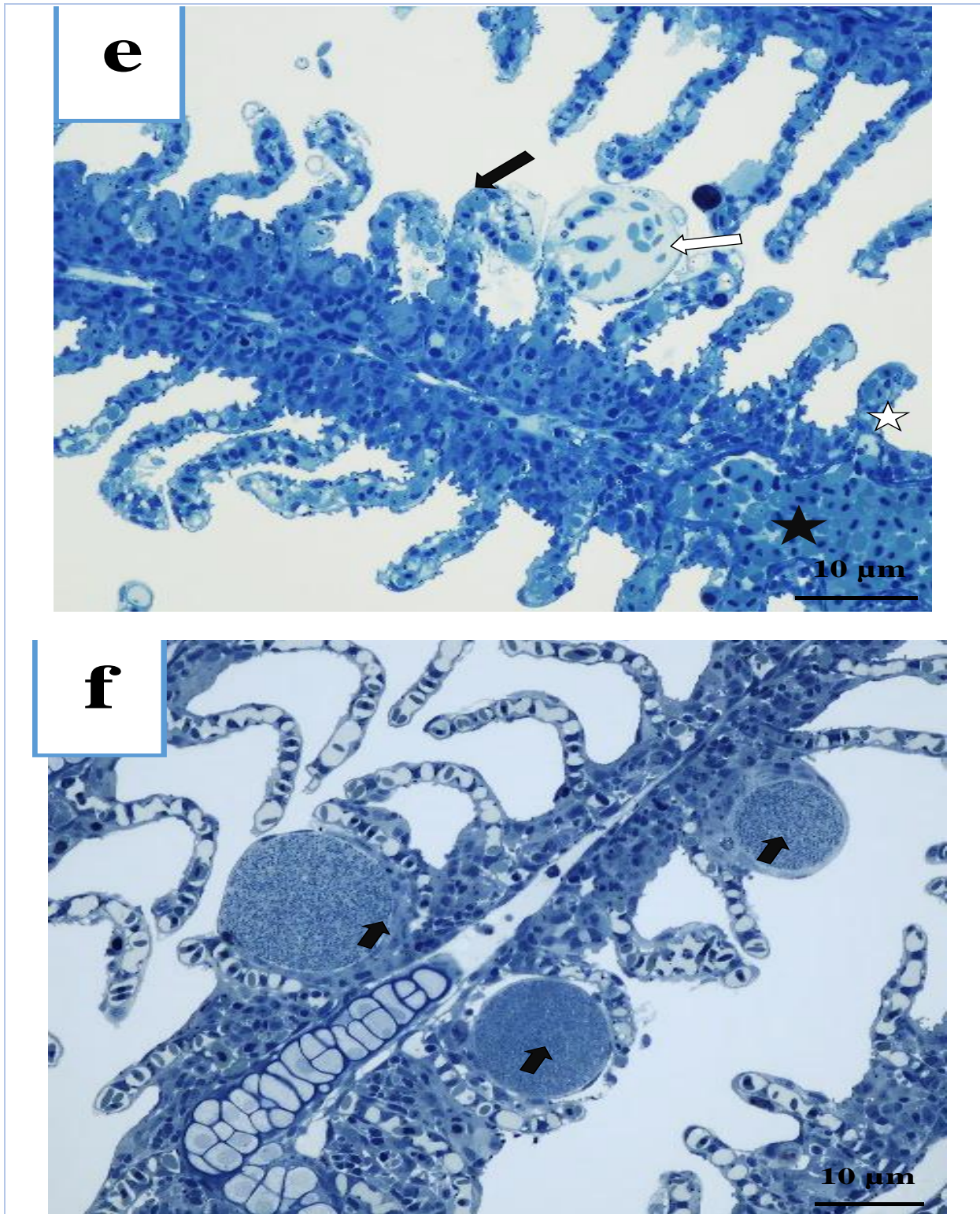


Figure 29. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (3).

(e) Raccourcissement et atrophie des lamelles secondaires (étoile blanche), formation d'anévrismes (flèche blanche), enroulement des lamelles secondaires (flèche noire) et congestion (étoile noire). (f) Présence de kystes parasitaires (flèches noires).

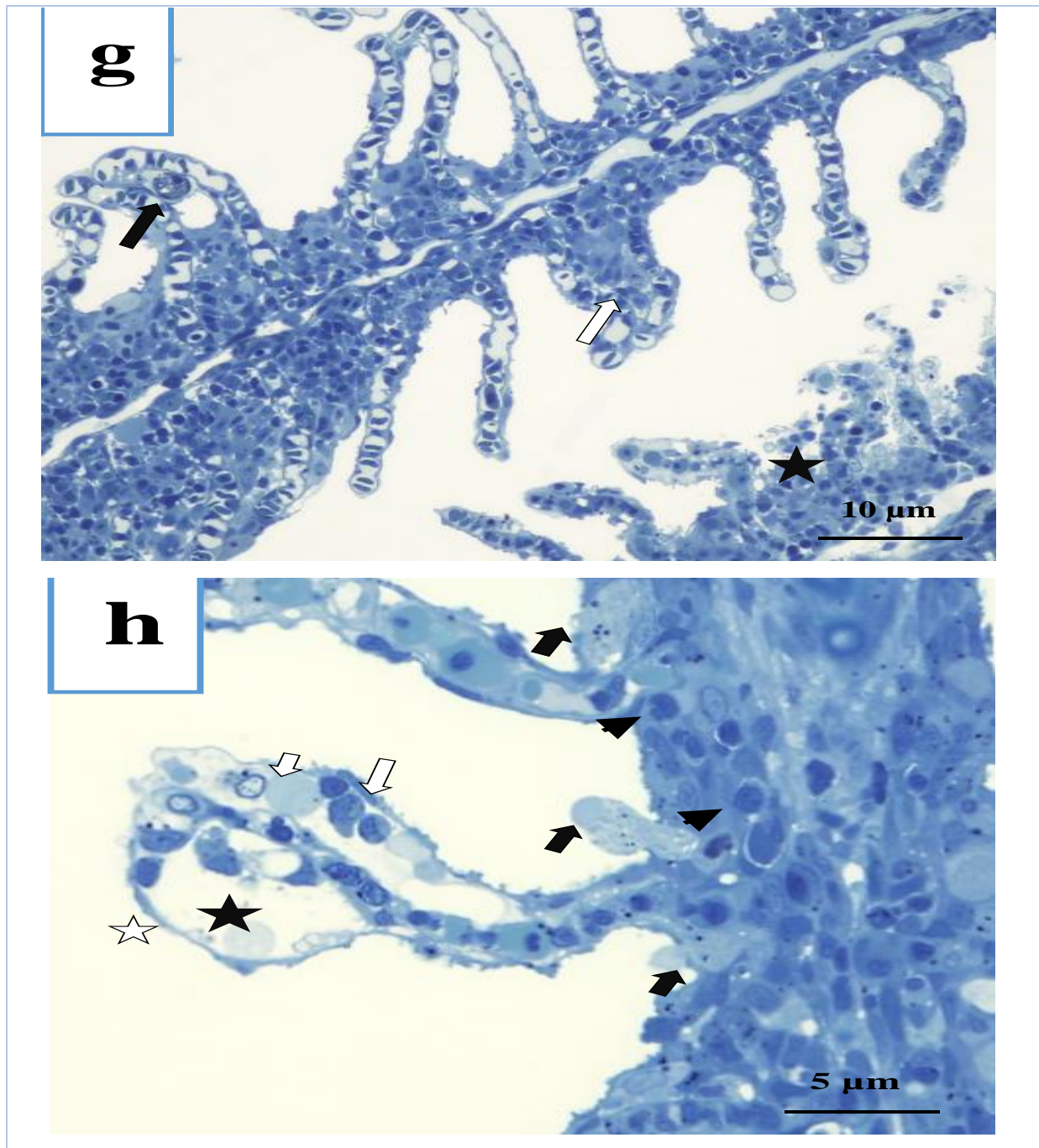


Figure 30. Microphotographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(4).

(g) Fusion apicale de deux filaments secondaires (flèche noire), fusion complète des lamelles secondaires (flèche blanche), hyperplasie et reptation épithéliale conduisant à une hémorragie importante (étoile noire). (h) Soulèvement épithélial des lamelles secondaires (étoile blanche), œdème interlamellaire (étoile noire), hyperplasie et hypertrophie des cellules à mucus (flèches noires), atrophie et immersion des cellules à chlorure dans la couche interne des lamelles primaires (têtes de flèches), migration des cellules à mucus (flèche blanche courte) et des cellules à chlorure (flèche blanche longue).

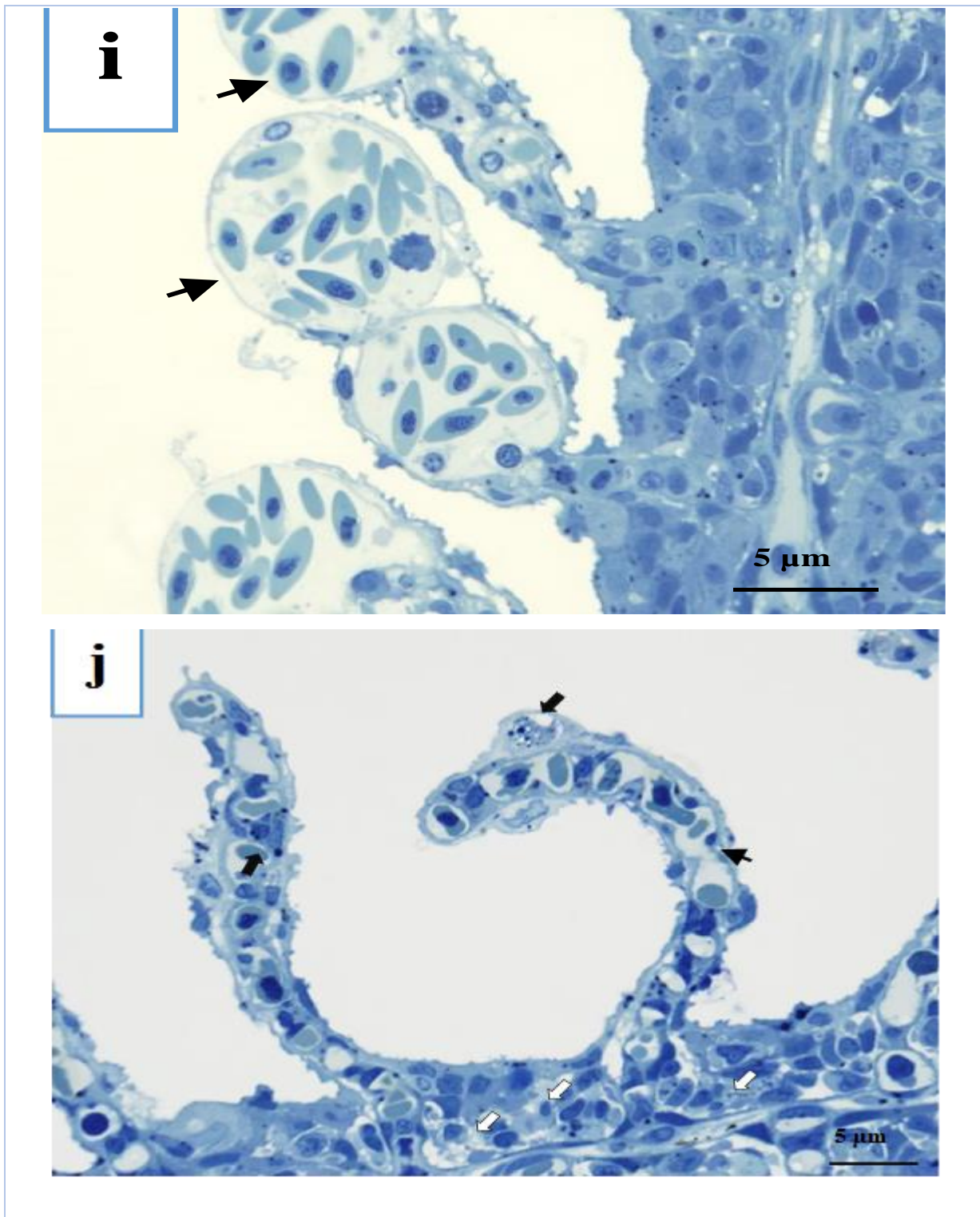


Figure 31. Micrographies des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(5).

(i) Les anévrismes des extrémités supérieures des filaments secondaires **(j)** Présence de cellules apoptotiques (flèches noires), atrophie et dégénérescence des cellules filamentaires primaires (flèches blanches).

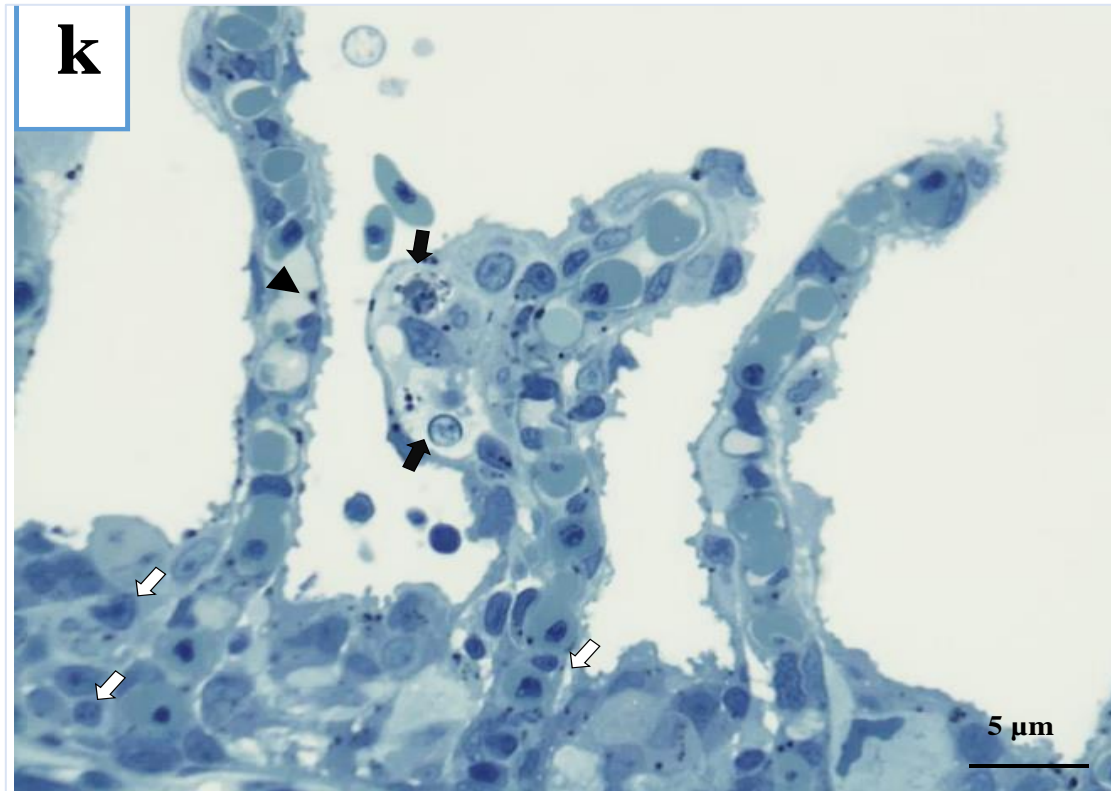


Figure 32. Micrographie des branchies d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (6).

(k) Présence de cellules apoptotiques (flèches noires), atrophie et dégénérescence des cellules piliers (tête de flèche) et des cellules filamenteuses primaires (flèches blanches).

3.3.2. Changements histologiques de foie

La morphologie hépatique des cyprinidés a été précédemment décrite (Macirella *et al.*, 2016). Dans le groupe témoin, le parenchyme hépatique présente une structure homogène et compacte, avec des hépatocytes bien organisés. Les vaisseaux sanguins sont riches en globules rouges (Figures 33A et 34B), et de petites voies biliaires se propagent à travers le tissu hépatique (Figure 34C). Les globules rouges sont visibles dans la lumière des sinusoides et des vaisseaux (Figures 33B et 34C). Les cellules hépatiques possèdent un gros noyau proéminent en position centrale (Figure 33B), des granules de glycogène dispersés dans le cytoplasme ainsi que quelques gouttelettes lipidiques (Figure 34C). Aucune anomalie morphologique n'a été observée dans ce groupe.

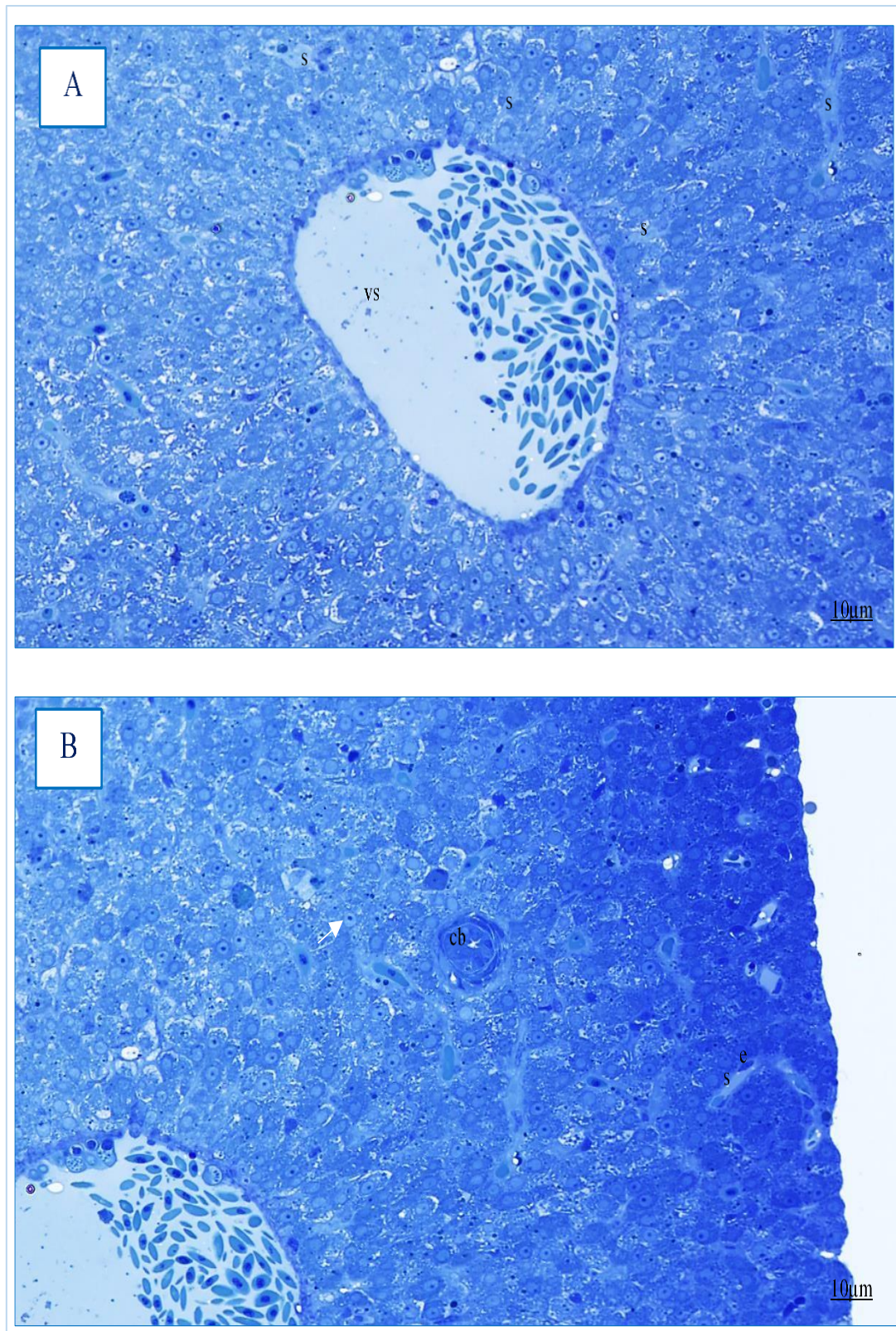


Figure 33. Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* dans le groupe témoin (1).
(A, B) vaisseau sanguin (vs), sinusoides (s), canal biliaire (cb), endothéliale (e).

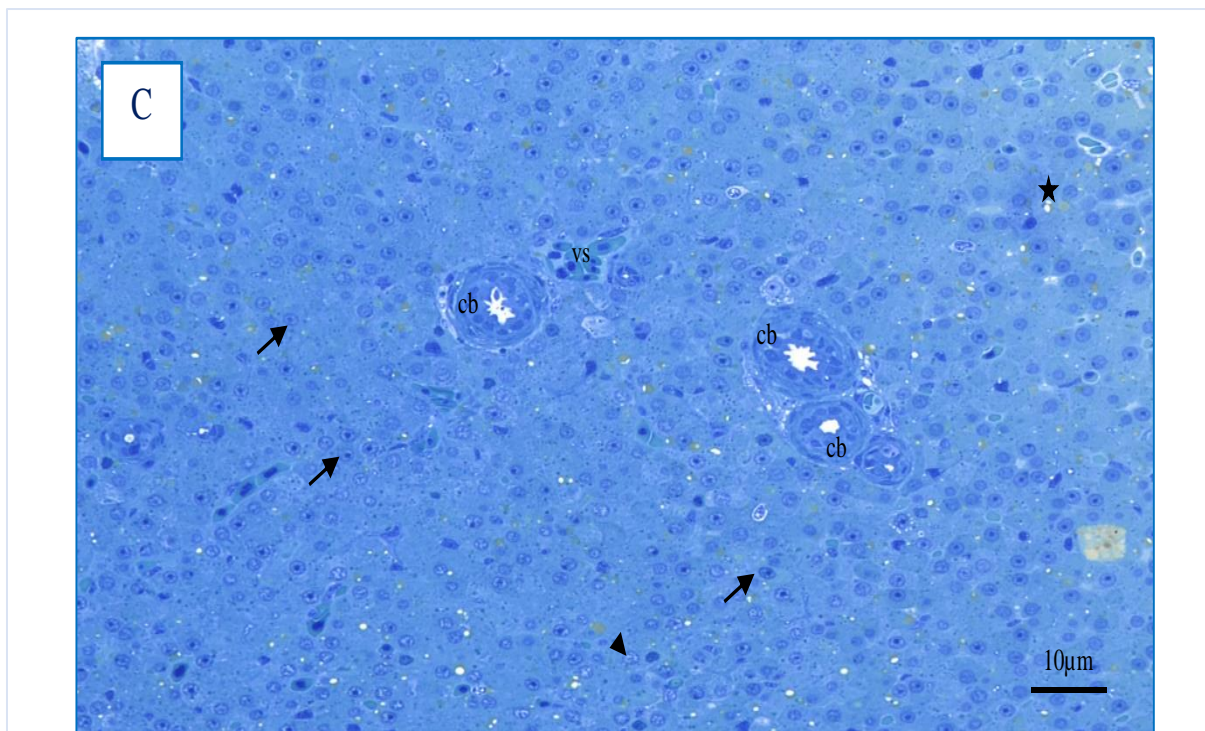


Figure 34. Micrographie du foie d'*Alburnus alburnus* dans le groupe témoin (2).

(C) vaisseau sanguin (vs), canal biliaire (cb), hépatocytes (flèche noire), granules de glycogène (tête de flèche noire), gouttelettes lipidiques (étoile noire), noyau (flèche blanche).

- **Chez le Groupe à faible concentration (150 μg/L)**

L'exposition des alevins d'*Alburnus alburnus* à 150 μg/L d'acétamipride pendant 96 heures a entraîné des altérations structurelles notables du tissu hépatique. Un cytoplasme clarifié a été observé dans la majorité des échantillons (Figure 35 A), accompagné d'une infiltration leucocytaire (Figure 36 C). De plus, une obstruction des voies biliaires (Figure 35 A) ainsi qu'une dégénérescence de leurs cellules épithéliales (Figure 34 C) ont été relevées. La congestion des vaisseaux sanguins (Figure 36 D), l'apparition des zones de lyse de parenchyme hépatiques (Figure 35 B), une vacuolisation cytoplasmique (Figure 35A) et des stéatoses adjacentes aux voies biliaires (Figure 36 C) ont été observées. En outre, une fibrose sinusoidale (Figure 35 B) et une dégénérescence du parenchyme hépatique (Figure 36 C) ont été identifiées.

Des hépatocytes apoptotiques et nécrotiques étaient fréquemment observés dans le parenchyme (Figure 37 E). Notamment, les cellules en apoptose étaient identifiées par une condensation du noyau et du cytoplasme (Figure 37 E), alors que les hépatocytes nécrotiques montraient un gonflement cellulaire (Figure 37 E). L'épithélium qui recouvre les voies biliaires s'est détaché du tissu conjonctif sous-jacent, et les cellules de forme cubique semblaient

Résultats

dégénérées (Figure 38 G). L'espace périsinusoïdal entre les sinusoides et les hépatocytes semble plus épais (Figure 37 F) ; par ailleurs, on observe une prolifération des macrophages au sein du parenchyme (Figure 37 F).

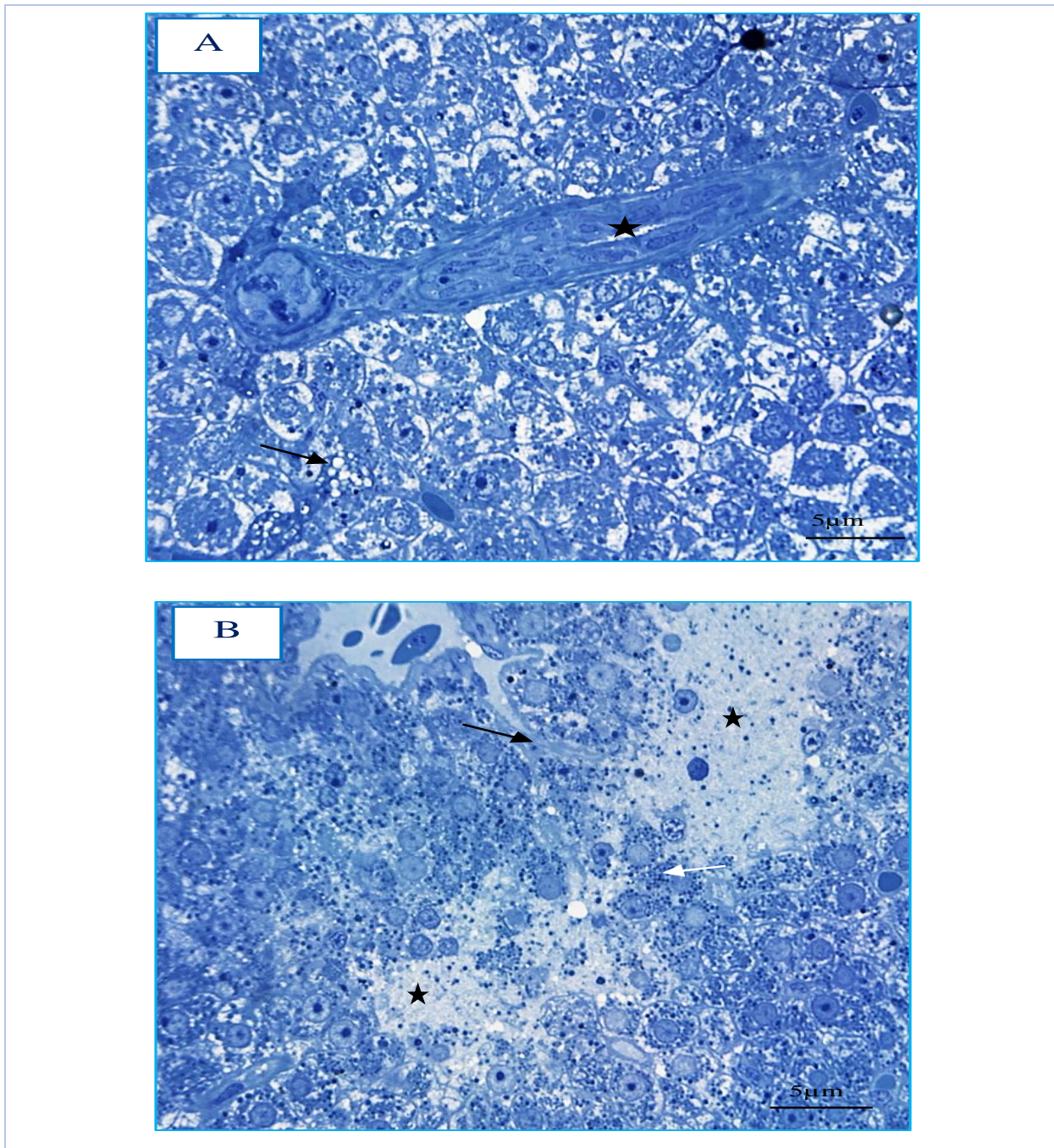


Figure 35. Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(1).

(A) Hyperplasie de l'épithélium des voies biliaires (étoile noire), vacuolisation cytoplasmique (flèche noire). (B) Infiltration leucocytaire massive (flèche blanche), zone de lyse de parenchyme hépatique (étoile noire), fibrose sinusoidale (flèche noire).

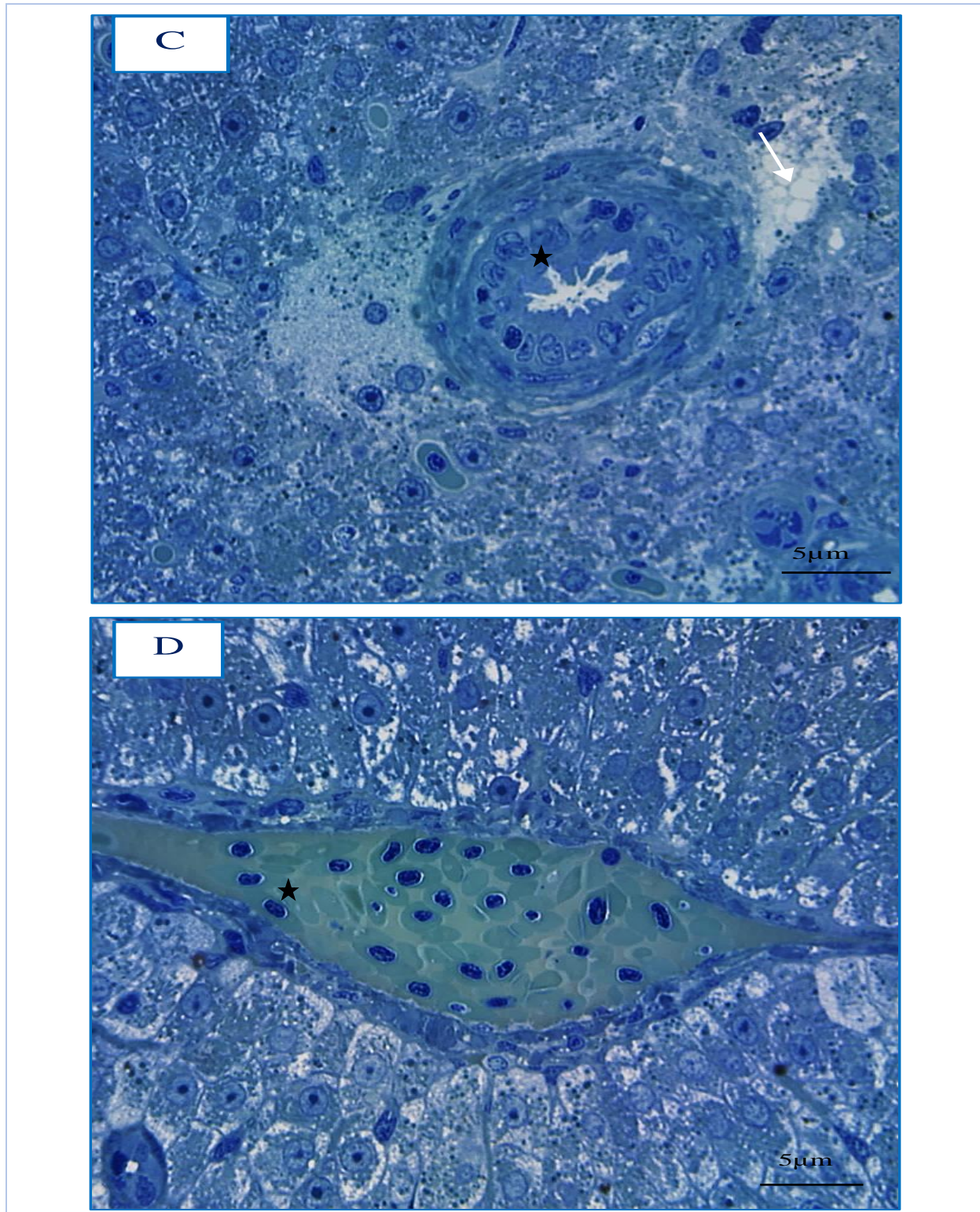


Figure 36 .Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(2).

(C) Dégénérescence du parenchyme hépatique (flèche blanche), dégénérescence de la paroi des canaux biliaires (étoile noire). (D) Congestion des vaisseaux sanguins (étoile noire).

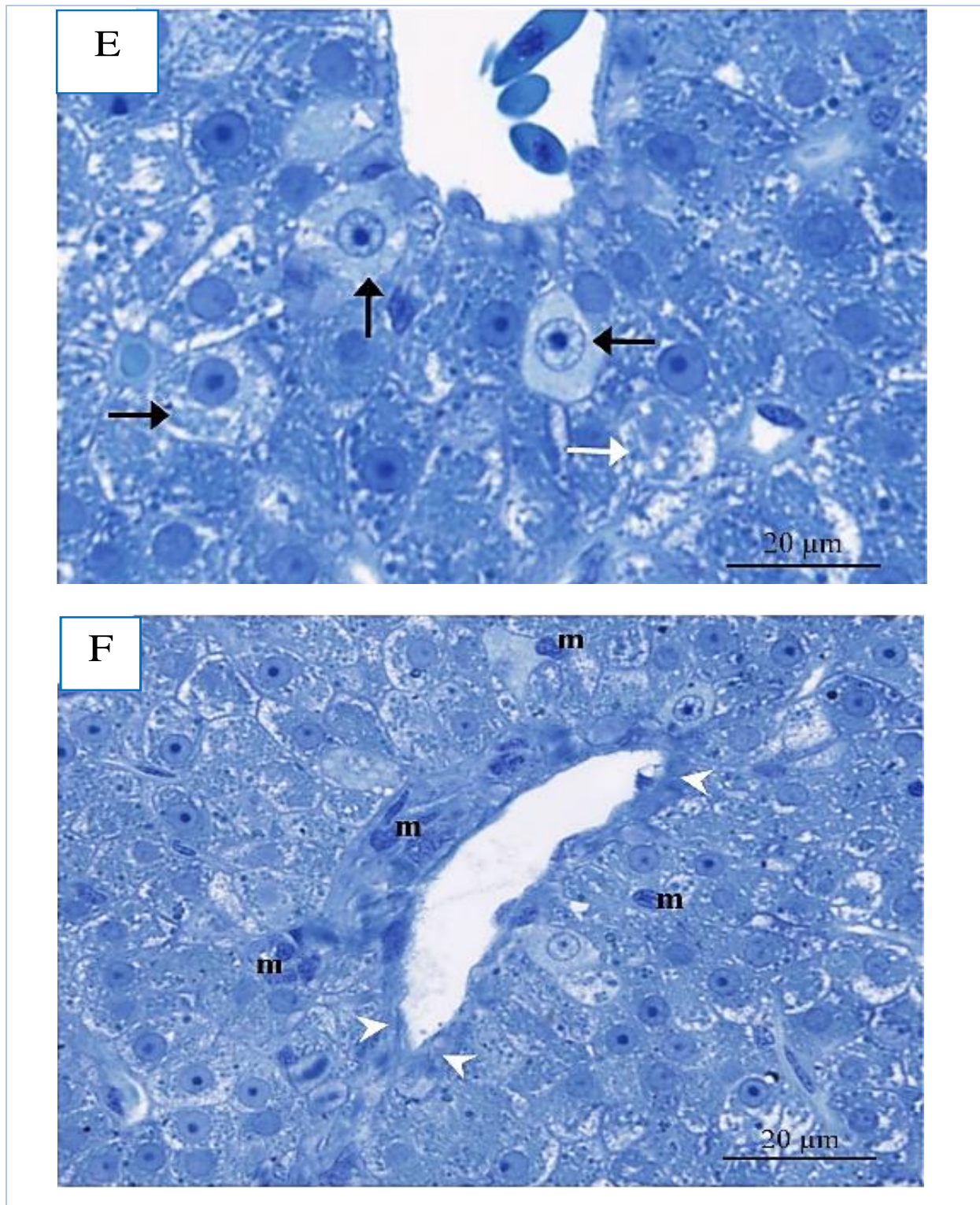


Figure 37.Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (3).

(E) cellules nécrotiques (flèche noire), cellules apoptotiques (flèche blanc). (F) prolifération des macrophages (m),épaississement de l'espace présinusoidale (tête de flèche blanc)

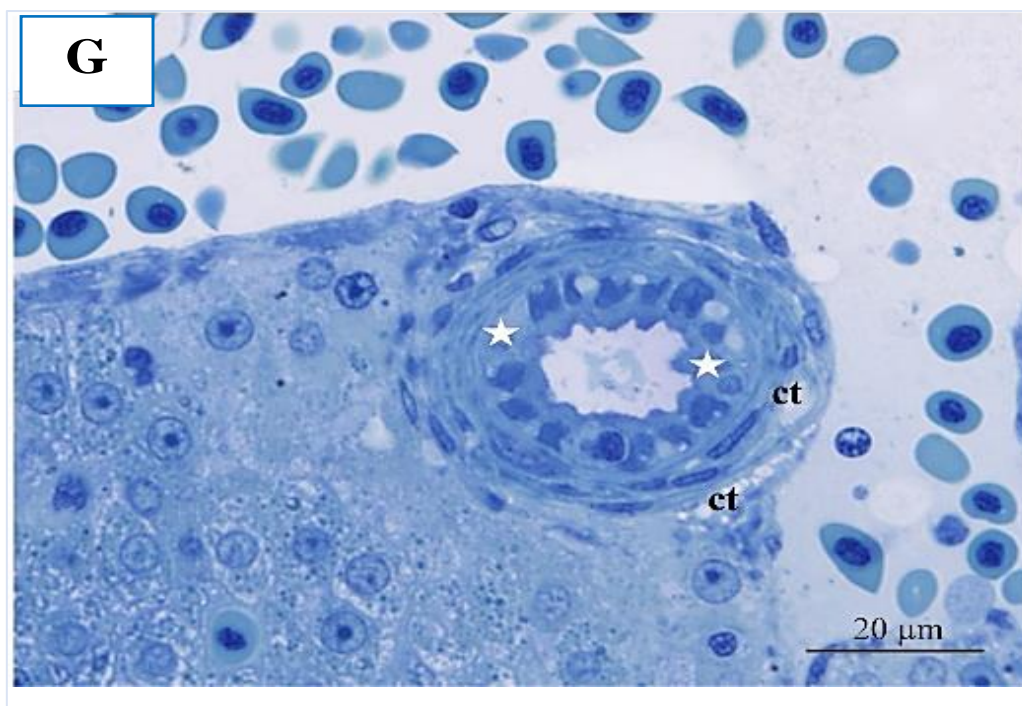


Figure 38 .Micrographie du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride.

(G) détachement de l'épithélium biliaire du tissu conjonctif (ct), dégénérescence des cellules cuboïdes (étoile blanche)

- **Chez le groupe à forte concentration (300 µg/L)**

L'exposition à 300 µg/L d'acétamipride pendant 96 heures a entraîné des altérations hépatiques plus sévères. On observe une coagulation du sang dans certains vaisseaux (Figure 39A) et une accumulation sanguine dans d'autres (Figure 40D). La structure hépatique présente un aspect spongieux en raison de l'apparition de larges lacunes (Figure 39B). De grands abcès hépatiques (Figure 40C) et une inflammation marquée (Figure 41E) ont été relevés, accompagnés d'une agrégation de macrophages (Figure 41E). La présence de cellules nécrotiques, apoptotiques et stéatosiques a été observée, ainsi qu'une dégénérescence des canaux sinusoidaux (Figure 39 B). Une hyperplasie de l'épithélium des voies biliaires (Figure 41E) et une désorganisation de la structure compacte du parenchyme hépatique, due à la dégénérescence des hépatocytes (Figure 41E), ont été constatées.

De vastes zones lysées étaient manifestes dans le parenchyme et à proximité des sinusoides (Figure 42 G). L'occlusion des vaisseaux et des sinusoides, particulièrement grave, a été observée avec un grand nombre d'érythrocytes et de macrophages repérés dans leur

Résultats

lumière (Figure 42 G). La prolifération des macrophages était visible dans le parenchyme hépatique (Figures 41 E et F).

Dans ce groupe la structure du canal biliaire a subi des modifications sévères ; on remarquait particulièrement la réduction de la lumière du canal biliaire et la dégénérescence des cellules cuboïdes (Figure 41 E).

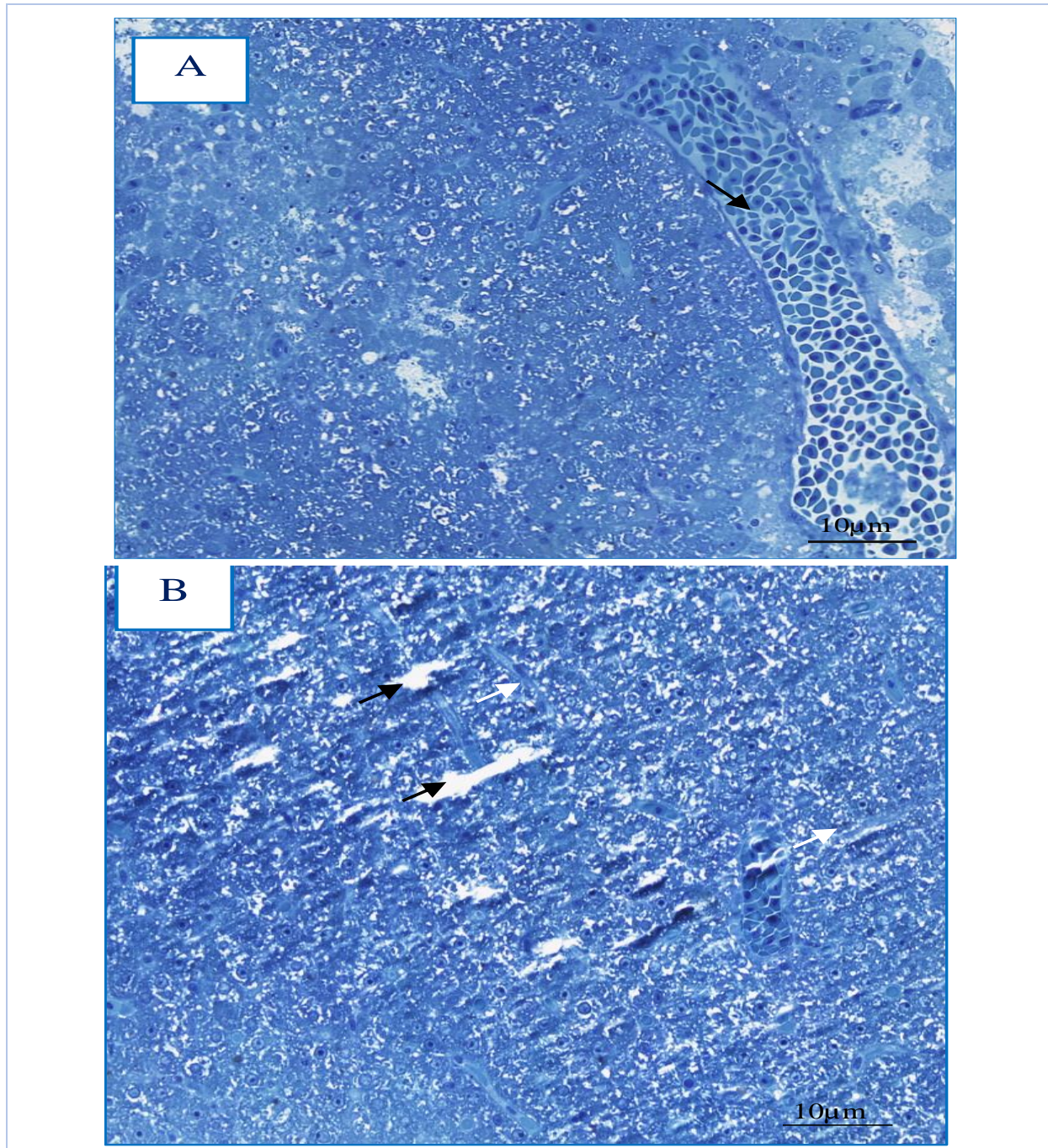


Figure 39 .Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride (1).

(A) Coagulation sanguine dans les vaisseaux (étoile noire). (B) Formation de larges lacunes conférant un aspect spongieux (flèche noire).

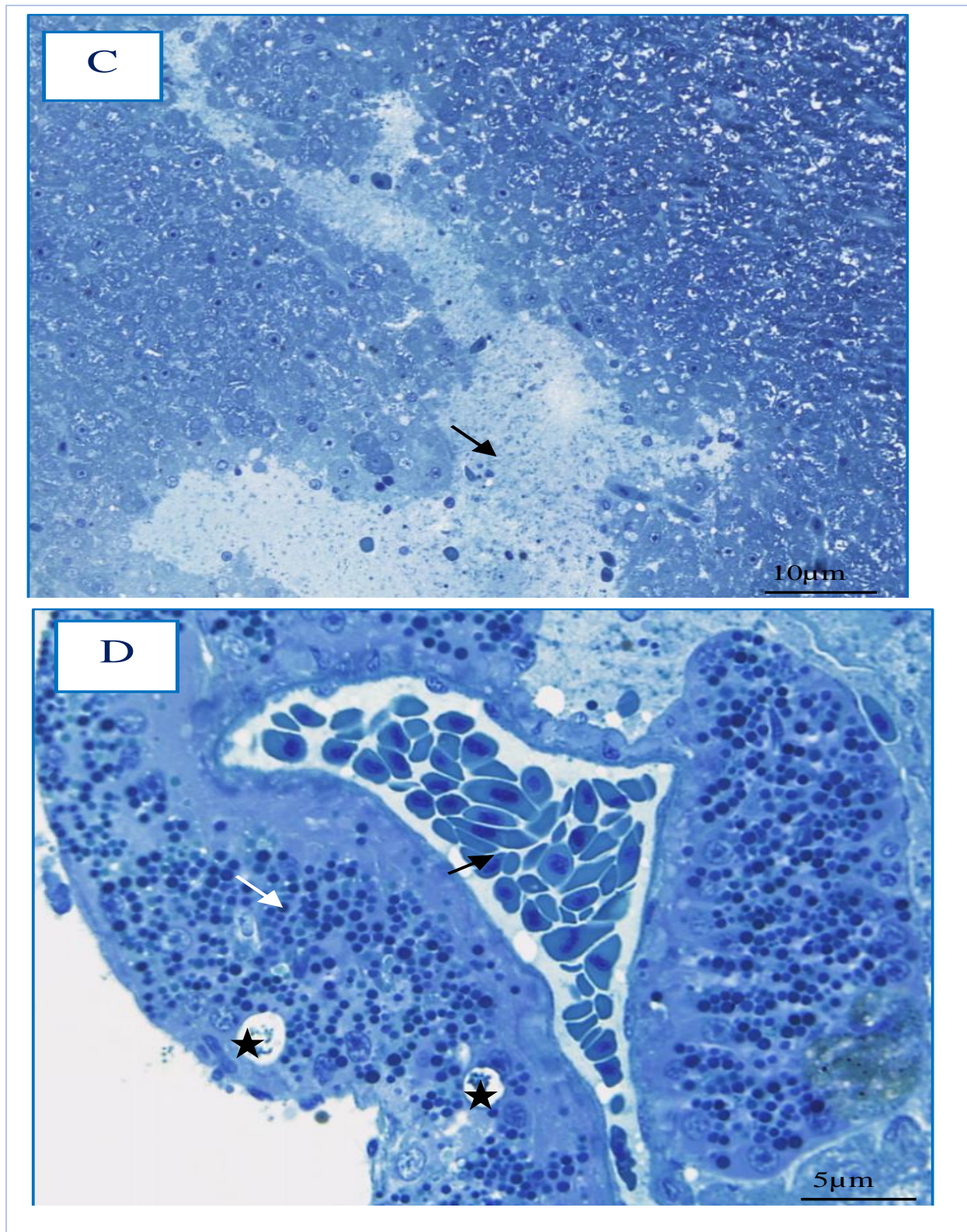


Figure 40 .Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride(2).

(C) Abscès hépatique (flèche noire). (D) Stéatose (étoile noire), congestion des vaisseaux sanguins (étoile noire), inflammation (flèche blanche).

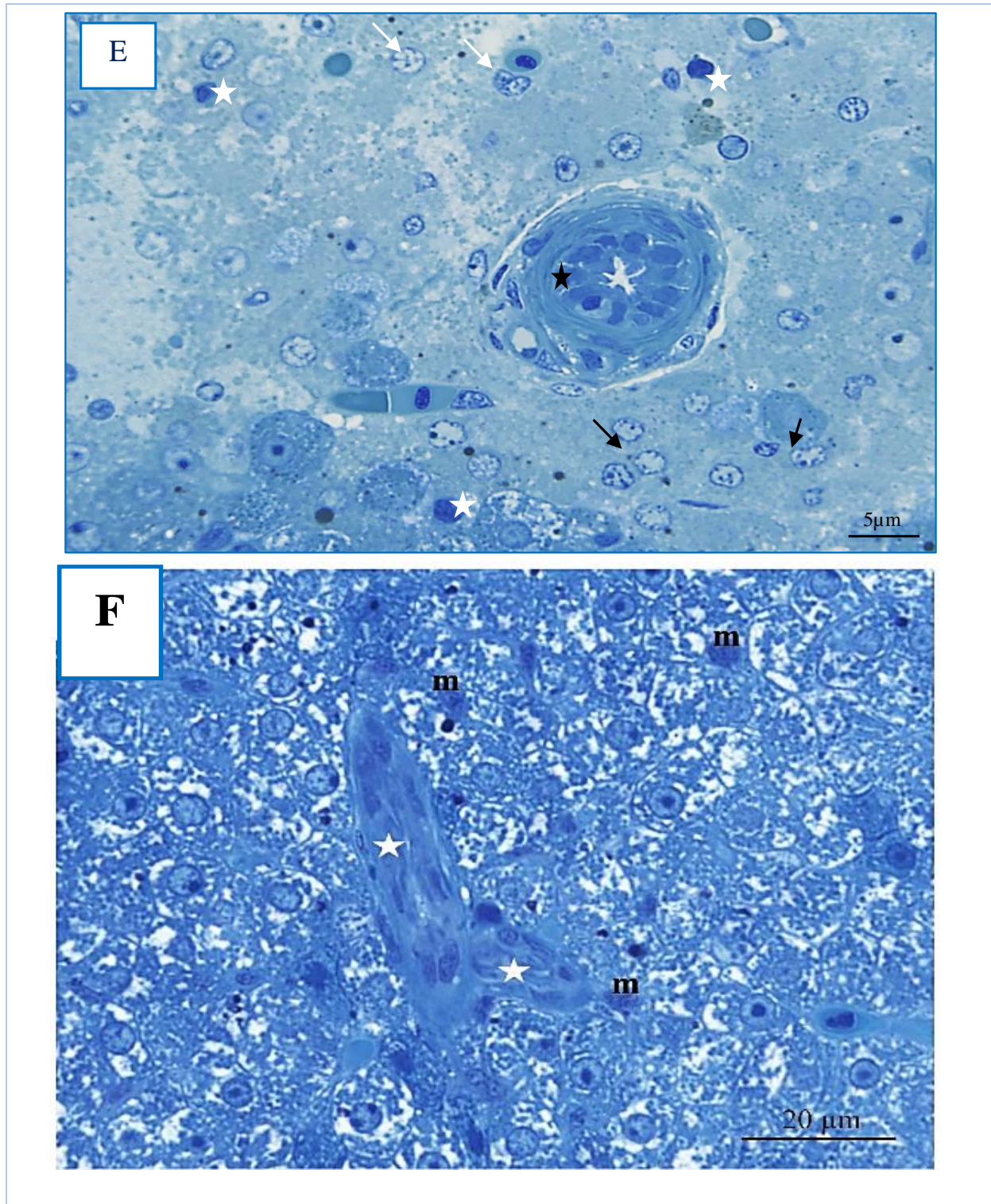


Figure 41 .Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride(3).

(E) Hyperplasie de l'épithélium des voies biliaires (étoile noire), cellules nécrotiques (flèche blanche), cellules apoptotiques (flèche noire), macrophages (étoiles blanches). **(F)** obstruction des voies biliaires (étoile blanche), prolifération des macrophages (m)

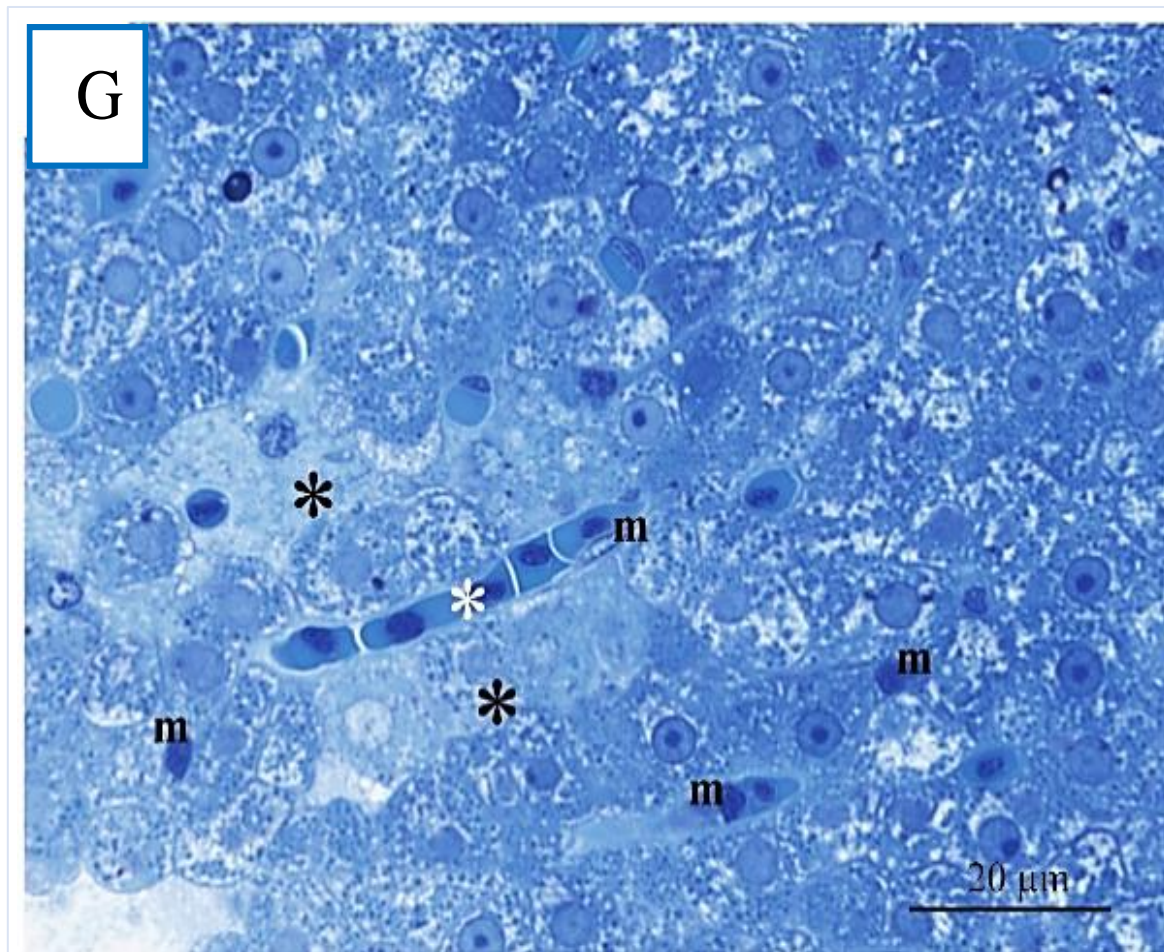


Figure 42 .Micrographies du foie d'*Alburnus alburnus* après 96 heures d'exposition à 300µg/L d'acétamipride(4).

(G) congestion des sinusoides (astérisques blancs), lyse des zones autour des sinusoides (astérisques noirs), prolifération des macrophages (m)

3.3.3. Changements histologiques des intestins

- **Chez le groupe témoin**

Les analyses histologiques du groupe témoin ne révèlent aucune altération anormale de la structure intestinale. L'intestin se compose principalement d'une couche externe, la séreuse, suivie des couches musculaires longitudinale et circulaire, séparées par la sous-muqueuse. Cette dernière renferme les glandes sous-muqueuses et est recouverte par la lamina propria, un tissu conjonctif contenant des vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires. L'épithélium, formé d'entérocytes et de cellules caliciformes, constitue la couche la plus interne (Figure 43 et 44 A-D).

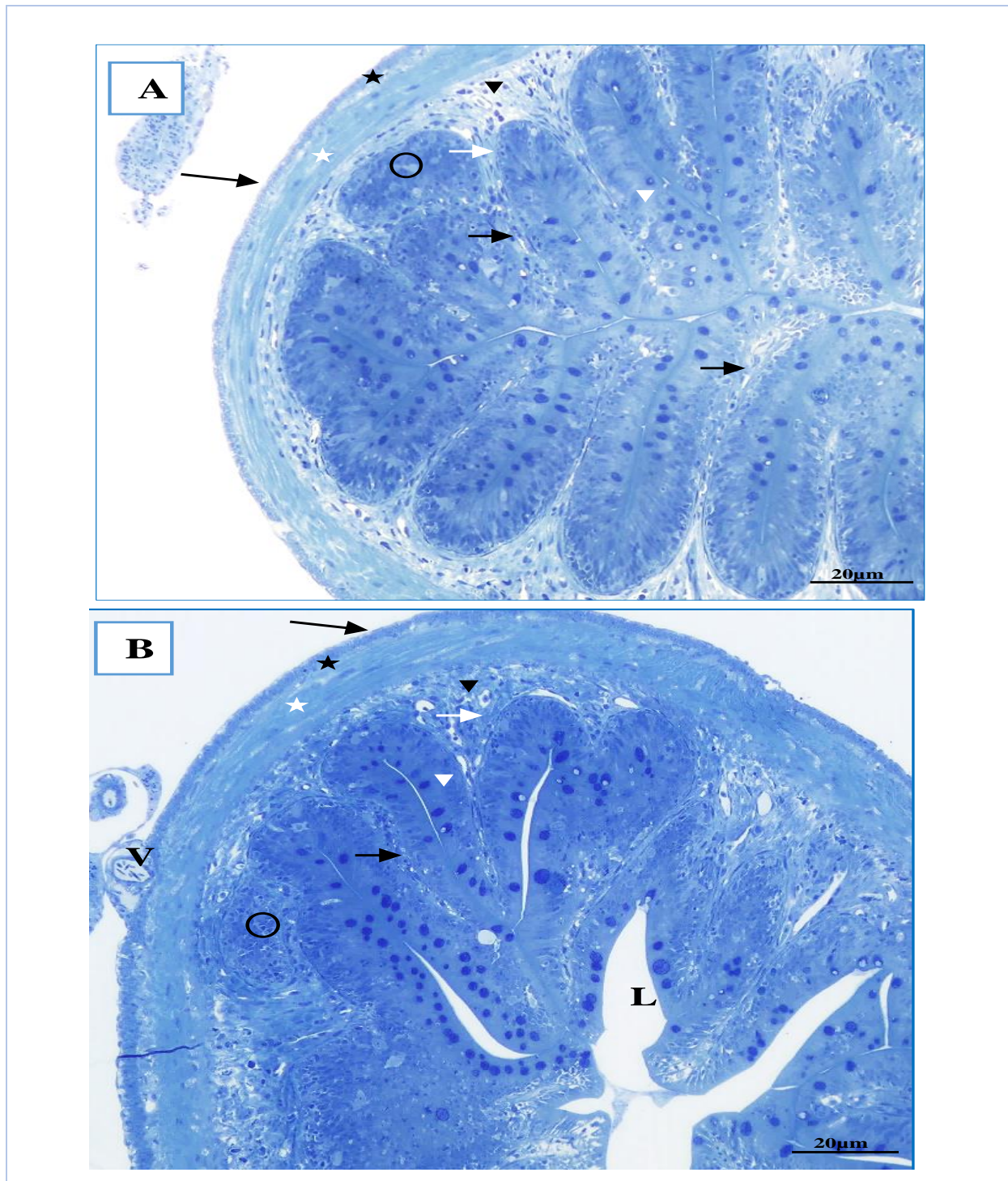


Figure 43 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* dans le groupe témoin(1).
(A) Séreuse (flèche noire), couche musculaire longitudinale (étoile noire), couche musculaire circulaire (étoiles blanches), sous-muqueuse (tête de flèche noire), musculaire muqueuse (flèche blanche), lamina propria (flèche noire), épithélium (tête de flèche blanche), glandes sous-muqueuses (cercle noir).**(B)** Séreuse (flèche noire), muscles longitudinaux (étoile noire), muscles circulaires (étoiles blanches), sous-muqueuse (tête de flèche noire), musculaire muqueuse (flèche blanche), lamina propria (flèche noire), épithélium (tête de flèche blanche), glandes sous-muqueuses (cercle noir), vaisseau sanguin (V), lumière intestinale (L).

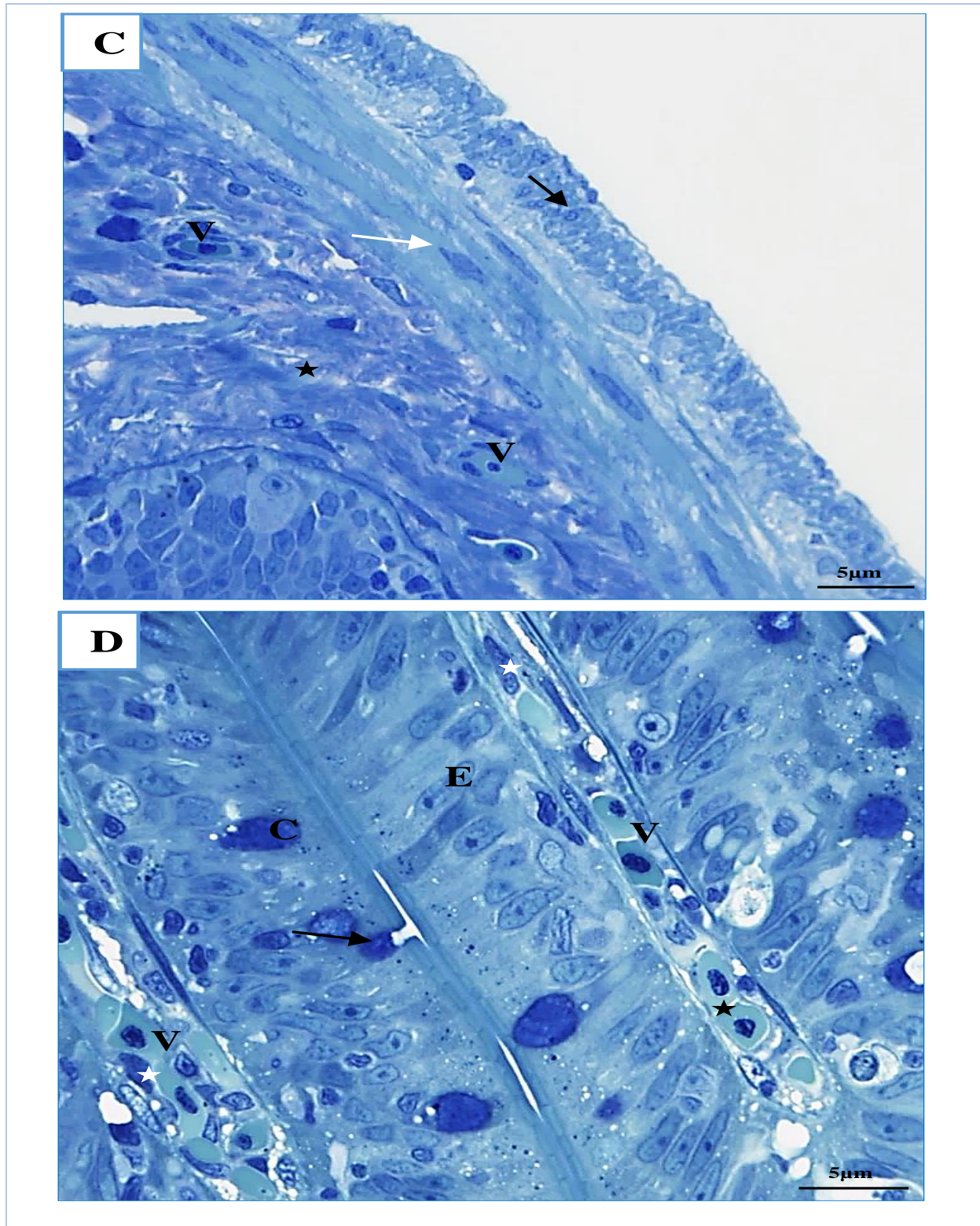


Figure 44 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* dans le groupe témoin(2).

(C) Vaisseau sanguin (V), cellules musculaires longitudinales (flèche noire), cellules musculaires circulaires (flèche blanche), tissu conjonctif (étoile noire). (D), Entérocyte (E), cellule caliciforme (C), vaisseau sanguin (V), sécrétion de mucus (flèche noire), érythrocyte (étoile noire), macrophage (étoile blanche).

- **Chez le groupe à faible concentration (150 µg/L)**

L'exposition des alevins à 150 µg/L d'acétamipride pendant 96 heures a induit plusieurs altérations histologiques. Une infiltration leucocytaire marquant une réaction inflammatoire a été observée (Figure 46 B). Des modifications structurales significatives incluent l'atrophie des parties latérales des villosités (Figure 45A), la dégénérescence de la lamina propria (Figure 46 B), et la lyse des cellules épithéliales apicales (Figure 48 D). Une fusion de certaines villosités (Figure 49 C), ainsi qu'une hyperplasie et une hypertrophie des cellules caliciformes (Figure 46 B), ont également été notées. La présence de cellules nécrotiques a été identifiée au niveau de l'épithélium et des muscles circulaires (Figures 45 A et 47 E).

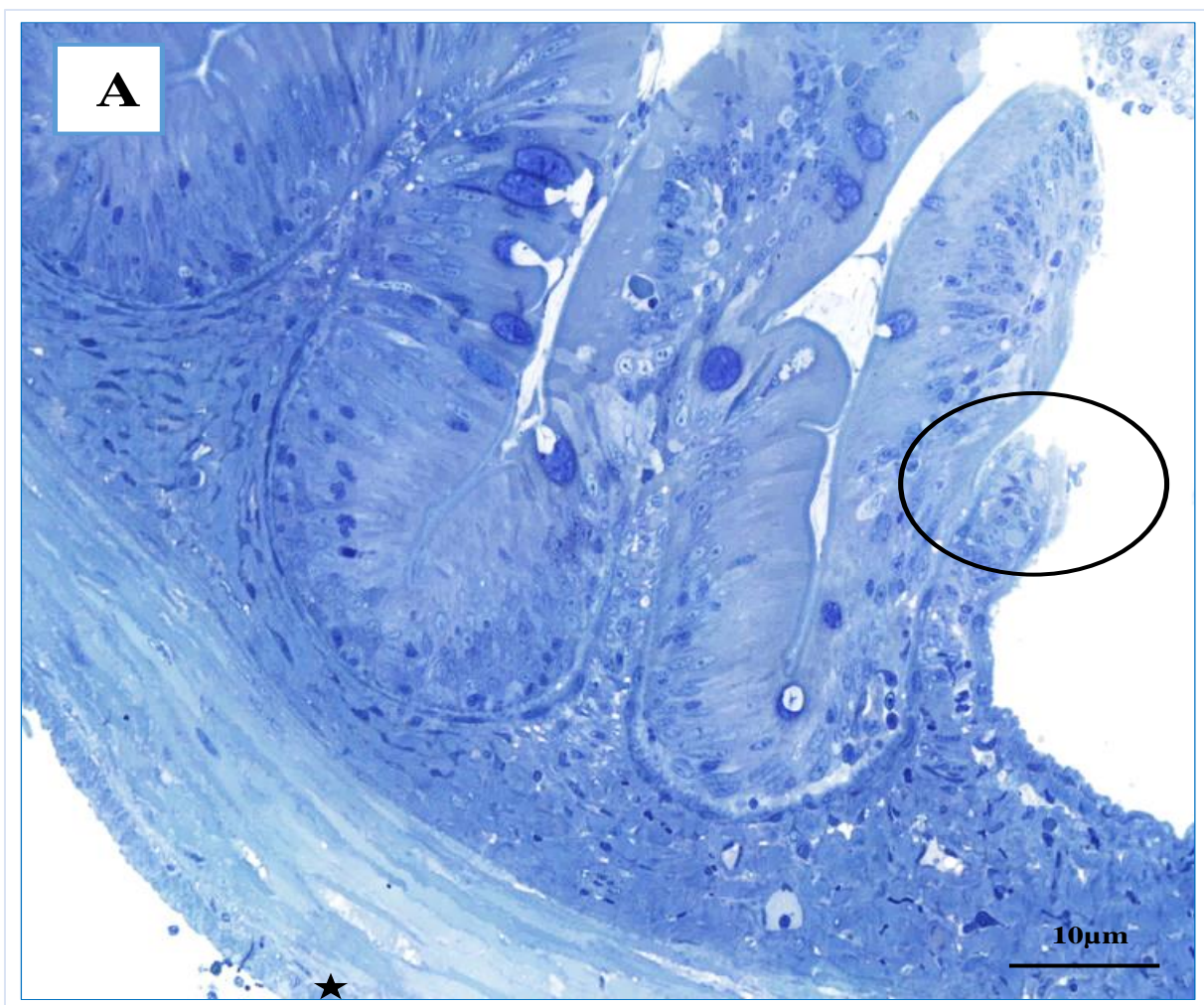


Figure 45 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(1).

(A) Atrophie de la partie latérale des villosités (cercle noir), nécrose des muscles circulaires (étoile noire).

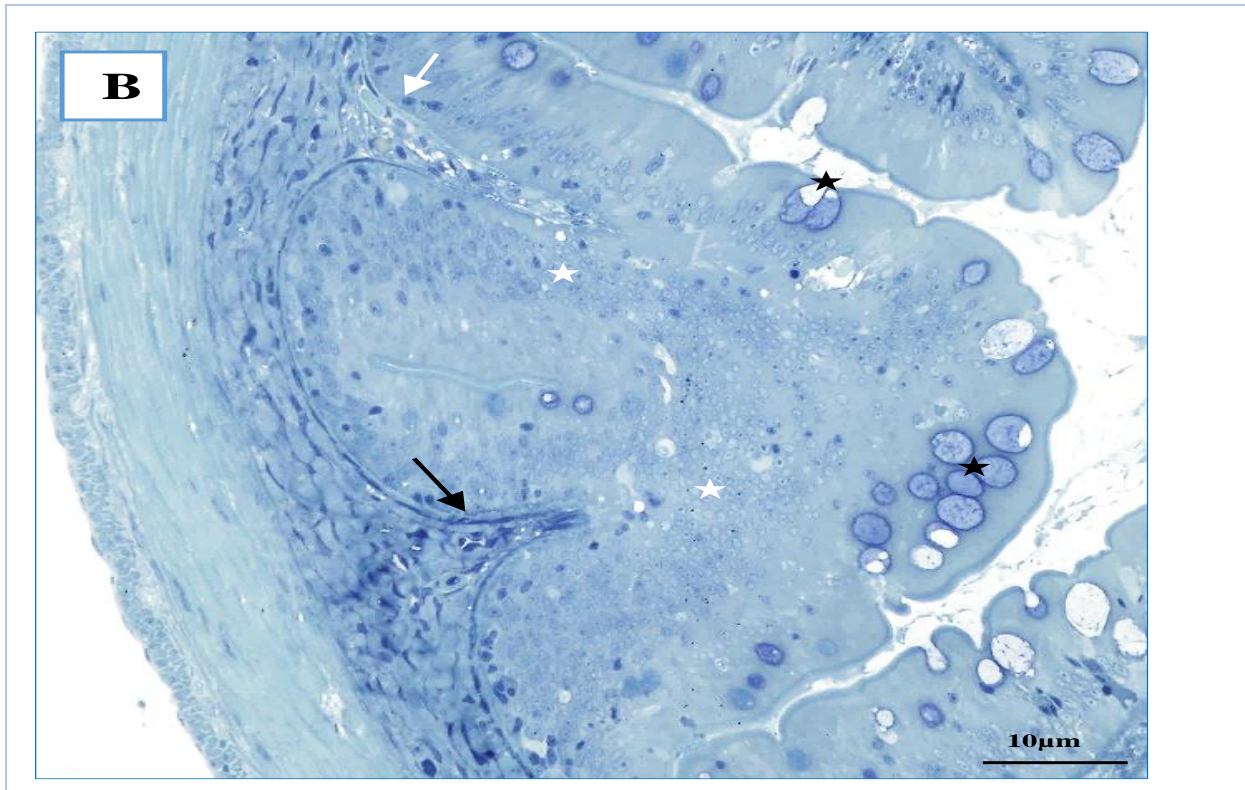
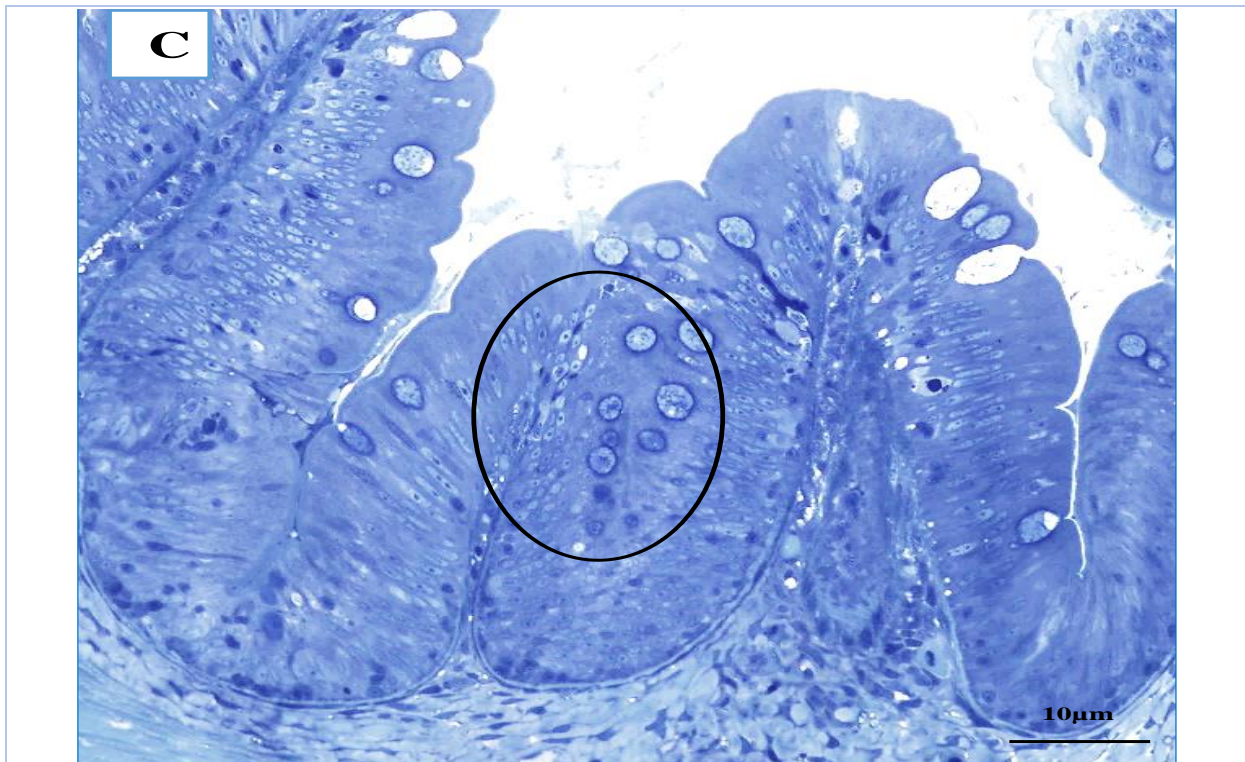


Figure 46 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride(2).

(B) Hyperplasie et hypertrophie des cellules caliciformes (étoile noire), fusion des cellules épithéliales (étoile blanche), atrophie de la lamina propria (flèche noire), infiltration leucocytaire (flèche blanche). **(C)** Fusion des villosités (cercle noir)



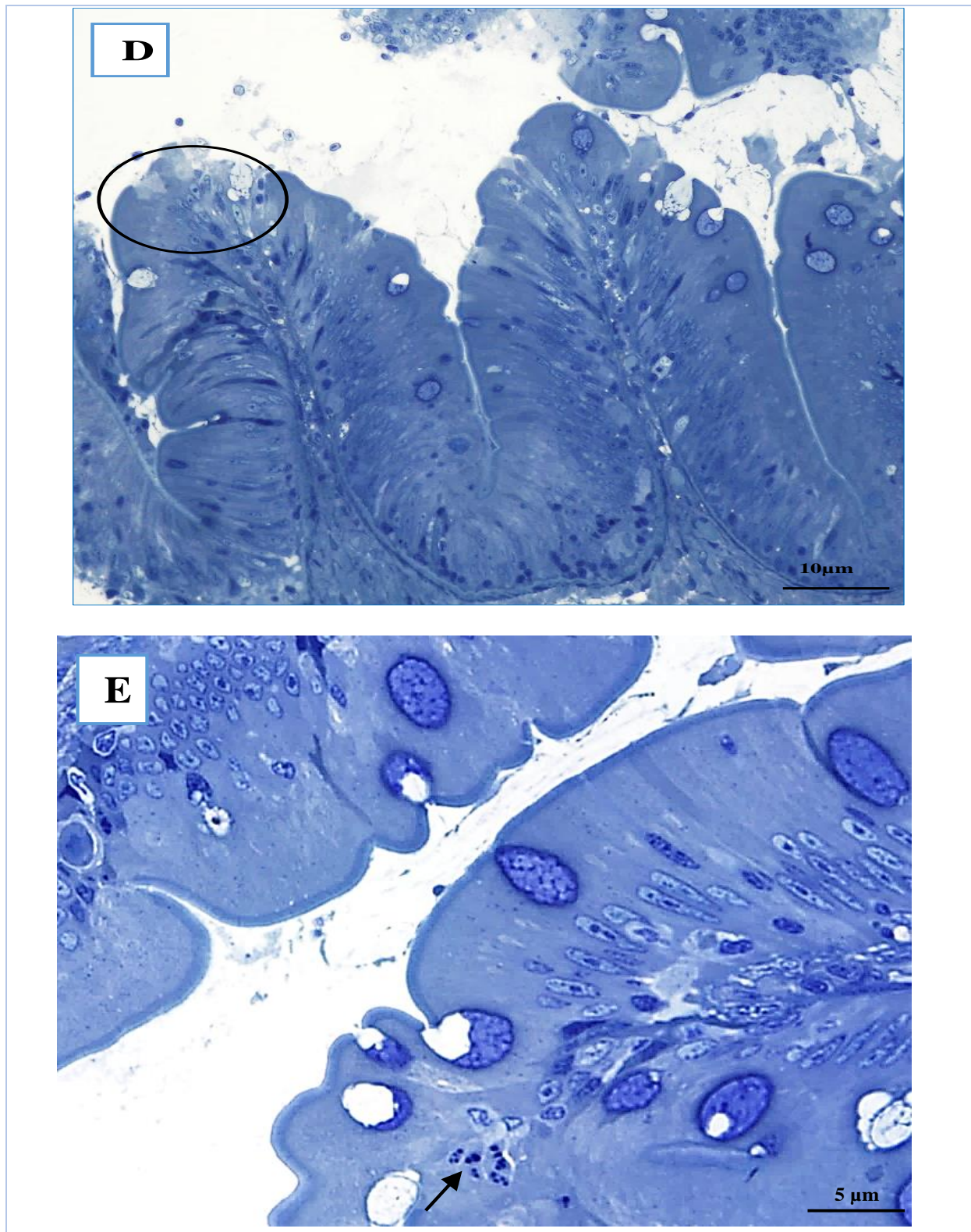


Figure 47 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 150 µg/L d'acétamipride (3).

(D) Lyse cellulaire de l'épithélium apical des villosités (cercle noir). (E) Cellules nécrotiques (flèche noire), allongement des entérocytes (D et E).

- **Chez le groupe à forte concentration (300 µg/L)**

L'exposition des alevins à 300 µg/L d'acétamipride pendant 96 heures a provoqué des dommages histologiques importants, notamment une nécrose marquée dans les parties apicales de l'épithélium et des couches musculaires, avec formation de vides intercellulaires (Figures 48 A et 50 D). Une fibrose marquée des couches musculaires et la formation de filaments fibreux ont été observées (Figure 48 A). L'hypertrophie et la prolifération des cellules caliciformes (Figure 49 B) s'accompagnent d'un œdème de la paroi intestinale (Figures 50 E et 51 F) et d'une congestion sanguine marquée dans les vaisseaux de la sous-muqueuse (Figure 51 F). Une lyse épithéliale apicale et une fusion cellulaire ont été mises en évidence (Figures 51 G et 49 B). Dans certaines zones, la muqueuse musculaire, les glandes sous-muqueuses et la séreuse ont disparu (Figures 49 et 50 B-D). De plus, la séreuse apparaît détachée de la couche musculaire, tandis que l'épithélium est séparé des couches basales des villosités (Figures 49 C et 50 D). Enfin, une destruction totale de la structure histologique des villosités a été observée, avec la disparition des différentes couches histologiques, aboutissant à la formation d'une structure unique et déformée (Figure 52 H).

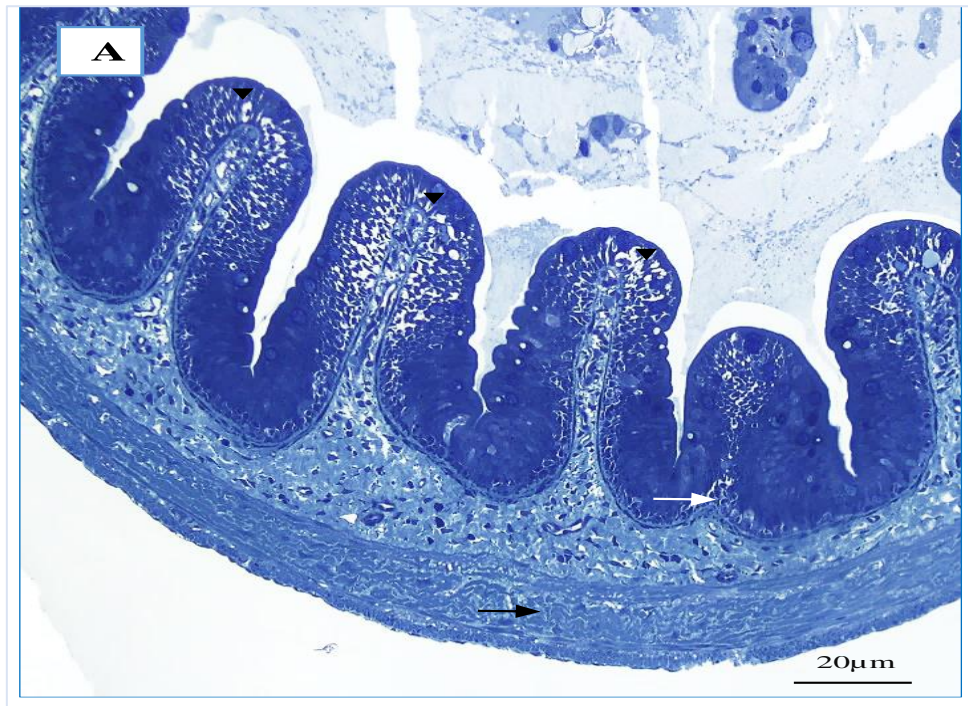


Figure 48 : Micrographie des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(1).

(A) Nécrose des parties latérales des villosités au niveau de l'épithélium (tête de flèche noire), atrophie de la lamina propria (flèche blanche), fibrose de la couche musculaire circulaire (flèche noire).

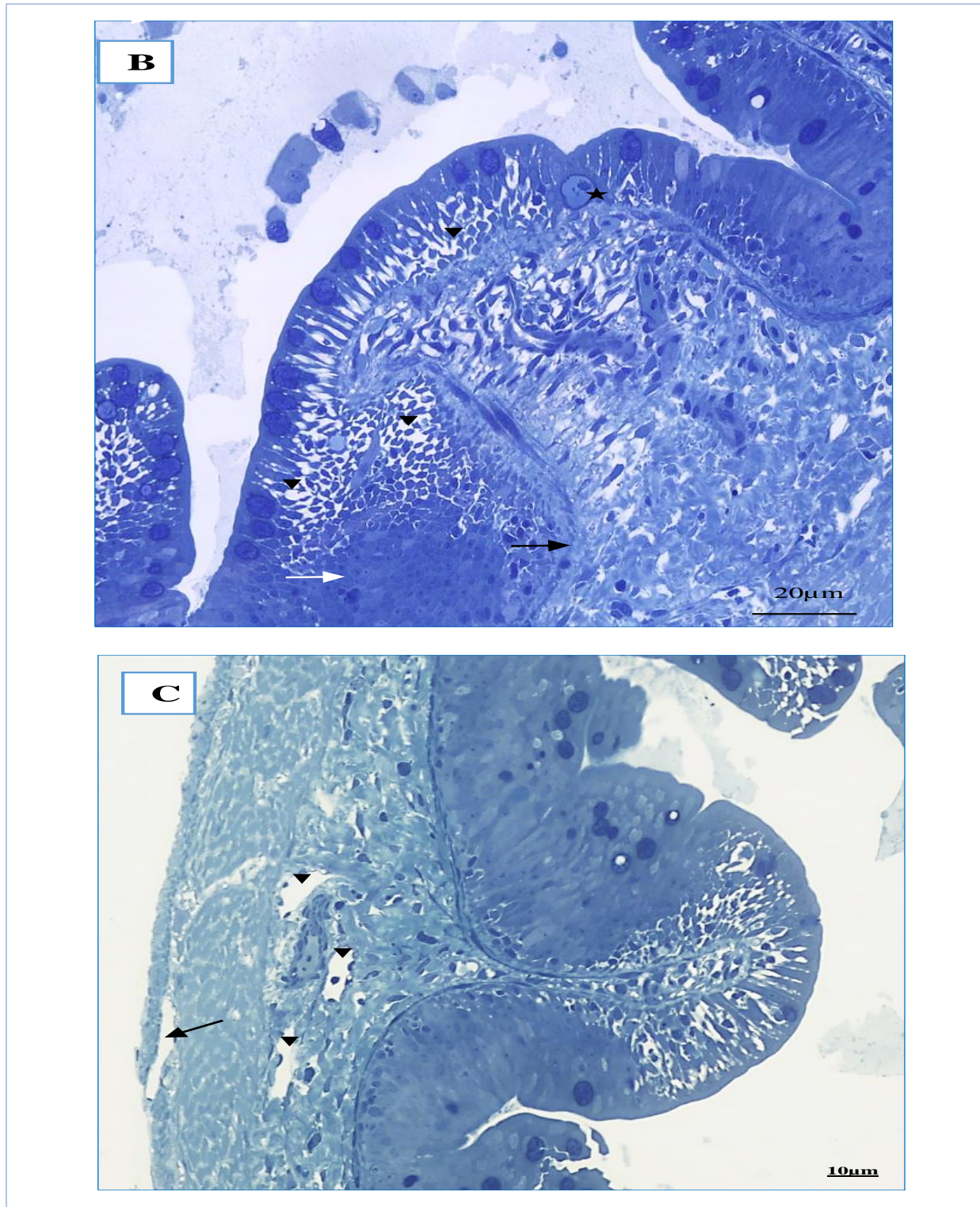


Figure 49 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (2).

(B) Hyperplasie et hypertrophie des cellules caliciformes (étoile noire), fusion des cellules épithéliales (flèche blanche), dégénérescence de la musculaire muqueuse (flèche noire). (C) Dégénérescence des glandes sous-muqueuses (tête de flèche noire), séparation de la séreuse de la couche musculaire (flèche noire).

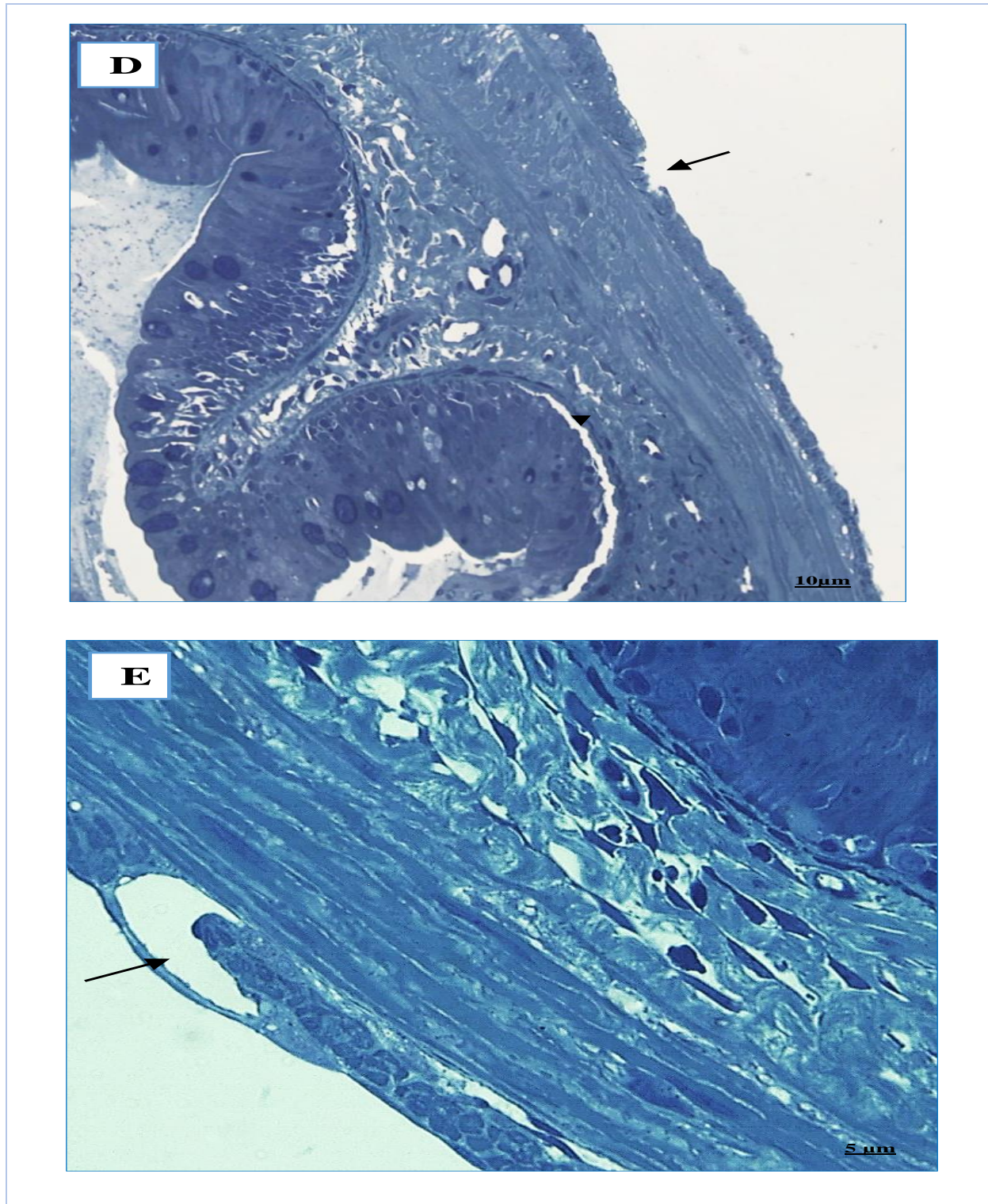


Figure 50 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (3).

(D) Séparation de l'épithélium de la couche basale, dégénérescence de la séreuse (flèche noire), nécrose de la couche musculaire (tête de flèche noire). (E) Œdème (flèche noire).

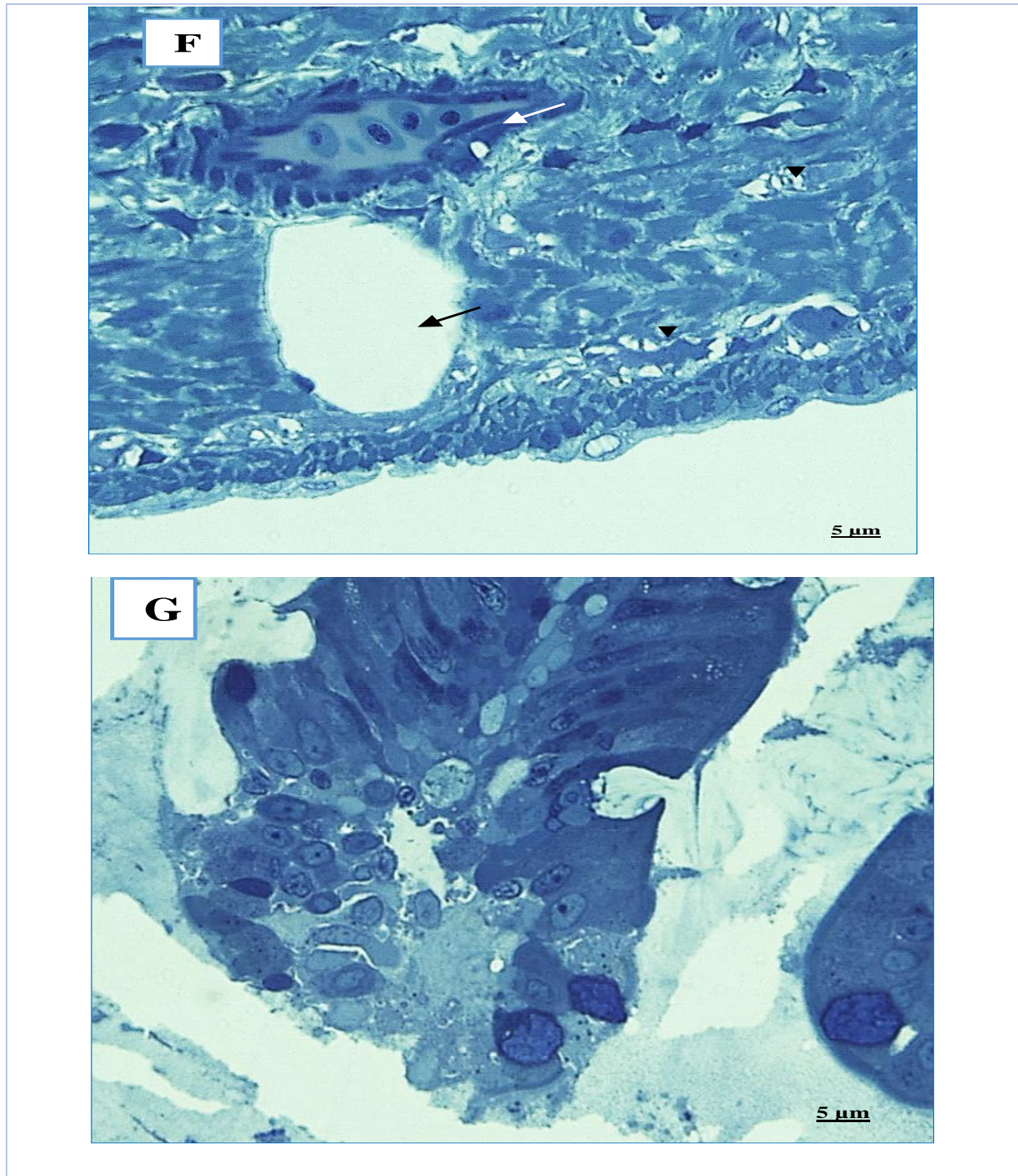


Figure 51 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride(4).

(F) Congestion (flèche blanche), œdème (flèche noire). (G) Lyse cellulaire et dégénérescence des villosités.

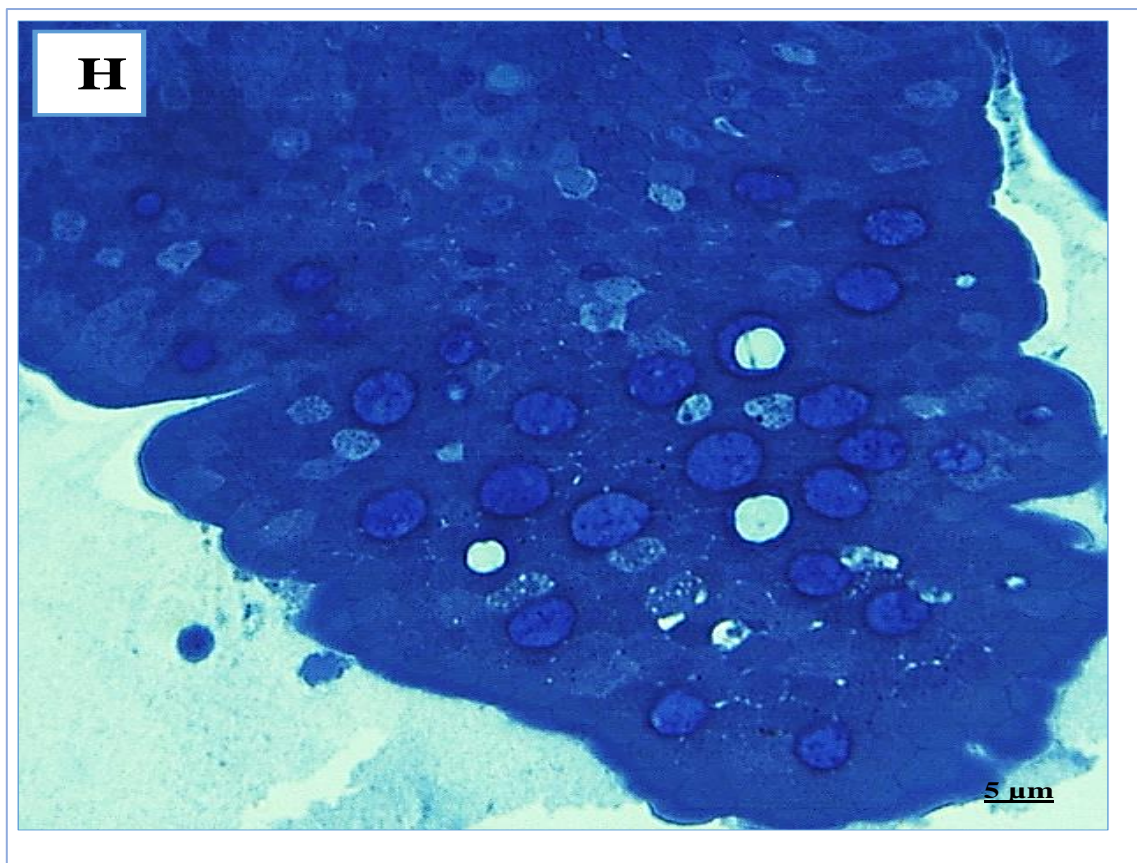


Figure 52 : Micrographies des intestins d'*Alburnus alburnus* après 96 h d'exposition à 300 µg/L d'acétamipride (5).

(H) Destruction complète de l'organisation cellulaire des villosités et déformation des cellules épithéliales.

3.4. Effet moléculaires de l'acétamipride sur les organes des alevins *d'alburnus alburnus*.

3.4.1. Effet sur l'expression du gène de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les branchies

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'expression du gène Na⁺/K⁺-ATPase chez les juvéniles exposés à la plus faible concentration d'acétamipride (150 µg/L) par rapport au groupe témoin. En revanche, la concentration la plus élevée (300 µg/L) n'a entraîné aucune modification significative ($p > 0,05$) de cette expression génique (Figure 53). L'analyse post-hoc effectuée à l'aide du test de Tukey révèle une différence significative ($p < 0,05$) dans l'expression du gène Na⁺/K⁺-ATPase entre les deux concentrations testées (Tableau 16).

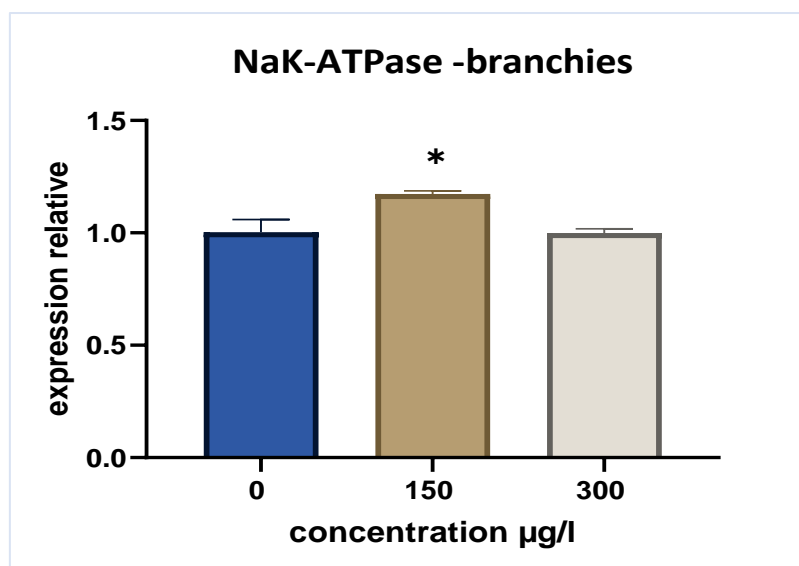


Figure 53. Expression génique ((moyenne ± SD) dans les branchies d'*Alburnus alburnus* après exposition à différentes concentrations d'acétamipride (n = 4).

Variations de l'expression relative de l'ARNm de Na⁺/K⁺-ATPase (atp1a1a.1). L'astérisque indique les différences significatives entre le groupe témoin et les groupes traités (*) p ≤ 0,05.

Tableau 16 : Comparaisons multiples de Tukey de l'expression de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les branchies des alevins après 96 h exposition à l'acétamipride.

Groupe 1	Groupe 2	Différence Moyenne	p-valeur	Intervalle Confiance Bas	Intervalle Confiance Haut	Significatif
Témoin	150 µg/l	-0,1699	0,0324	-0,1699	0,0496	Oui
Témoin	300 µg/l	0,003403	0,9974	0,003403	0,0496	Non
150 µg/l	300 µg/l	0,1733	0,0299	0,1733	0,0496	Oui

3.4.2. Effet sur l'expression du gène de la SOD1 dans le foie

Comme l'illustre la figure 54, l'exposition à l'acétamipride a modifié l'expression du gène SOD1 dans le foie des poissons. Après 96 heures de traitement, une augmentation très significative (p < 0,01) de l'expression de ce gène a été observée chez les poissons exposés à la plus faible concentration (150 µg/L) par rapport au groupe témoin. Une concentration plus

élevée (300 µg/L) a induit une surexpression encore plus marquée, avec un effet hautement significatif ($p < 0,001$).

L'analyse statistique à l'aide du test de Tukey a révélé une différence très significative entre les groupes traités aux deux concentrations testées (tableau 17).

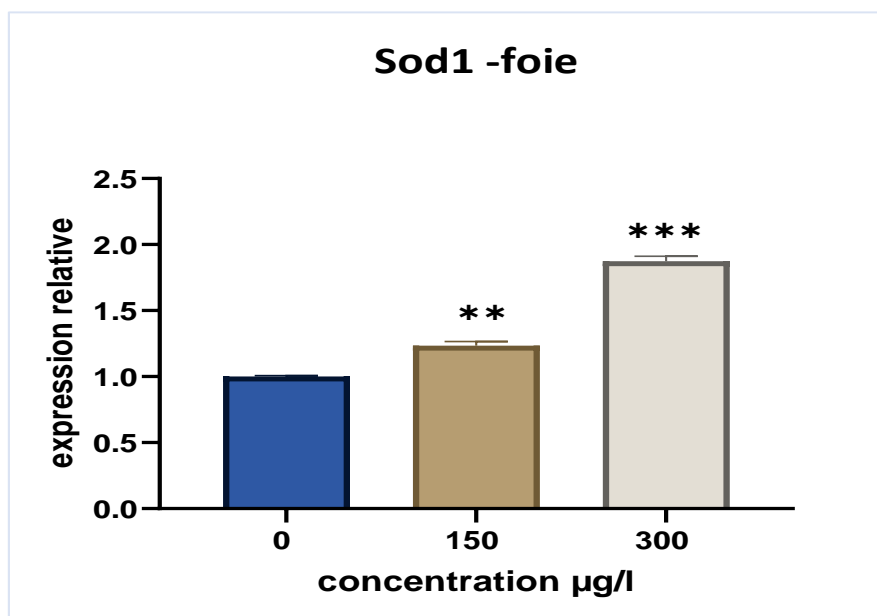


Figure 54 : Expression des gènes (moyenne ± SD) dans le foie d'*Alburnus alburnus* après exposition à différentes concentrations d'acétamipride (n = 4).

Variations de l'expression relative de l'ARNm de superoxyde dismutase 1 (SOD1). Les astérisques indiquent les différences significatives entre le groupe témoin et les groupes traités (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$).

Tableau 17 : Comparaisons multiples de Tukey de l'expression de SOD1 dans le foie des alevins après 96 h exposition à l'acétamipride.

Groupe 1	Groupe 2	Différence Moyenne	p-valeur	Intervalle Confiance Bas	Intervalle Confiance Haut	Significatif
Témoin	150 µg/l	-0,2349	0,003	1	1,235	Oui
Témoin	300 µg/l	-0,8732	<0.001	1	1,873	Oui
150 µg/l	300 µg/l	-0,6383	<0.001	1,235	1,873	Oui

3.4.3. Effet sur l'expression du gène de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les intestines

D'après les résultats présentés dans la figure 55, l'acétamipride influence également l'expression du gène Na⁺/K⁺-ATPase après 96 heures de traitement au niveau de l'intestin.

Les données montrent une augmentation hautement significative (***) $p < 0,001$) de l'expression de ce gène chez les alevins exposés à une concentration de 150 µg/L par rapport au groupe témoin. En revanche, l'exposition à une concentration plus élevée (300 µg/L) n'a induit aucune variation significative ($p > 0,05$) de l'expression génique. L'analyse statistique à l'aide du test de Tukey révèle une différence très significative de l'expression du gène Na⁺/K⁺-ATPase entre les deux concentrations testées (Tableau 18).

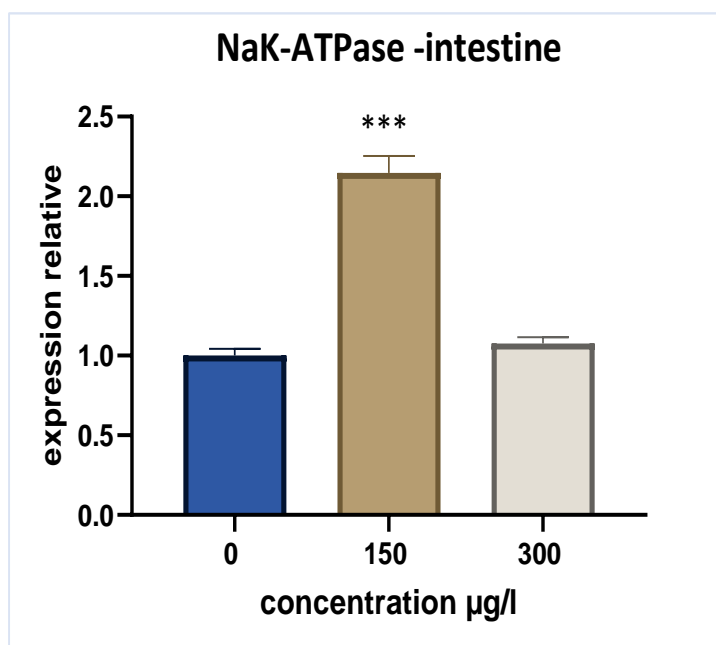


Figure 55. Expression des gènes (moyenne ± SD) dans les intestins d'Alburnus alburnus après exposition à différentes concentrations d'acétamipride (n = 4).

Variations de l'expression relative de l'ARNm de (a) Na⁺/K⁺-ATPase (atp1a1a.1). Les astérisques indiquent des différences significatives entre le groupe témoin et les groupes traités (***) $p \leq 0,001$.

Résultats

Tableau 18. Comparaisons multiples de Tukey de l'expression de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les intestines des alevins après 96 h exposition à l'acétamipride.

Groupe 1	Groupe 2	Différence Moyenne	p-valeur	Intervalle Confiance Bas	Intervalle Confiance Haut	Significatif
Témoin	150 µg/l	+1.1467	0.001	0.8263	1.4671	Oui
Témoin	300 µg/l	+0.0753	0.8587	-0.2451	0.3957	Non
150 µg/l	300 µg/l	-1.0714	0.001	-1.3918	-0.7510	Oui

Discussion

4. Discussion

Les pesticides, après leur pénétration dans les poissons par diverses voies, diffusent dans leurs organes et leurs tissus adipeux, où ils s'accumulent, provoquant de profonds changements moléculaires, biochimiques et histologiques dans les tissus de ces espèces (Rohani, 2023 ; Zaidi et Soltani, 2013). Une compréhension approfondie des effets des pesticides sur les poissons est essentielle pour leur conservation ainsi que pour la préservation des écosystèmes aquatiques. Dans ce travail de recherche, les juvéniles du poisson d'eau douce *A. alburnus* ont été examinés afin d'évaluer l'impact de l'acétamipride sur l'expression génique et l'histologie de trois organes cibles : les branchies, le foie et l'intestin.

4.1 Toxicité aiguë l'acétamipride chez *A. Alburnus*

L'objectif principal des études toxicologiques est d'évaluer la toxicité et les effets potentiels des substances chimiques sur les organismes non-cibles. Parmi ces études, le test de toxicité aiguë (CL50 à 24, 48, 72 et 96 heures) constitue une référence essentielle pour déterminer les concentrations létales des substances toxiques, tant pour les organismes cibles que non cibles (Hu *et al.*, 2022). Ce test est particulièrement utilisé pour évaluer l'impact de divers produits, notamment les produits pharmaceutiques, les substances chimiques industrielles et les pesticides. Dans un cadre réglementaire, l'homologation des pesticides à l'échelle mondiale impose la réalisation de tests sur plusieurs espèces aquatiques (Burden *et al.*, 2020).

Au cours de la première heure d'exposition, des altérations comportementales ont été observées chez les alevins exposés à l'acétamipride, à l'exception du groupe témoin. Ces modifications incluaient une nage rapide et désordonnée, des mouvements fréquents à la surface de l'eau, des convulsions, ainsi qu'une augmentation de l'activité operculaire. Par la suite, les poissons présentaient une diminution progressive de leur activité, caractérisée par une nage plus lente, une tendance à se regrouper au fond de l'aquarium et une anorexie marquée.

Les résultats expérimentaux ont révélé une corrélation significative entre la concentration d'acétamipride et la mortalité des alevins. En effet, une augmentation des concentrations de ce néonicotinoïde s'est accompagnée d'une diminution significative du taux de survie des poissons.

Dans la présente étude, les valeurs de la CL50 de l'acétamipride chez les alevins d'*Alburnus alburnus* pour les périodes de 24, 48, 72 et 96 heures, ont été estimées à 44,05, 36,55,

34,75 et 34,54 mg /L respectivement, ce qui la classe parmi les substances légèrement toxiques (>10 mg/L) selon l'Fishel (2005). Ces valeurs sont inférieures à la concentration létale d'acétamipride mesurée chez les alevins de carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) aux intervalles de 24, 48, 72 et 96 heures, qui étaient respectivement de 170.46, 139.5, 141.91 et 121.146 mg/L (Azadikhah *et al.*, 2023).

Toutefois, plusieurs études ont rapporté une toxicité plus faible de l'acétamipride chez différentes espèces de poissons juvéniles, avec des valeurs de CL50 à 96 heures bien supérieures : 182,9 et 195,813 mg/L pour *Oreochromis niloticus* (Guedegba *et al.*, 2019 ; ElGarawani *et al.*, 2022) et 265,7 mg/L pour *Clarias gariepinus* (Houndji *et al.*, 2020). Selon ARLA (2002), des valeurs également supérieures de CL50-96h pour l'acétamipride ont été rapportées pour le crapet arlequin *Lepomis macrochirus* (> 119,3 mg/L), la truite arc-en-ciel (> 100 ppm) et le vairon à grosse tête *Pimephales promelas* (95,8 ppm). Ces chiffres sont nettement plus élevés comparés aux valeurs signalées dans d'autres recherches d'Alam (2014), Siddiqui et Wanule (2010), ARLA(2002) et Raj et Joseph (2015) pour *Labeo rohita* (11,62 mg /L), le poisson-serpent tacheté *Channa punctatus* (50 ppm) et le tilapia du Mozambique (5,99 ppm), respectivement.

Les variations de toxicité entre espèces peuvent être attribuées à plusieurs facteurs biologiques et environnementaux, notamment l'âge, la taille, l'espèce du poisson ainsi que les conditions physico-chimiques du milieu aquatique (Vajargah *et al.*, 2021). Ces valeurs peuvent aussi être affectées par les conditions expérimentales (comme la régénération de l'eau et du pesticide) mises en œuvre lors du test de toxicité. Dans ce contexte, sous des conditions statiques, l'acétamipride peut être partiellement métabolisé en ses dérivés, comme l'IM1-3 (N-[(6-chloro-3-pyridyl)méthyl]-N-méthylacétamide), l'IM1-4 (N-méthyl (6-chloro-3-pyridyl)méthylamine) et l'IM1-5 (N-(6-chloropyridin-3-ylméthyl)-Nméthylacétamidine), qui sont plus toxiques que la molécule mère.

4.2. Résidus de l'acétamipride l'eau d'élevage

L'acétamipride est utilisé pour lutter contre les ravageurs du riz, des fruits et des légumes, donc c'est un pesticide néonicotinoïde à large spectre. Ces dernières années, des résidus d'acétamipride ont été trouvés dans les eaux de surface du monde entier, notamment en Chine, aux États-Unis, en Suède et en Espagne, avec des résidus moyens de l'ordre de ng/L et des concentrations maximales allant jusqu'à µg/L (Mahai *et al.*, 2021 ; Berens *et al.*, 2021 ; Boye *et al.*, 2022 ; Barbieriet *al.*, 2021). Ces études indiquent que l'acétamipride contamine

l'environnement aquatique et constitue une menace pour les organismes non ciblés dans cet environnement. L'analyse des résidus phytosanitaires et de leurs produits de dégradation par des méthodes analytiques complémentaires requiert des techniques d'analyse sélectives et rigoureuses, ainsi que l'utilisation d'instruments de haute technologie. Parmi les méthodes les plus couramment utilisées figure la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), souvent couplée à divers détecteurs offrant une spécificité variable (Amalric, 2009).

Dans cette étude, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC/MS) a été employée pour détecter les résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage d'*Alburnus alburnus*. Les résultats ont révélé la présence de l'insecticide à une concentration moyenne de $19,01 \pm 5,28 \mu\text{g/l}$ après 96 heures, traduisant une diminution du taux de résidus d'acétamipride d'environ 94 % par rapport à la concentration initiale. Cela est expliqué par la photodégradation et l'incorporation de ce pesticide dans le corps des alevins traité. La photodégradation des pesticides dans l'eau est constituée une voie de dégradation majeure après pulvérisation et a un impact direct sur la durabilité et la dynamique de dégradation des pesticides (Bonnechere *et al.*, 2012 ; Aznza *et al.*, 2013). En effet, la photostabilité est un élément important dans l'efficacité en milieu naturel de tous les insecticides néonicotinoïdes, car une meilleure photostabilité entraîne une action prolongée sur les insectes nuisibles. Néanmoins, cela entraîne simultanément la lixiviation de l'insecticide vers les eaux de surface et souterraines, une formation plus lente d'intermédiaires potentiellement toxiques, et par conséquent, leur effet toxique prolongé (Banic *et al.*, 2018). Une recherche récente a démontré que l'acétamipride affichait des niveaux de photolyse distincts selon les différentes conditions d'éclairage en eau pure, classés par ordre décroissant : ultraviolet > fluorescence > lumière solaire ; par ailleurs, sa demi-vie de photolyse est entre 17,3 et 28,6 heures (Zhu *et al.*, 2024). De plus, et selon Yang et Yadong (2024), l'acétamipride présente une demi-vie de 8,9 heures dans l'eau du robinet exposée à la lumière solaire, alors qu'elle est de 9,1 heures dans l'eau déminéralisée. Par ailleurs, des conditions alcalines (pH 9,0) augmentaient sa vitesse de photolyse, qui s'accélérait avec l'augmentation du pH (Zhu *et al.*, 2024).

Les produits chimiques présents dans le milieu aquatique peuvent s'accumuler dans les organismes aquatiques, soit en faibles concentrations dans leurs tissus, soit jusqu'à atteindre des concentrations importantes (Bermúdez *et al.*, 2005). La diminution de la concentration de l'acétamipride peut être aussi expliquée par la bioconcentration de cet insecticide dans les tissus de cette espèce. La bioconcentration des résidus de pesticide constitue un menace pour la santé publique en raison de la consommation de ces organismes contaminés (Serrano *et al.*, 1995 ;

Saha et Dutta , 2024), sachant que *Alburnus alburnus* est un poisson comestible. Des recherches récentes indiquent que l'acétamipride s'accumule rapidement chez les têtards de *Rana nigromaculata* et de faibles niveaux de bioconcentration avec des facteurs de bioconcentration inférieur à 1 et les valeurs de demi-vie diminuant pendant $t_{1/2} < 1$ jour pendant le processus d'élimination (Guo *et al.* , 2022). L'accumulation et la biotransformation de l'acétamipride ont été observées également chez les adultes des poissons zèbres (*Danio rerio*) exposés à l'acétamipride, à des concentrations de 0,19 à 1637 $\mu\text{g/L}$ pendant 154 jours. et le composé parent et son métabolite (acétamipride- N- desméthyl) ont été transférés à leur progéniture (Ma *et al.* , 2022). Après 96 heures d'exposition à l'acétamipride, les crustacés marins (*Kuruma Penaeus japonicus* et *Crangon uritai*) ont présenté des concentrations corporelles chez les deux espèces (Hano *et al.*, 2023). L'acétamipride a également été détecté dans les muscles de diverses espèces de poissons sauvages provenant des agroécosystèmes pluviaux en Amérique du Sud (les fleuves d'Uruguay et Negro) (Ernst *et al.*, 2018). Les poissons de Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) exposés à l'Acetamipride présentaient une forte accumulation de résidus de ce pesticide au niveau de muscles (Guedegba *et al.*, 2021).

L'acétamipride a prouvé sa capacité à se bioaccumuler chez les êtres aquatiques, y compris les poissons zèbres, et peut être transmis des individus adultes à leur descendance (Ma *et al.* , 2022). Habituellement, les pesticides peuvent être biomagnifiés à travers les chaînes alimentaires, ce qui entraîne une accumulation plus importante dans les organismes situés aux niveaux trophiques plus élevés (Saha et Dutta, 2024).

Cette étude actuelle a démontré que les concentrations de résidus de pesticides détectés après une période de 96 heures peuvent servir d'indication pour la bioaccumulation dans les tissus. Cette bioaccumulation pourrait expliquer les changements histologiques et moléculaires remarqués dans les branchies, le foie et les intestins. Les variations de ces paramètres illustrent les dommages oxydatifs, ainsi que les réactions et processus par lesquels ces poissons se défendent contre la toxicité des polluants.

4.3. Effet de l'acétamipride sur l'histologie des organes

- Effet de l'acétamipride sur l'histologie des branchies

Chez les poissons, les branchies ont un rôle crucial dans l'adaptation des poissons à leur environnement, et sont essentiellement chargées de l'échange des gaz et de l'élimination

des déchets, alors que l'épithélium branchial contribue aussi à la régulation de la pression osmotique (Diaz *et al.*, 2009 ; Evans *et al.*, 2005).

L'analyse histopathologique des branchies, est largement considérée comme un biomarqueur fiable pour évaluer les effets toxiques des substances chimiques et surveiller la contamination aquatique (Rohani, 2023). Plusieurs études ont décrit les effets des pesticides sur l'histologie branchiale de poissons, mettant en évidence des altérations structurelles en réponse à l'exposition aiguë ou chronique à ces substances. L'exposition aiguë du poisson d'eau douce *Channa punctatus* au dichlorure de paraquat pendant 96 heures a entraîné un enroulement des lamelles secondaires, la formation d'anévrismes et un élargissement du noyau cartilagineux (Badroo *et al.*, 2020). De même, une exposition sublétales de *Cyprinus carpio* à la deltaméthrine sur la même durée a induit des modifications sévères, notamment une nécrose, des anévrismes des lamelles secondaires, un soulèvement épithélial, un œdème, une hyperplasie épithéliale et une fusion des lamelles secondaires (Cengiz, 2006).

Dans notre étude, l'exposition d'*Alburnus alburnus* à l'acétamipride a entraîné des altérations histopathologiques dont la gravité augmente avec la concentration du pesticide. Parmi les modifications observées, nous notons :

- Hypertrophie et prolifération des cellules de chlorure et des cellules globuleuses
- Désorganisation du système vasculaire épithélial
- Hyperplasie et rupture de l'épithélium branchial
- Œdème des filaments secondaires et fusion des lamelles branchiales
- Hypersécrétion de mucus, vasodilatation des vaisseaux sanguins, hémorragies et congestion
- Dégénérescence cellulaire et nécrose

Ces changements structurels perturbent la fonction respiratoire et la perméabilité des branchies aux substances toxiques. La prolifération et l'hyperplasie de l'épithélium branchial, en particulier, sont reconnues comme des mécanismes de défense non spécifiques visant à limiter l'absorption des contaminants en augmentant la distance entre les vaisseaux sanguins et les toxines (Javed *et al.*, 2016). Ces réponses histologiques ont déjà été décrites chez d'autres espèces exposées aux pesticides. Par exemple, *Oreochromis niloticus* exposé à l'acétamipride a présenté une hyperplasie, une fusion des lamelles secondaires et des formes œdémateuses des branchies (El Garawani *et al.*, 2022). Des altérations similaires ont été rapportées chez *Cirrhinus mrigala*, avec un soulèvement épithélial et un enroulement des lamelles secondaires (Ghayyur *et al.*, 2021).

Dans la présente étude, les résultats histologiques sont en accord avec l'expression du gène de la Na⁺/K⁺-ATPase. En effet, une augmentation de l'expression de cette enzyme a été observée dans le groupe exposé à la plus faible concentration d'acétamipride (150mg/L) par rapport au groupe témoin, alors qu'une diminution a été notée à des concentrations élevées (300mg/L). Cette modulation de l'expression pourrait être liée à la prolifération des cellules de chlorure, lesquelles jouent un rôle clé dans le maintien de l'équilibre ionique en lien avec l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase (Perry, 1997).

Des études antérieures ont également montré que d'autres pesticides induisent des altérations comparables des branchies. Par exemple, les alevins de *Clarias gariepinus* exposés au Gammalin ont présenté une désorganisation tissulaire, une hyperplasie et une accumulation excessive de mucus conduisant à la fusion des lamelles (Ezemonye et Ogbomida, 2010). Chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le manèbe et le carbaryl ont provoqué un œdème lamellaire, une séparation de l'épithélium, une fusion et une hyperplasie des lamelles, ainsi qu'une nécrose (Boran *et al.*, 2010). De même, l'exposition au carbofuran chez le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) a engendré une désintégration des cellules épithéliales, une hyperplasie des lamelles secondaires, des anévrismes et une désorganisation des capillaires (Campos-Garcia *et al.*, 2016).

Les effets toxiques des pesticides sur les branchies sont en grande partie attribués au stress oxydatif, qui perturbe la régulation osmotique et ionique des cellules branchiales (Moraes *et al.*, 2018). Les branchies, en tant que principal organe respiratoire des poissons, jouent un rôle crucial dans l'osmorégulation et l'équilibre acido-basique et constituent une cible privilégiée des molécules xénobiotiques (Fernandes *et al.*, 2007). En raison de leur exposition directe aux polluants, de leur grande surface et de leur fonction physiologique essentielle, elles sont fréquemment utilisées dans les études écotoxicologiques (Pandey *et al.*, 2008 ; De Domenico *et al.*, 2011 ; Fasulo *et al.*, 2012 ; De Domenico *et al.*, 2013).

- Effet de l'acétamipride sur l'histologie du foie

Le foie est l'organe cible principal en toxicologie environnementale, car il joue un rôle clé dans le métabolisme et le stockage des substances toxiques. Il est donc souvent étudié chez les poissons exposés à des polluants (Oruc et Uner, 2002).

Dans la présente étude, l'exposition des alevins d'*Alburnus alburnus* à des concentrations environnementales d'acétamipride a entraîné des altérations histopathologiques significatives du tissu hépatique après 96 heures. Parmi ces altérations, on observe :

- Une dégénérescence des hépatocytes,
- Une infiltration et une accumulation de leucocytes et de macrophages,
- Une inflammation sévère,
- Une obstruction de certaines voies biliaires avec hyperplasie de l'épithélium et dégénérescence des cellules de leur paroi,
- Une congestion et une coagulation des vaisseaux sanguins,
- La formation d'abcès à plusieurs endroits du parenchyme hépatique,
- L'apparition de cellules hépatiques stéatosiques,
- Une structure spongieuse du tissu hépatique due à l'apparition de grandes lacunes et à une vacuolisation cytoplasmique,
- La présence de cellules nécrotiques et apoptotiques,
- Une dégénérescence des canaux sinusoïdaux, une fibrose et une perte de l'organisation compacte du parenchyme hépatique.

Les néonicotinoïdes, tels que l'acétamipride, affectent les fonctions hépatiques, notamment la détoxification, la production enzymatique et le métabolisme (Sharma *et al.*, 2019). Ces effets peuvent provoquer des troubles physiologiques significatifs (Haridi *et al.*, 2020). Dans notre étude, les alevins d'*Alburnus alburnus* exposés à l'acétamipride ont présenté des modifications histopathologiques similaires à celles décrites dans la littérature, notamment une nécrose hépatique, une dégénérescence focale (Qaoud et Dehshan, 2010) et une infiltration leucocytaire (Haridi *et al.*, 2020). Ces altérations pourraient être attribuées au stress oxydatif induit par l'exposition à l'acétamipride, favorisant la production de radicaux libres (Montero *et al.*, 2006).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) réagissent avec des biomolécules sensibles, entraînant la peroxydation lipidique (LPO), des dommages à l'ADN et l'oxydation des protéines, exacerbant ainsi le stress oxydatif (Livingstone, 2001). L'accumulation de leucocytes pourrait également être responsable de la dégénérescence hépatique et pancréatique (Javed *et al.*, 2016). La structure spongieuse du foie suggère une dégénérescence hydropique due à l'accumulation d'eau et d'électrolytes dans les cellules hépatiques (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2016).

Les dommages aux cellules hépatiques impliquent plusieurs mécanismes, notamment :

- Des dysfonctionnements mitochondriaux affectant directement l'ADN,
- L'inhibition de la β -oxydation des acides gras,
- Une inhibition des enzymes respiratoires (Grattagliano *et al.*, 2002 ; Lee, 2003).

L'incapacité à métaboliser les acides gras libres entraîne l'accumulation de lactate et de ROS, ce qui favorise la peroxydation lipidique et les dommages à l'ADN mitochondrial. Ces altérations physiopathologiques peuvent induire une accumulation sanguine dans le foie et provoquer de graves lésions tissulaires.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés chez d'autres espèces exposées à l'acétamipride. Par exemple, le foie de *Oreochromis niloticus* et *Cirrhinus mrigalaa* présenté des zones nécrotiques et une vacuolisation cytoplasmique après exposition à ce pesticide (El-Garawani *et al.*, 2022 ; Ghayyur *et al.*, 2021) . De plus, *Ctenopharyngodon idella* exposé à l'acétamipride pendant 96 heures a montré une congestion vasculaire, une nécrose hépatique et une accumulation d'érythrocytes dans les vaisseaux sanguins hépatiques (Azadikhah *et al.*, 2023).

Chez les poissons, les macrophages ont divers rôles, participant aux processus de défense de l'organisme hôte, à la résolution de l'inflammation ainsi qu'à la régénération des tissus (Wentzel *et al.*, 2020). Des recherches précédentes ont montré que l'exposition aux xénobiotiques, tels que les insecticides, peut provoquer une multiplication des macrophages (Macirella *et al.*, 2022 ; Mostakim *et al.*, 2015). D'après Marcon (2015), la présence de macrophages pourrait signaler l'absorption de substances extérieures et témoigner de la toxicité de ces substances.

- Effet de l'acétamipride sur l'histologie des intestins

L'intestin constitue la plus grande interface entre le corps du poisson et son environnement extérieur. Il joue un rôle fondamental dans la digestion et l'absorption des nutriments, tout en assurant une barrière protectrice contre les substances nocives pouvant pénétrer dans la circulation sanguine (Huang *et al.*, 2015). L'intégrité de la muqueuse intestinale repose sur deux voies principales : la voie transcellulaire, impliquant les cellules épithéliales, et la voie paracellulaire, qui concerne les jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales et endothéliales. Les entérocytes assurent le transport actif des nutriments à travers les membranes apicales et basolatérales des cellules intestinales. Ainsi, le tractus digestif régule efficacement l'absorption des nutriments (Zakir et Takashi, 2008). De plus, l'épithélium intestinal représente une barrière essentielle contre la pénétration des toxines (Ma, 1997). Une altération de cette barrière, notamment au niveau des jonctions serrées, peut entraîner une perméabilité accrue, facilitant l'entrée de substances toxiques dans l'organisme (Baker *et al.*, 1988).

À notre connaissance, aucune étude antérieure n'a porté sur les effets des néonicotinoïdes sur l'histologie intestinale des poissons d'eau douce. Notre étude constitue donc la première analyse des effets de l'acétamipride sur les alevins d'*Alburnus alburnus*. Nos résultats montrent que l'acétamipride cible les tissus intestinaux et que l'ampleur des lésions est proportionnelle à la concentration du pesticide dans l'eau. Les altérations observées comprennent une infiltration leucocytaire, une congestion vasculaire, des œdèmes, une vacuolisation cytoplasmique, une hyperplasie et une hypertrophie des cellules caliciformes, une fusion des cellules épithéliales, une lyse cellulaire, ainsi qu'une dégénérescence des villosités, principalement au niveau des régions apicales. De plus, nous avons constaté une atrophie de la lamina propria, une dégénérescence de la muqueuse musculaire, de la séreuse et des glandes sous-muqueuses, ainsi qu'une fibrose de la couche musculaire circulaire et une nécrose touchant l'épithélium et les tissus musculaires. Dans certains cas, nous avons observé une destruction totale de l'architecture de plusieurs villosités et une déformation marquée des cellules épithéliales.

Des études antérieures menées sur *Ctenopharyngodon idella* (Cyprinidés) ont rapporté des altérations similaires après une exposition à 2 ppm de Lindane, un pesticide organochloré, incluant la dégénérescence épithéliale, la destruction des villosités, la formation de vacuoles, des hémorragies et une nécrose (Vajagah *et al.*, 2021). De même, Stalin *et al.* (2019) ont montré que l'exposition des alevins de *Channa punctatus* à 5 ppm de chlorpyrifos pendant 30 jours provoquait des lésions comparables, notamment une fusion des villosités. L'exposition de *Gambusia affinis* à des concentrations sublétales de 0,50 µg/L de deltaméthrine pendant 30 jours a induit une infiltration leucocytaire et une nécrose (Cengiz *et al.*, 2006), tandis qu'une exposition à 5 µg/L de Thiodan sur la même durée a causé une accumulation leucocytaire, un œdème, une désintégration des villosités et une nécrose (Cengiz *et al.*, 2001).

4.4 Effet de l'acétamipride sur l'expression génique des organes :

- Effet sur l'expression génique de la Na⁺/K⁺-ATPase au niveau des branchies

Chez les poissons d'eau douce, l'ATPase Na⁺/K⁺ est considérée comme un biomarqueur enzymatique de l'exposition aux polluants aquatiques, ce qui en fait un outil toxicologique pertinent pour l'évaluation de l'activité cellulaire (Parvez *et al.*, 2006).

Ce système enzymatique a été découvert en 1957 par le scientifique danois J.C. Skou (Skou, 1957), qui a démontré que le transport des ions Na⁺ et K⁺ à travers la membrane plasmique est assuré par l'activation de la Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) (Suhail, 2010). Cette enzyme de transport joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire en régulant les

concentrations intracellulaires de sodium et de potassium via un processus de phosphorylation/déphosphorylation dépendant de l'ATP/ADP (Crambert *et al.*, 2000).

La NKA est composée de deux sous-unités principales : la sous-unité α , qui assure l'activité catalytique, et la sous-unité β , qui participe à la maturation structurale et fonctionnelle du complexe enzymatique (Kaplan, 2002 ; Wong *et al.*, 2016). Cette enzyme est synthétisée par les ionocytes, des cellules spécialisées riches en mitochondries, les cellules chlorure et les branchies des téléostéens. Ces cellules ont un rôle crucial dans l'osmorégulation des poissons (Varsamos *et al.*, 2002). La NKA est essentielle non seulement pour préserver l'équilibre interne des cellules, mais aussi pour soutenir d'autres mécanismes de transport dans les branchies (Hwang et Lee, 2007).

La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) est couramment utilisée pour mesurer l'expression des gènes et évaluer les effets toxiques des facteurs de stress environnementaux sur les espèces aquatiques non cibles (Kumar et Denslow, 2017). À notre connaissance, nous sommes les premiers à étudier les effets du pesticide néonicotinoïde acétamipride sur l'expression du gène *atp1a1* dans les branchies de poissons d'eau douce. Nos résultats montrent qu'à faible concentration, l'acétamipride induit une augmentation significative de l'expression du gène codant pour la sous-unité catalytique α de la NKA dans les branchies d'*Alburnus alburnus*. Cette régulation à la hausse de l'*atp1a1* est cohérente avec les observations de Pagano *et al.* (2023), qui ont démontré qu'une exposition à un pesticide à base de glyphosate à une concentration environnementalement pertinente augmentait significativement l'expression de l'ARNm de l'*atp1a1* dans les branchies d'*Austrolebias charrua*. Cette augmentation de l'expression génique semble constituer une réponse adaptative au stress oxydatif, renforçant ainsi la résistance cellulaire face aux agressions environnementales.

Inversement, d'autres pesticides ont été associés à une inhibition de l'expression de la Na^+/K^+ -ATPase. Par exemple, l'exposition à la dimoxystrobine a entraîné une diminution significative de l'expression de cette enzyme dans les branchies du poisson zèbre *Danio rerio* (Abdulmouaiz *et al.*, 2023). De même, chez le poisson rouge *Carassius auratus*, une faible concentration de chlorpyrifos a réduit l'expression de la Na^+/K^+ -ATPase (Macirella *et al.*, 2020). En revanche, dans notre étude, aucune variation significative de l'expression de l'*atp1a1* n'a été observée chez les poissons exposés à des concentrations élevées d'acétamipride par rapport au groupe témoin. Ce résultat suggère que l'activité de l'ATPase dans les branchies pourrait être altérée par des lésions tissulaires causées par le pesticide.

L'inhibition ou la stimulation de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase induit des perturbations métaboliques et ioniques chez les poissons, avec des conséquences directes sur leur capacité à

maintenir l'homéostasie osmotique (Agrahari et Gopal, 2008). Les déséquilibres hydriques et ioniques sont des manifestations distinctives du stress chez les poissons, résultant de l'interaction étroite entre les liquides corporels des branchies et leur milieu aquatique (Wendelaar Bonga, 1997). Ainsi, l'osmolarité du plasma ainsi que les concentrations spécifiques de divers ions (Baldisserotto *et al.*, 2012),

- Effet sur l'expression du gène SOD1 dans le foie

Le gène SOD1 code pour la superoxyde dismutase 1, une enzyme clé du système de défense antioxydant qui neutralise les radicaux superoxydes (Shi *et al.*, 2022 ; Özdemir et Bayir, 2023). Il est largement utilisé comme biomarqueur pour évaluer le stress oxydatif induit par des substances toxiques chez les poissons (Bayir et Özdemir, 2023 ; Wang *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2017 ; Lerebours *et al.*, 2009 ; Da Rosa *et al.*, 2011).

À notre connaissance, aucune étude antérieure n'a exploré l'effet des néonicotinoïdes, et en particulier de l'acétamipride, sur l'expression du gène SOD1 dans le foie des poissons d'eau douce *Alburnus alburnus*. Notre étude est donc la première à examiner ces effets.

Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression du gène SOD1 en réponse à l'élévation des concentrations d'acétamipride, indiquant un stress oxydatif croissant, particulièrement à des doses élevées. Ces résultats corroborent ceux d'autres études ayant évalué l'effet de pesticides sur l'expression de SOD1. Par exemple, l'exposition à 5,25 ppm de diazinon pendant 96 heures a induit une augmentation de l'activité enzymatique de la SOD dans le foie de *Xiphophorus maculatus* (Bayir et Özdemir, 2023).

De même, une autre étude a révélé qu'une exposition de *Danio rerio* à des concentrations de triazophos allant jusqu'à 1,5 mg/L pendant 96 heures entraînait une augmentation significative de l'activité enzymatique de SOD1 (Wang *et al.*, 2020).

Actuellement une seule recherche a examiné le niveau d'expression de la SOD chez les larves de lamproie *Lethenteron reissneri* après une exposition de cinq jours à deux fortes doses d'acétamipride (25 et 100 mg/L), signalant une activité enzymatique considérablement diminuée. Cette différence de modulation du SOD pourrait probablement être attribuée à la variation des doses testées et à la sensibilité différente des larves de lamproie par rapport aux poissons osseux. Une liaison étroite entre les dommages hépatiques et l'induction du stress oxydatif a été démontrée chez les poissons suite à une exposition aux pesticides, y compris l'acétamiprid (Azadikhah *et al.*, 2023).

Une étude antérieure a indiqué que l'activité d'enzymes dans le foie des poissons, comme la SOD, s'est considérablement intensifiée lors d'une exposition à court terme, suggérant ainsi une réaction défensive du système antioxydant pour éliminer les radicaux libres (Sharma et Jindal, 2020). En concordance avec les données de la littérature, dans l'étude actuelle, le niveau d'expression de la SOD a notablement augmenté par rapport au témoin dans les deux groupes traités, démontrant une tendance dépendante de la dose.

Étant donné que la SOD joue le rôle de mécanisme de défense principal en situation de stress, son amélioration pourrait signaler les processus de détoxification mis en œuvre par l'organisme pour protéger les cellules contre les espèces réactives de l'oxygène (Li *et al.*, 2024). Au cours du processus de détoxification, des ROS sont générés et peuvent attaquer sans distinction les composés cellulaires, entraînant de graves perturbations dans les processus cellulaires physiologiques (Banaee *et al.*, 2013).

- Effet sur l'expression génique de la Na/K-ATPase dans l'intestin

L'intestin, bien qu'il ne joue pas un rôle central dans la détoxification, est un organe essentiel impliqué dans la digestion et l'absorption des nutriments chez les poissons (Bakke *et al.*, 2010 ; Yuan *et al.*, 2019). Un dysfonctionnement intestinal peut affecter d'autres processus physiologiques, notamment la biotransformation, et entraîner des conséquences létales (Leaner & Mason, 2002).

Chez les poissons d'eau douce, les ATPases intestinales ont une importance physiologique et cellulaire majeure. Elles participent à l'absorption des nutriments et des sels minéraux, ainsi qu'à l'osmorégulation via les Na⁺/K⁺-ATPases présentes dans divers tissus (Busacker *et al.*, 1981 ; Jampol *et al.*, 1970 ; Pagliarani *et al.*, 1988 ; Pfeiler *et al.*, 1972 ; Trigari *et al.*, 1985). Ces enzymes sont également impliquées dans l'adaptation aux variations de température et de salinité (Thomson *et al.*, 1977 ; Borgatti *et al.*, 1992 ; Yoshikawa *et al.*, 1993). Bien que leur rôle dans le transport des sucres et des acides aminés soit reconnu (Ferraris *et al.*, 1984 ; Storelli *et al.*, 1986), peu d'études ont exploré l'impact des polluants environnementaux, et en particulier des pesticides, sur leur activité intestinale. Il est donc crucial d'évaluer ces effets sous les aspects génétiques, biochimiques et physiologiques chez les organismes exposés aux xénobiotiques.

À notre connaissance, nos travaux sont les premiers à analyser l'effet des pesticides en général, et des néonicotinoïdes en particulier, sur l'expression génique des Na⁺/K⁺-ATPases intestinales chez les juvéniles d'*Alburnus alburnus*. Nos résultats indiquent que l'exposition à

Discussion

l'acétamipride entraîne une augmentation significative de l'expression génique de ces enzymes à une concentration de 150 µg/L. Cependant, cette réponse n'a pas été observée à des concentrations plus élevées, suggérant un effet toxique sévère empêchant l'activation compensatoire de ces enzymes.

Ces résultats sont en accord avec nos observations histologiques, qui ont révélé des altérations tissulaires majeures, notamment une destruction de la structure cellulaire des villosités intestinales, ce qui pourrait perturber l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'osmorégulation et du transport des nutriments. De même, une étude menée par Agrahari et Gopal (2008) a montré que l'insecticide monocrotophos inhibait l'activité des Na⁺/K⁺-ATPases dans l'intestin de *Channa punctatus*, renforçant l'idée que certains pesticides peuvent altérer de manière significative ces enzymes essentielles.

***Conclusion et
perspectives***

5. Conclusion et perspectives

La présente étude met en évidence les effets secondaires induits par l'utilisation non contrôlée des insecticides néonicotinoïdes sur les écosystèmes aquatiques et évalue leur impact toxicologique sur les poissons. Elle a porté sur l'évaluation de la toxicité aiguë d'un pesticide néonicotinoïde, l'acétamipride très utilisé en Algérie, chez les alevins d'*Alburnus alburnus*, une espèce de poisson d'eau douce. Les travaux ont consisté à déterminer la concentration létale médiane (CL50), analyser le résidu d'acétamipride dans l'eau d'élevage des poissons après 96 heures d'exposition par la HPLC et d'identifier les effets de deux concentrations environnementales (150 et 300 µg/L) sur les tissus des branchies, du foie et des intestins. En outre, l'étude a examiné les variations de l'expression génique de la Na⁺/K⁺-ATPase dans les branchies et les intestins, ainsi que de la SOD1 dans le foie, après une exposition de 96 heures.

Les résultats de la toxicité aiguë ont permis de déterminer la concentration létale (CL50) de l'acétamipride chez les alevins d'*Alburnus alburnus*. Les valeurs obtenues pour la CL50 étaient respectivement de 40,05 mg/L, 36,55 mg/L, 34,75 mg/L et 34,54 mg/L pour les temps d'exposition de 24, 48, 72 et 96 heures. Ces résultats ont permis de classer cet insecticide parmi les substances légèrement toxiques (>10 mg/L) et mettent en lumière la toxicité aiguë des néonicotinoïdes et soulignent la vulnérabilité de cette espèce aux contaminants chimiques.

Les analyses de l'histopathologie menées sur les tissus des branchies, du foie et des intestins ont été évaluées en utilisant deux concentrations sublétales de l'acétamipride (0,46 % et 0,92% de CL50 de 96 heures) a révélé des modifications histologiques notables, y compris une inflammation sévère, une dégénérescence cellulaire et nécrose, une congestion et une désorganisation structurale des lamelles branchiales, du parenchyme hépatique et des villosités intestinales. Dans cette étude, les modifications histopathologiques observées sont considérées comme un biomarqueur fiable pour évaluer les effets délétères de l'acétamipride sur les poissons d'eau douce.

Au niveau moléculaire, l'effet de l'acétamipride sur les gènes Na⁺/K⁺-ATPase et SOD1, à des concentrations sublétales tirées de la littérature, a montré que l'exposition aiguë à cet insecticide induit une modification de l'expression de ces gènes. Des changements histologiques significatifs, corroborés par ces données d'expression génique, suggèrent une perturbation des fonctions physiologiques fondamentales.

Conclusion et perspectives

La stimulation ou l'inhibition de l'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase entraîne des déséquilibres métaboliques et ioniques chez les poissons, qui ont un impact direct sur leur capacité à réguler l'osmorégulation et le transport des nutriments. La différence dans la modulation de la SOD1 indique clairement que le système de défense antioxydant a été altéré par l'exposition à l'acétamipride, entraînant un stress oxydatif croissant.

Les résultats de cette recherche ont révélé une sensibilité élevée des juvéniles d'*A. alburnus* par rapport à d'autres espèces d'eau douce, soulignant ainsi que la variabilité de la réponse des poissons doit être prise en compte pour une évaluation précise des risques environnementaux liés aux pesticides. Ces résultats indiquent également qu'il est essentiel de définir une stratégie de test écotoxicologique étendue, incluant l'évaluation des doses létales et l'utilisation de marqueurs d'exposition reconnus. De plus, ils mettent en évidence la nécessité d'élargir le panel de tests requis pour l'approbation des composés agrochimiques et d'utiliser divers outils de diagnostic pour les investigations écotoxicologiques.

En perspectives, ces travaux ouvrent plusieurs axes de recherche pour approfondir l'évaluation des effets des néonicotinoïdes sur les écosystèmes aquatiques :

- ✓ **Étude de l'exposition chronique** : Afin de mieux comprendre les effets à long terme de l'acétamipride, des études d'exposition chronique seraient nécessaires. Cela permettrait d'évaluer les conséquences physiopathologiques et comportementales sur *Alburnus alburnus* à des doses sublétales sur de longues périodes.
- ✓ **Exploration des effets sur l'intestin** : L'intestin, bien que crucial dans les processus d'absorption et de détoxification des substances, reste un organe relativement peu étudié dans le contexte de la toxicologie des pesticides. Des investigations supplémentaires sur les effets de l'acétamipride sur l'intestin seraient donc essentielles.
- ✓ **Évaluation du stress oxydatif** : L'analyse de l'impact de l'acétamipride sur d'autres biomarqueurs du stress oxydatif (par exemple, CAT, GSH, AChE) permettrait de mieux appréhender les mécanismes de défense cellulaire et de compléter l'évaluation de la toxicité de cet insecticide.
- ✓ **Bioaccumulation de l'acétamipride** : Une étude approfondie sur le processus de bioaccumulation de l'acétamipride chez *Alburnus alburnus* permettrait de mieux comprendre son transfert dans la chaîne trophique, avec des implications potentielles pour la santé des organismes aquatiques et des consommateurs humains.

Conclusion et perspectives

- ✓ **Étude comparative des néonicotinoïdes** : Enfin, il serait crucial d'élargir ces recherches à d'autres néonicotinoïdes et à différentes concentrations d'exposition afin d'obtenir une évaluation plus globale des risques environnementaux associés à ces pesticides. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à leurs effets toxiques permettra de mieux orienter les stratégies de surveillance et de gestion des polluants dans les milieux aquatiques.

Résumé

Résumé

L'utilisation croissante des néonicotinoïdes, en particulier l'acétamipride, dans l'agriculture à l'échelle mondiale et leur application souvent excessive par les agriculteurs ont soulevé une vive controverse. Ces pesticides sont devenus une menace sérieuse pour les organismes aquatiques, notamment les poissons d'eau douce, surtout dans les zones proches des terres agricoles et des exploitations agricoles. L'objectif de cette étude était d'identifier la concentration létale médiane, CL50 d'une formulation commerciale de néonicotinoïdes (acétamipride 20 % SP) sur la survie d'*Alburnus alburnus*, Déterminer la concentration de résidus d'acétamipride dans l'eau d'élevage des poissons après une exposition de 96 heures à cet insecticide, et d'analyser l'impact de deux concentrations environnementales (150 et 300 µg/litre) sur les tissus des branchies, du foie et des intestins. Cette étude a également examiné les variations de l'expression génique de la NaK-ATPase dans les branchies et les intestins, ainsi que de la SOD1 dans le foie, après une exposition de 96 heures. Les résultats ont révélé une mortalité significative des poissons avec l'augmentation des concentrations d'acétamipride. Les valeurs de CL50 obtenues à 24, 48, 72 et 96 heures étaient respectivement de 44,05, 36,55, 34,75 et 34,54 mg/L. L'analyse HPLC a détecté la présence de l'insecticide à une concentration moyenne de $19,01 \pm 5,28$ µg/l suite à une période de 96 heures, montrant une diminution d'environ 94 % du taux de résidus d'acétamipride par rapport à sa concentration initiale. Cela démontre la photodégradation de ce pesticide et son incorporation dans l'organisme des alevins traités. L'analyse histopathologique a mis en évidence des lésions sévères, notamment des nécroses, dans tous les organes examinés, avec une aggravation des effets en fonction de la concentration du pesticide. Ces modifications structurelles perturbent la respiration et la capacité des branchies à filtrer les substances toxiques, influencent les fonctions du foie telles que la détoxification, la production d'enzymes, le métabolisme et affectent l'épithélium intestinal ce qui peut augmenter sa perméabilité, facilitant ainsi l'introduction de substances nocives dans le corps. De plus, l'expression génique de la NaK-ATPase dans les branchies et les intestins, ainsi que de la SOD1 dans le foie, a été modifiée après l'exposition à diverses concentrations environnementales de l'acétamipride signalant une perturbation des fonctions physiologiques essentielles. Cette recherche démontre clairement que ce néonicotinoïde perturbe le système de défense antioxydant, provoquant une stimulation du stress oxydatif et contribuant à des changements structurels significatifs chez les alevins d'*Alburnus alburnus*.

Mots-clés : Acétamipride, Néonicotinoïde, *Alburnus alburnus*, toxicité, expression génique, histopathologie.

Abstract

The increasing use of neonicotinoids, in particular acetamiprid, in agriculture worldwide and their excessive applications by farmers have given rise to considerable controversy. These pesticides have become a serious threat to aquatic organisms, particularly freshwater fish, especially in areas close to agricultural land and farms. The aim of this study was to identify the median lethal concentration (LC50) of a commercial formulation of neonicotinoids (acetamiprid 20% SP) on the survival of *Alburnus alburnus*, to determine the concentration of acetamiprid residues in the rearing water of fish after 96 hours exposure to this insecticide, and to analyse the impact of two environmental concentrations (150 and 300 µg/litre) on gill, liver and intestinal tissues. The study also examined variations in the gene expression of NaK-ATPase in the gills and intestines, and of SOD1 in the liver, after exposure for 96 hours. The results showed significant fish mortality with increasing concentrations of acetamiprid. The LC50 values obtained at 24, 48, 72 and 96 hours were 44.05, 36.55, 34.75 and 34.54 mg/L respectively. HPLC analysis detected the presence of the insecticide at an average concentration of 19.01 ± 5.28 µg/l following a 96-hour period, showing a reduction of around 94% in the acetamiprid residue level compared with its initial concentration. Histopathological analysis revealed severe lesions, particularly necrosis, in all the organs examined, with the effects worsening with increasing pesticide concentration. These structural changes disrupt respiration and the ability of the gills to filter toxic substances, influence liver functions such as detoxification, enzyme production and metabolism, and affect the intestinal epithelium, which can increase its permeability, facilitating the introduction of harmful substances into the body. In addition, gene expression of NaK-ATPase in the gills and intestines, and of SOD1 in the liver was altered following exposure to various environmental concentrations of acetamiprid, signalling a disruption of essential physiological functions. This research clearly demonstrates that this neonicotinoid disrupts the antioxidant defence system, causing a stimulation of oxidative stress and contributing to significant structural changes in *Alburnus alburnus* fry.

Key words: Acetamiprid, neonicotinoid, *Alburnus alburnus*, toxicity, gene expression, histopathology.

ملخص

أثار الاستخدام المتزايد للمبيدات النيونيكوتينويدية، وخاصة الأسيتامبريد، في الزراعة في جميع أنحاء العالم والإفراط في استخدامها من قبل المزارعين جدلاً كبيراً. وأصبحت هذه المبيدات تشكل تهديداً خطيراً للكائنات المائية، وخاصة الأسماك في المياه العذبة، بالتحديد في المناطق القريبة من الأراضي الزراعية والمزارع. كان الهدف من هذه الدراسة هو تحديد التركيز المميت المتوسط، CL50 لتركيبية تجارية من النيونيكوتينويدات (أسيتامبريد 20% SP) على بقاء *Alburnus alburnus*، تحديد تركيز بقايا الأسيتامبريد في مياه تربية الأسماك بعد التعرض لمدة 96 ساعة لهذا المبيد الحشري وتحليل تأثير تركيزين بيئيين (150 و 300 ميكروجرام / لتر) على أنسجة الخياشيم والكبد والأمعاء. كما بحثت هذه الدراسة أيضاً التغيرات في التعبير الجيني لـ NaK ATPase في الخياشيم والأمعاء، وكذلك SODI في الكبد، بعد التعرض لمدة 96 ساعة. وأظهرت النتائج حدوث وفيات كبيرة للأسماك مع زيادة تركيزات الأسيتامبريد. وكانت قيم CL50 التي تم الحصول عليها عند 24 و 48 و 72 و 96 ساعة 34.75 و 36.55 و 44.05 و 34.54 ملغم/لتر على التوالي. كشف تحليل HPLC عن وجود المبيد الحشري بتركيز متوسط ± 19.01 و 5.28 ميكروجرام / لتر بعد فترة 96 ساعة، مما يدل على انخفاض بنسبة 94% تقريباً في مستوى بقايا الأسيتامبريد مقارنة بتركيزه الأولي. يوضح هذا التحلل الضوئي لهذا المبيد واندماجه في جسم الزريعة المعالجة. وأظهر التحليل النسيجي وجود آفات شديدة، بما في ذلك النخر، في جميع الأعضاء التي تم فحصها، مع تقاوم التأثيرات اعتماداً على تركيز المبيد. تؤدي هذه التغيرات البنوية إلى تعطيل عملية التنفس وقدرة الخياشيم على تصفية المواد السامة، وتؤثر على وظائف الكبد مثل إزالة السموم، إنتاج الإنزيمات، التمثيل الغذائي وتؤثر على ظاهرة الأمعاء مما قد يزيد من نفاذيتها، وبالتالي تسهيل إدخال المواد الضارة إلى الجسم. وعلاوة على ذلك، تغير التعبير الجيني لـ NaK ATPase في الخياشيم والأمعاء، وكذلك SODI في الكبد، بعد التعرض لتركيزات بيئية مختلفة من الأسيتامبريد، مما يشير إلى تعطيل الوظائف الفسيولوجية الأساسية. يشير هذا البحث بوضوح أن هذا النيونيكوتينويد يعطل نظام الدفاع المضاد للأوكسدة، مما يسبب تحفيز الإجهاد التأكسدي ويساهم في تغييرات هيكلية كبيرة في صغار سمك *Alburnus alburnus*.

الكلمات الرئيسية: أسيتامبريد، نيونيكوتينويد، سمك *Alburnus Alburnus*، السمية، التعبير

الجيني، علم الأمراض النسيجي.

Références

Références

- Abdel-Khalek, A. A., Morsy, K., & Shati, A. (2020). Comparative assessment of genotoxic impacts induced by zinc bulk-and nano-particles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 104, 366-372.
- Abdalmouaiz, I.A., Macirella, R., Talarico, F., Curcio, V., Trotta, G., Aiello, D., Gharbi, N., Mezzasalma, M., & Brunelli, E. (2023). Short-term effects of the strobilurin fungicide dimoxystrobin on zebrafish gills: A morpho-functional study. *Chemosphere*, 333: 138914.
- Afshan, S., Ali, S., Ameen, U. S., Farid, M., Bharwana, S. A., Hannan, F., & Ahmad, R. (2014). Effect of different heavy metal pollution on fish. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, 2, 74–79.
- Agrahari, S., & Gopal, K. (2008). Inhibition de la Na⁺–K⁺-ATPase dans différents tissus de poissons d'eau douce *Channa punctatus* (Bloch) exposés au monocrotophos. *Biochimie et physiologie des pesticides*, 92 (2), 57-60.
- Agrawal, A., Pandey, R. S., & Sharma, B. (2010). Water pollution with special reference to pesticide contamination in India. *Journal of Water Resource and Protection*, 2(5), 432-448.
- Ahmed, A. I., Macirella, R., Talarico, F., Curcio, V., Trotta, G., Aiello, D., ... & Brunelli, E. (2023). Short-term effects of the strobilurin fungicide dimoxystrobin on zebrafish gills : A morpho-functional study. *Chemosphere*, 333, 138914.
- Aït Hamlet, S., Djekoun, M., Bensoltane, S., & Berrebbah, H. (2019). Effets du thiaméthoxame et de la téfluthrine sur les biomarqueurs physiologiques de l'escargot terrestre *Helix Aspersa*. *AGROBIOLOGIA*, 9(2), 1491-1498.
- Alabaster JS, Lloyd R (1980) *Water quality criteria for fresh- water fish*. 2nd edn. Butterworths, London and Boston, p 382
- Alabaster, J. S., & Lloyd, R. S. (2013). *Water quality criteria for freshwater fish* (N°. 3117). Elsevier.
- Al-Alam, J. (2017). *Polluants organiques: analyse, application au «biomonitoring» environnemental et introduction des biopesticides (algues marines) comme alternative* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg; Université Libanaise).
- Alam, A., Tabinda, A. B., & Abdullah, Y. (2014). Comparative toxicity of acetamiprid and azadirachta indica leave extract on biochemical components of blood of labeo rohita. *Pakistan Journal of Zoology*, 46(6).

Références bibliographiques

- Almeida, D., Fletcher, D. H., Rangel, C., García-Berthou, E., & Da Silva, E. (2017). Dietary traits of invasive bleak *Alburnus alburnus* (Actinopterygii, Cyprinidae) between contrasting habitats in Iberian fresh waters. *Hydrobiologia*, *795*, 23-33.
- Almeida, D., Stefanoudis, P. V., Fletcher, D. H., Rangel, C., & da Silva, E. (2014). Population traits of invasive bleak *Alburnus alburnus* between different habitats in Iberian fresh waters. *Limnologica*, *46*, 70-76.
- Alsafy, M. A., Abd-Elhafeez, H. H., Rashwan, A. M., Erasha, A., Ali, S., & El-Gendy, S. A. (2025). Anatomy, histology, and morphology of fish gills in relation to feeding habits: a comparative review of marine and freshwater species. *BMC zoology*, *10*(1), 3.
- Alsafy, MA (2013). Morphologie des branchies chez deux poissons de la mer Méditerranée ayant des préférences alimentaires similaires : la dorade (*Sparus aurata* L) et le bar (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Research Communications* , *37* , 163-170.
- Al-Yousuf, MH, El-Shahawi, MS, et Al-Ghais, SM (2000). Traces de métaux dans le foie, la peau et les muscles des poissons *Lethrinus lentjan*, en fonction de la longueur du corps et du sexe. *Science de l'environnement total* , *256* (2-3), 87-94.
- Amalric, L. (2009). Analyse des pesticides dans les eaux. *Géologues*, *162*, 14-21.
- Amat-Trigo, F., Torralva, M., Ruiz-Navarro, A., & Oliva-Paterna, F. J. (2019). Colonization and plasticity in population traits of the invasive *Alburnus alburnus* along a longitudinal river gradient in a Mediterranean river basin.
- Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C. (2017). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, 2e édition. *Environ Sci Pollut Res* **28**, 19367–19380. Doi.org/10.1007/s11356-020-12112-0
- Anderson, T. A., Salice, C. J., Erickson, R. A., McMurry, S. T., Cox, S. B., & Smith, L. M. (2013). Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere*, *92*(1), 84-90.
- Ansoar-Rodríguez, Y., Christofolletti, CA, Correia, JE, de Souza, RB, Moreira-de-Sousa, C., Marcato, ACDC, ... & Fontanetti, CS (2016). Altérations hépatiques chez *Oreochromis niloticus* (Pisces) induites par l'insecticide imidaclopride : histopathologie et localisation in situ de la protéine de choc thermique. *Journal of Environmental Science and Health, partie B* , *51* (12), 881-887.
- ARLA (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada).(2002) Acetamiprid, Assail Brand 70 WP Insecticide, Chipco Brand Tristar 70 WSP Insecticide, Pristine Brand RTU Insecticide. Ottawa, Regulatory note.

- Asifa Alam, AA, Tabinda, AB, Mahmood-ul-Hassan, MUH et Abdullah Yasar, AY (2014). Toxicité comparative de l'acétamipride et de l'extrait de feuilles d'*Azadirachta indica* sur les composants biochimiques du sang de *Labeo rohita*. *Pak. J. Zool.*, 46, 1515–1520.
- Attou, F. & Arab, A. (2013). Impact de l'introduction d'*Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1759) sur l'espèce autochtone *Barbus setivimensis* (Valenciennes, 1842) (poissons Cyprinidés) dans le lac de barrage de Keddara (Algérie). *Revue d'écologie*. 68 (2): 193-202.
- Attou, F. (2010). *Dynamique de population d'Alburnus alburnus (Poisson Cyprinidae) dans le lac de barrage de Keddara (W. Boumerdès)* (Doctoral dissertation).
- Attou, F., & Arab, A. (2019). Biology and ecology of the accidentally introduced bleak, *Alburnus alburnus* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae), in Keddara Dam Lake, Algeria. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 49(2), 119-132.
- Azadikhah, D., Baghdari, M. V., Dadras, M., Kadhim, S. I., Kareem, A. K., & Hussein, H. A. (2023). Evaluation of histopathological and hematological effects of neonicotinoid (acetamiprid 20% SP) on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Research*, 2023(1), 9951536.
- Azenha, M. E., Romeiro, A., & Sarakha, M. (2013). Photodegradation of Pesticides and Photocatalysis in the Treatment of Water and Waste. In *Applied photochemistry* (pp. 247-266). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Badroo, I. A., Nandurkar, H. P., & Khanday, A. H. (2020). Toxicological impacts of herbicide paraquat dichloride on histological profile (gills, liver, and kidney) of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 39054-39067.
- Bakke, AM, Glover, C. et Krogdahl, Å. (2010). Alimentation, digestion et absorption des nutriments. Dans *Physiologie du poisson* (Vol. 30, pp. 57-110). Presse académique.
- Baldisserotto, B., Garcia, L. O., Benaduce, A. P., Duarte, R. M., Nascimento, T. L., Gomes, L. C., ... & Val, A. L. (2012). Sodium fluxes in tamoatá, *Hoplosternum littorale*, exposed to formation water from Urucu Reserve (Amazon, Brazil). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 62, 78-84.
- Balon, E. K. (1975). Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32(6), 821-864.
- Balzani, P., Gozlan, R. E., & Haubrock, P. J. (2020). Overlapping niches between two co-occurring invasive fish: the topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva* and the common bleak *Alburnus alburnus*. *Journal of Fish Biology*, 97(5), 1385-1392.

- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. R., & Ahmadi, K. (2013). Biochemical and histological changes in the liver tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. *Fish physiology and biochemistry*, 39, 489-501.
- Banić, N. D., Šojić, D. V., Krstić, J. B., & Abramović, B. F. (2014). Photodegradation of neonicotinoid active ingredients and their commercial formulations in water by different advanced oxidation processes. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225, 1-10.
- Barbieri, M. V., Peris, A., Postigo, C., Moya-Garcés, A., Monllor-Alcaraz, L. S., Rambla-Alegre, M., ... & de Alda, M. L. (2021). Evaluation of the occurrence and fate of pesticides in a typical Mediterranean delta ecosystem (Ebro River Delta) and risk assessment for aquatic organisms. *Environmental Pollution*, 274, 115813.
- Bassuoni, NF (2021). Morphologie des branchies de *Bagrus bayad* (Forskal, 1775) par microscopie électronique à balayage. *Recherche et technique en microscopie*, 84 (12), 3059-3065.
- Bayır, M., & Özdemir, E. (2023). Organisation génomique et transcription des gènes de superoxyde dismutase (sod1, sod2 et sod3b) et réponse à la toxicité du diazinon chez le platyfish (*Xiphophorus maculatus*) en utilisant l'activité enzymatique SOD. *Animal Biotechnology*, 34 (8), 3578-3588.
- Belhabib, L., Belhoucine, F., Tabeche, A. & Alioua, A. (2023). Bioaccumulation and biomarker responses caused by organochlorine pesticides in bogue Boops boops (Linnaeus, 1758) from the Bay of Oran, Algeria. *Applied Ecology and Environmental Research* 21(2):1629-1654
- Benchaâbane, S., Ayad, AS, Loucif-Ayad, W., & Soltani, N. (2022). Réponses multibiomarqueurs après exposition à une concentration sublétale de thiaméthoxame chez l'abeille africaine (*Apis mellifera intermissa*). *Biochimie et physiologie comparées, partie C : toxicologie et pharmacologie*, 257, 109334.
- Benitez, J. P., Nzau Matondo, B., Dierckx, A., & Ovidio, M. (2015). An overview of potamodromous fish upstream movements in medium-sized rivers, by means of fish passes monitoring. *Aquatic Ecology*, 49, 481-497.
- Berens, M. J., Capel, P. D., & Arnold, W. A. (2021). Neonicotinoid insecticides in surface water, groundwater, and wastewater across land-use gradients and potential effects. *Environmental toxicology and chemistry*, 40(4), 1017-1033.
- Bermúdez-Saldaña, J. M., Escuder-Gilabert, L., Medina-Hernández, M. J., Villanueva-Camañas, R. M., & Sagrado, S. (2005). Modelling bioconcentration of pesticides in fish using

- biopartitioning micellar chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1063(1-2), 153-160.
- Berrouk, H., Kabech, B., Rahel, R. & Kaouther, H. (2012). Oxycological and histopathological impact of insecticide acetamiprid and agricultural fertilizer activeg on earthworm (*Aporrectodea giardi*). *Applied Biological Research*. 23(4):341-348.
- Bertolucci, B., Vicentini, C. A., Vicentini, I. B. F., & Bombonato, M. T. S. (2008). Light microscopy and ultrastructure of the liver of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 30(1), 73-76.
- Bettiche, F., Bengouga, K., Diab, N., Bakroune, N., Djoghma, A., Guesmia, H., ... & Rouahna, H. (2023). Les risques des pesticides Néonicotinoïdes sur les pollinisateurs. *Journal Algérien des Régions Arides*, 16(1), 68-74.
- Bettiche, F., Chaïb, W., Halfadji, A., Mancer, H., Bengouga, K., & Grunberger, O. (2021). Les problèmes de santé humaine liés aux pesticides agricoles autorisés : le cas algérien. *Microbial Biosystems* , 5 (2), 69-82.
- Bhuvaneshwari, R., Padmanaban, K., & Babu Rajendran, R. (2015). Histopathological alterations in muscle, liver and gill tissues of zebra fish *Danio rerio* due to environmentally relevant concentrations of organochlorine pesticides (OCPs) and heavy metals. *International Journal of Environmental Research*, 9(4), 1365-1372.
- Billard, R., & Monod, T. (1997). *Les poissons d'eau douce des rivières de France: identification, inventaire et répartition des 83 espèces*. Delachaux et Niestlé. , Paris, p 192
- Bíró, P., & Muskó, I. B. (1995). Population dynamics and food of bleak (*Alburnus alburnus* L.) in the littoral zone of Lake Balaton, Hungary. *Hydrobiologia*, 310, 139-149.
- Blanc, A., & Lamouroux, N. (2007). Large-scale intraspecific variation in life-history traits of European freshwater fish. *Journal of Biogeography*, 34(5), 862-875.
- Blanchard, E. (1866). *Les poissons des eaux douces de la France: anatomie, physiologie, description des espèces, mœurs, instincts, industrie, commerce, ressources alimentaires, pisciculture, législation concernant la pêche*. Baillière.
- Blanck, A., Tedesco, P. A., & Lamouroux, N. (2007). Relationships between life-history strategies of European freshwater fish species and their habitat preferences. *Freshwater biology*, 52(5), 843-859.
- Bohl, E. (1979). Diel pattern of pelagic distribution and feeding in planktivorous fish. *Oecologia*, 44, 368-375.

- Boland, J., Koomen, I., van Lidth de Jeude, J., & Oudejans, J. (2004). Les pesticides: composition, utilisation et risques. *Wageningen: Agrodok*.
- Bonmatin, JM, Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, DP, Krupke, C., ... & Tapparo, A. (2015). Devenir dans l'environnement et exposition ; néonicotinoïdes et fipronil. *Sciences de l'environnement et recherche sur la pollution* , 22 (1), 35-67.
- Bonnechère, A., Hanot, V., Jolie, R., Hendrickx, M., Bragard, C., Bedoret, T., & Van Loco, J. (2012). Facteurs de transformation de plusieurs pesticides et produits de dégradation dans les carottes par transformation domestique et industrielle. *Journal of Food Research* , 1 (3), 68-83.
- Boran, H., Altinok, I. et Capkin, E. (2010). Modifications histopathologiques induites par le manèbe et le carbaryl sur certains tissus de truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. Tissus et cellules , 42 (3), 158-164.
- Boye, K., Boström, G., Jonsson, O., Gönczi, M., Löfkvist, K., & Kreuger, J. (2022). Greenhouse production contributes to pesticide occurrences in Swedish streams. *Science of the Total Environment*, 809, 152215.
- Brodersen, J., Ådahl, E., Brönmark, C., & Hansson, L. A. (2008). Ecosystem effects of partial fish migration in lakes. *Oikos*, 117(1), 40-46.
- Bruslé, J., & i Anadon, G. G. (2017). The structure and function of fish liver. In *Fish morphology* (pp. 77-93). Routledge.
- Buj, I., Vukić, J., Šanda, R., Perea, S., Čaleta, M., Marčić, Z., ... & Mrakovčić, M. (2010). Morphological comparison of bleaks (*Alburnus*, Cyprinidae) from the Adriatic Basin with the description of a new species. *Folia zoologica*, 59(2), 129-141.
- Burden, N., Benstead, R., Benyon, K., Clook, M., Green, C., Handley, J., ... & Hutchinson, T. H. (2020). Key opportunities to replace, reduce, and refine regulatory fish acute toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(10), 2076-2089.
- Busacker, GP et Chavin, W. (1981). Caractérisation des Na⁺⁺ K⁺⁻ATPases et Mg²⁺⁻ATPases des branchies et des reins du poisson rouge (*Carassius auratus* L.). *Biochimie comparée et physiologie, partie B : Biochimie comparée* , 69 (2), 249-256.
- Caballero, M. J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F. J., Izquierdo, M. S., & Fernández, A. J. (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179(1-4), 277-290.
- Cahu, C. (2004). Domestication et fonction nutrition chez les poissons. *INRAE Productions Animales*, 17(3), 205-210.

- Campos-Garcia, J., Martinez, D. S. T., Rezende, K. F. O., da Silva, J. R. M. C., Alves, O. L., & Barbieri, E. (2016). Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 133, 481-488.
- Capela, N., Xu, M., Simões, S., Azevedo-Pereira, HM, Peters, J., & Sousa, JP (2022). Évaluation de l'exposition et des risques liés à l'acétamipride dans les colonies d'abeilles mellifères dans le cadre d'un scénario d'exposition réel dans des paysages d'Eucalyptus sp. *Science de l'environnement total*, 840, 156485.
- Carreira, S., Costa, P. M., Martins, M., Lobo, J., Costa, M. H., & Caeiro, S. (2013). Ecotoxicological heterogeneity in transitional coastal habitats assessed through the integration of biomarkers and sediment-contamination profiles: a case study using a commercial clam. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64, 97-109.
- Casida, J.E. & Durkin, K.A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance and secondary effects. *Annual Review of Entomology*. 58:99-117. doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645.
- Cengiz, EI (2006). Histopathologie des branchies et des reins chez le poisson d'eau douce *Cyprinus carpio* après une exposition aiguë à la deltaméthrine. *Toxicologie environnementale et pharmacologie*, 22 (2), 200-204
- Cengiz, EI et Unlu, E. (2006). Effets sublétaux de la deltaméthrine commerciale sur la structure des tissus branchiaux, hépatiques et intestinaux du poisson-moustique, *Gambusia affinis* : une étude microscopique. *Toxicologie environnementale et pharmacologie*, 21 (3), 246-253.
- Cengiz, EI, Ünlü, E., & Balcı, K. (2001). Les effets histopathologiques du Thiodan® sur le foie et l'intestin du *Gambusia affinis*. *Journal of Environmental Science and Health, Partie B*, 36 (1), 75-8
- Černý J, Copp GH, Kováč V, Gozlan RE, Vilizzi L (2003) Initial impact of the Gabčíkovo hydroelectric scheme on 0+ fish assemblages in the Slovak flood plain. *River Danube River Res Appl* 19(7):749–766.
- Chappaz, R., Brun, G., & Olivari, G. (1987). Mise en évidence de différences de régime alimentaire dans une population d'ablettes *Alburnus alburnus* (L.) dans le lac de Sainte-Croix. Conséquences sur la croissance et la fécondité. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 23, No. 3, pp. 245-252). EDP Sciences.
- Chauhan, V., Yadav, R. S., & Kumar, R. (2014). Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity: A review. *Journal of Environmental Biology*, 35(4), 771-777.

Références bibliographiques

- 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.
- Chen, QL, Sun, YL, Liu, ZH et Li, YW (2017). Effets dépendants du sexe de l'exposition subaiguë au chlorure mercurique sur l'histologie, le statut antioxydant et l'expression des gènes liés au système immunitaire dans le foie du poisson zèbre adulte (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 188, 1-9.
- Clasen, B., Loro, V. L., Murussi, C. R., Tiecher, T. L., Moraes, B., & Zanella, R. (2018). Bioaccumulation and oxidative stress caused by pesticides in *Cyprinus carpio* reared in a rice-fish system. *Science of the total environment*, 626, 737-743.
- Clavero, M., Esquivias, J., Qninba, A., Riesco, M., Calzada, J., Ribeiro, F., ... et Delibes, M. (2015). Poissons envahissant les déserts : espèces non indigènes des rivières arides marocaines. *Conservation aquatique : écosystèmes marins et d'eau douce*, 25 (1), 49-60.
- Coad, B. (2005). Endemicity in the freshwater fishes of Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics*, 1(1), 1-13.
- Collier, R., Jukes, A., Daniel, C., Hommes, M. (2016). Ecological selectivity of pesticides and application methods. *IOBC-WPRS Bull*, 118: 94-8.
- Conlong, DE et Mugoya, CF (1996). L'élevage d'insectes utiles en vue de la lutte biologique dans les régions sous-industrialisées d'Afrique. *Entomophaga*, 41, 505-512.
- Copp, G. H. (1992). Comparative microhabitat use of cyprinid larvae and juveniles in a lotic floodplain channel. In *Environmental biology of European cyprinids: Papers from the workshop on 'The Environmental Biology of Cyprinids' held at the University of Salzburg, Austria, in September 1989* (pp. 181-194). Springer Netherlands.
- Copp, G. H., & Peñáz, M. (1988). Ecology of fish spawning and nursery zones in the flood plain, using a new sampling approach. *Hydrobiologia*, 169, 209-224.
- Copp, GH (1989). La diversité des habitats et la fonction de reproduction des poissons dans les écosystèmes des plaines inondables. *Biologie environnementale des poissons*, 26, 1-27.
- Cossi, PF, Herbert, LT, Yusseppone, MS, Pérez, AF, & Kristoff, G. (2020). Évaluation de la toxicité de l'acétamipride, principe actif, et d'une formulation commerciale (Assail® 70) sur le gastéropode non ciblé *Biomphalaria straminea* (mollusque : Planorbidae). *Écotoxicologie et sécurité environnementale*, 192, 110248.

- Crambert, G., Hasler, U., Beggah, A. T., Yu, C., Modyanov, N. N., Horisberger, J. D., ... & Geering, K. (2000). Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1976-1986.
- Crenna, E., Sala, S., Polce, C. & Collina, E. (2017). Pollinators in life cycle assessment: towards a framework for impact assessment. *Journal of Cleaner Production*. 140:525- 36. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.02.058>
- Da Rosa, C. E., Figueiredo, M. A., Lanes, C. F., Almeida, D. V., & Marins, L. F. (2011). Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic research*, 20, 85-89.
- Daget, J. (1954). Les poissons du Niger supérieur. 2^{ème} édition : 34 - 38.
- Davey, A.J.H., Bailey, L., Bewes, V., Mubaiwa, A., Hall, J., Burgess, C., Dunbar, M.J., Smith, P.D., & Rambohu, I.J., 2020. Water quality benefits from an advice-led approach to reducing water pollution from agriculture in England. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 296 : 106925. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106925>
- Davis, K. B., Goudie, C. A., Simco, B. A., Mac Gregor III, R., & Parker, N. C. (1986). Environmental regulation and influence of the eyes and pineal gland on the gonadal cycle and spawning in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Physiological Zoology*, 59(6), 717-724.
- De Domenico, E., Mauceri, A., Giordano, D., Maisano, M., Giannetto, A., Parrino, V., ... & Fasulo, S. (2013). Biological responses of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and environmental safety*, 97, 114-123.
- De Domenico, E., Mauceri, A., Giordano, D., Maisano, M., Gioffrè, G., Natalotto, A., ... & Fasulo, S. (2011). Effects of “in vivo” exposure to toxic sediments on juveniles of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic toxicology*, 105(3-4), 688-697.
- Delmond, K.A., Vicari, T., Guiloski, I.C., Dagostim, A.C., Voigt, C.L., Silva de Assis, H.C., Ramsdorf, W.A., & Cestari, M.M., 2019. Antioxidant imbalance and genotoxicity detected in fish induced by titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and inorganic lead (PbII). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67 : 42-52. Doi:10.1016/j.etap.2019.01.009
- Delolme, H., Boutin, J., & Andre, L. J. (1992). Eau douce et Pathologie. *Médecine d’Afrique Noire*, 39(3).
- Demirci, Ö., & Güngördü, A. (2020). Evaluation of the biochemical effects of an acetamiprid-based insecticide on a non-target species, *Gambusia holbrooki*. *Water and Environment Journal*, 34, 481-489.

- Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Population Prospects: The 2017 Revision, World Population 2017*. Data Booklet. ST/ESA/SER.A/401 (United Nations, 2017).
- Devi, Y., & Mishra, A. (2013). Histopathological Alterations in Gill and Liver Anatomy of Fresh Water, Air Breathing Fish *Channa Punctatus* after Pesticide Hilban®(Chlorpyrifos) Treatment. *Advances in BioResearch*, 4(2).
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., ... & Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honeybees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18466-18471.
- Díaz, A. O., Castro, M. G., García, A. M., de Astarloa, J. M. D., & Figueroa, D. E. (2009). Gross morphology and surface ultrastructure of the gills of *Odontesthes argentinensis* (Actinopterygii, Atherinopsidae) from a Southwestern Atlantic coastal lagoon. *Tissue and cell*, 41(3), 193-198.
- Díaz, A. O., Castro, M. G., García, A. M., de Astarloa, J. M. D., & Figueroa, D. E. (2009). Gross morphology and surface ultrastructure of the gills of *Odontesthes argentinensis* (Actinopterygii, Atherinopsidae) from a Southwestern Atlantic coastal lagoon. *Tissue and cell*, 41(3), 193-198.
- Dodd, J. A., Vilizzi, L., Bean, C. W., Davison, P. I., & Copp, G. H. (2019). At what spatial scale should risk screenings of translocated freshwater fishes be undertaken-River basin district or climo-geographic designation?. *Biological Conservation*, 230, 122-130.
- DPVCT Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques (DPVCT). (2015). *Index des produits phytosanitaires à usage agricole*. http://www.inpv.edu.dz/institut/wpcontent/uploads/2016/03/INDEX_PRODUIITS_PHYTO_2015.pdf
- Duran, M., Tüzen, M. & Kayim, M. (2003). Exploration of biological richness and water quality of stream Kelkit, Tokat-Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(4): 370-375.
- El Badaoui, N., Amar, Y., Justo, C. J., Djahed, B., Ammar, H., Benosman, R. & Thomé, J.P. (2015): Assessment of pollution in Sidi M'Hamed Benali Lake (Algeria): based on bioindicators and physicochemical parameters. *Iranica Journal of Energy and Environment* 6(4): 308-315. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2015.06.04.09>.

- El Hadeef El Okki, M., Ait Kaki El Hadeef El Okki, A. & Sahli, L. (2022). Acute toxicity of two commercial preparations of acetamiprid to *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) using contact filter paper test. *Applied Ecology and Environmental Research* 20(6):5173-5181.
- El-Garawani, I. M., Khallaf, E. A., Alne-Na-Ei, A. A., Elgendy, R. G., Sobhy, H. M., Khairallah, A., ... & Nofal, A. E. (2022). The effect of neonicotinoids exposure on *Oreochromis niloticus* histopathological alterations and genotoxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 109(6), 1001-1009.
- El-Garawani, I.M., Khallaf, E.A., Alne-na-ei, A.A., Elgendy, R.G., Hassan, M., Sobhy, H.M., Khairallah, A., Hathout, H.M.R., Malhat, F. & Nofal, A.E. (2022). The Effect of Neonicotinoids Exposure on *Oreochromis niloticus* Histopathological Alterations and Genotoxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 109(6):1001-1009. doi: 10.1007/s00128-022-03611-6.
- Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., ... & Pérez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *Science of the total environment*, 631, 169-179.
- European Union (2000) Directive 2000/60/Ec of the Euro- pean Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off J Eur Commun* 22.12.2000) L 327/1:1–73
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews*, 85(1), 97-177.
- Evans, DH, Piermarini, PM et Choe, KP (2005). Les branchies multifonctionnelles des poissons : site dominant des échanges gazeux, de l'osmorégulation, de la régulation acido-basique et de l'excrétion des déchets azotés. *Revue physiologique* , 85 (1), 97-177.
- Ezemonye, L., & Ogbomida, T. E. (2010). Histopathological effects of Gammalin 20 on African catfish (*Clarias gariepinus*). *Applied and Environmental Soil Science*, 2010.
- Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(4), 719-731.
- [FAOSTAT, 2019](http://www.fao.org/faostat/en/#data) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database Collection of the Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Fasulo, S., Maisano, M., Sperone, E., Mauceri, A., Bernabò, I., Cappello, T., ... & Brunelli, E. (2012). Toxicity of Foroozan crude oil to ornate wrasse (*Thalassoma pavo*, Osteichthyes,

Références bibliographiques

- Labridae) : ultrastructure and cellular biomarkers. *Italian Journal of Zoology*, 79(2), 182-199.
- Fernandes, M. N., Moron, S. E., & Sakuragui, M. M. (2007). Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. *Fish respiration and environment*, 93-120.
- Ferraris, R. P., & Ahearn, G. A. (1984). Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 77(3), 397-413.
- Ferrat, L. (2010). *Bioindicateurs des variations environnementales chez les végétaux* (Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli).
- Figueira, R., Tavares, P. C., Palma, L., Beja, P., & Sérgio, C. (2009). Application of indicator kriging to the complementary use of bioindicators at three trophic levels. *Environmental Pollution*, 157(10), 2689-2696.
- Fishel, F. M. (2005). Pesticide toxicity profile : neonicotinoid pesticides. *University of Florida, IFAS*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Database Collection of the Food and Agriculture Organization of the United Nations*, <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (FAOSTAT, 2018)
- Fouzia, A., & Abdeslem, A. (2012). Environmental determinism of sex-ratio in the bleak, *Alburnus alburnus*(Linnaeus, 1758)(Cyprinidae) in Keddara dam, Algeria. *Indian Journal of Fisheries*, 59(4), 7-10.
- Fränzle, M., Herde, C., Teige, T., Ratschan, S., & Schubert, T. (2006). Efficient solving of large non-linear arithmetic constraint systems with complex boolean structure. *Journal on Satisfiability, Boolean Modeling and Computation*, 1(3-4), 209-236.
- Gacem, H., Bendali-Saoudi, F., Serradj, N., Houmani, M. & Soltani, N. (2023). Risk assessment of the neonicotinoid insecticide acetamiprid on two non-target species, *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea, Cladocera) and *Plea minutissima* Leach, 1817 (Insecta, Heteroptera). *Applied Ecology and Environmental Research*. 21(2):1143-1155.
- Gallo, A., & Tosti, E. (2020). Reproductive Processes of Marine Animals as Biomarker for Environmental Stress Impact. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*, 3283-3298.
- Gasmi, S., Chafaa, S., Lakroum, Z., Rouabhi, R., Touahria, C., Kebieche, M. & Soulimani, R. (2019). Neuronal Apoptosis and Imbalance of Neurotransmitters Induced by Acetamiprid in Rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 11 : 305-311.

- Gerdeaux, D., Anneville, O. et Hefti, D. (2006). Modifications de la pêche lors de la re-oligotrophisation dans 11 lacs périalpins suisses et français au cours des 30 dernières années. *Acta oecologica* , 30 (2), 161-167.
- Ghayyur, S., Khan, M. F., Tabassum, S., Ahmad, M. S., Sajid, M., Badshah, K., ... & Qamer, S. (2021). A comparative study on the effects of selected pesticides on hemato-biochemistry and tissue histology of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 603-611.
- Ghosh, AK, et Sarower, MG (2024). Toxicité potentielle des pesticides et de leurs produits de transformation pour les organismes aquatiques. *Études de l'Université de Khulna* , 21-32.
- Gochfeld, M. (2003). Cas d'exposition au mercure, biodisponibilité et absorption. *Écotoxicologie et sécurité environnementale* , 56 (1), 174-179.
- Gozlan, R. E., Mastorillo, S., Dauba, F., Tourenq, J. N., & Copp, G. H. (1998). Multi-scale analysis of habitat use during late summer for 0+ fishes in the River Garonne (France). *Aquatic Sciences*, 60, 99-117.
- Grattagliano, I., Portincasa, P., Palmieri, VO, & Palasciano, G. (2002). Aperçu des mécanismes de mort cellulaire hépatique induite par les médicaments. *Annals of Hepatology* , 1 (4), 162-168.
- Grift, RE, Buijse, AD, Van Densen, WLT, Machiels, MAM, Kranenbarg, J., Klein Breteler, JGP et Backx, JJGM (2003). Habitats adaptés aux poissons du groupe 0 dans les plaines inondables réhabilitées le long du cours inférieur du Rhin. *Recherche et applications fluviales* , 19 (4), 353-374.
- Guedegba, N. L., Imorou Toko, I., Agbohessi, P. T., Zoumenou, B. S., Douny, C., Mandiki, S. N., ... & Kestemont, P. (2019). Comparative acute toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) juveniles. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(7), 580-589.
- Guedegba, N. L., Toko, I. I., Ammar, I. B., François, L., Oreins, N., Palluel, O., ... & Kestemont, P. (2021). Chronic effects of a binary insecticide Acer 35 EC on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* through a multi-biomarker approach. *Chemosphere*, 273, 128530.
- Günel, A. Ç., Erkmen, B., Paçal, E., Arslan, P., Yildirim, Z., & Erkoç, F. (2020). Effets sublétaux de l'imidaclopride sur le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). *Pollution de l'eau, de l'air et du sol* , 231 , 1-10.
- Guner, U. (2013). Behavioral Changes Induced by Neonicotinoid insecticide Acetamiprid in freshwater shrimp (*Caridina nilotica*). *Anadolu Doğa Bil Derg.* 4(1):6-10.

Références bibliographiques

- Guo, W., Yang, Y., Zhou, X., Ming, R., Hu, D., & Lu, P. (2022). Insight into the toxic effects, bioconcentration and oxidative stress of acetamiprid on *Rana nigromaculata* tadpoles. *Chemosphere*, 305, 135380.
- Gupta, S., Gajbhiye, VT et Gupta, RK (2008). Dissipation dans le sol et comportement de lessivage d'un thiaméthoxame insecticide néonicotinoïde. *Bulletin de contamination de l'environnement et de toxicologie*, 80 (5), 431-437.
- Haberlehner, E. (1988). Comparative analysis of feeding and schooling behaviour of the Cyprinidae *Alburnus alburnus* (L., 1758), *Rutilus rutilus* (L., 1758), and *Scardinius erythrophthalmus* (L., 1758) in a backwater of the Danube near Vienna. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 73(5), 537-546.
- Hanafy, BG (2020). Études morphologiques des branchies du merlu européen (*Merluccius merluccius*, Linné, 1758). *Microscopy Research and Technique*, 83 (5), 531-540.
- Hano, T., Ito, K., Ito, M., Takashima, K., Takai, Y., Oshima, Y., & Ohkubo, N. (2023). Relationship closeness of tolerance to two neonicotinoids with their internal body burden in two estuarine resident marine crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 268, 109613.
- Harding, G. C., & Burbidge, C. I. (2013). Toxic chemical contaminants: State of the Gulf of Maine report.
- Haredi, A. M. M., Mourad, M., Tanekhy, M., Wassif, E., & Abdel-Tawab, H. S. (2020). Lake Edku pollutants induced biochemical and histopathological alterations in muscle tissues of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 12, 247-255.
- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207-220.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., & Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5476-5480.
- Haynes, D., Müller, J., & Carter, S. (2000). Pesticide and herbicide residues in sediments and seagrasses from the Great Barrier Reef World Heritage Area and Queensland coast. *Marine pollution bulletin*, 41(7-12), 279-287.
- Hébert, S., & Légaré, S. (2000). Suivi de la qualité de l'eau des rivières et des petits cours d'eau.

Références bibliographiques

- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in plant science*, 17(10), 569-574.
- Herzig, A. (1994). Predator-prey relationships within the pelagic community of Neusiedler See. *Nutrient Dynamics and Biological Structure in Shallow Freshwater and Brackish Lakes*, 81-96.
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W. et Kuivila, K.M. (2014). Présence généralisée d'insecticides néonicotinoïdes dans les cours d'eau d'une région à forte production de maïs et de soja, aux États-Unis. *Pollution de l'environnement*, 193, 189-196.
- Hohausová, E., Copp, G. H., & Jankovský, P. (2003). Movement of fish between a river and its backwater: diel activity and relation to environmental gradients. *Ecology of Freshwater Fish*, 12(2), 107-117.
- Hossain, Z., & Hirata, T. (2008). Molecular mechanism of intestinal permeability: interaction at tight junctions. *Molecular BioSystems*, 4(12), 1181-1185.
- Houndji, M. A., Imorou Toko, I., Guedegba, L., Yacouto, E., Agbohessi, P. T., Mandiki, S. N., ... & Kestemont, P. (2020). Joint toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(7), 669-676.
- Hu, G., Wang, H., Wan, Y., Zhou, L., Wang, Q., & Wang, M. (2022). Combined toxicities of cadmium and five agrochemicals to the larval zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*, 12(1), 16045.
- Huang, Y.W., Ye, Y.T., Cai, C.F., Wu, P., Chen, K.Q., Wu, T., Xu, D.H., Peng, K., Lin, X.X., Luo, Q.K. (2015). The study on damage of intestinal mucosa barrier structure with oxidized fish oil diets in *Ctenopharyngodon idella*. *J. Fish. China* 39 (10), 1511–1520.
- Hughes, G.M. (2023). Anatomie générale des branchies. Dans *Fish physiology* (vol. 40, pp. 9-78). Academic Press.
- Humann-Guillemot, S., de Montaigu, C. T., Sire, J., Grünig, S., Gning, O., Glauser, G., ... & Helfenstein, F. (2019). A sublethal dose of the neonicotinoid insecticide acetamiprid reduces sperm density in a songbird. *Environmental research*, 177, 108589.
- Huss, H. H. (1988). *Le Poisson frais: qualité et altérations de la qualité, manuel de formation préparé pour le Programme de perfectionnement FAO/DANIDA sur la technologie du poisson et le contrôle de qualité* (No. 29). Food & Agriculture Org..

- Hwang, PP et Lee, TH (2007). Nouvelles perspectives sur la régulation des ions chez les poissons et les cellules riches en mitochondries. *Biochimie et physiologie comparées, partie A : physiologie moléculaire et intégrative* , 148 (3), 479-497.
- Interesova, EA et Chakimov, RM (2015). Sombre Alburnus alburnus (Cyprinidae) dans la rivière Inya (sud-ouest de la Sibérie). *Journal d'ichtyologie* , 55 (2), 282-284.
- International Programme on Chemical Safety & Organisation for Economic Co-operation and Development. ((2004 IPCS risk assessment terminology. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/42908>
- Ionescu, P., Deak, G., Diacu, E. & Radu, V.M. (2016). Assessment of heavy metals levels in water, sediments and fish from Plumbuita Lake, Romania. *Revista De Chimie*. 67(11): 2148-2150.
- Jampol, L. M., & Epstein, F. H. (1970). Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase and osmotic regulation by fishes. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 218(2), 607-611.
- Javed, M., Ahmad, I., Usmani, N., & Ahmad, M. (2016). Studies on biomarkers of oxidative stress and associated genotoxicity and histopathology in *Channa punctatus* from heavy metal polluted canal. *Chemosphere*, 151, 210-219.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2897–2908 doi: 10.1021/jf101303g
- Jovanović Marić, J.M., Kolarević, M.K., Kolarević, S.M., Đorđević, J.Z., Paunović, M.M., Kostić-Vuković, J.M., Sunjog, K.Z., Smiljanić ,P.B., Gačić, Z.M. & Vuković-Gačić, B.S. (2020). Sensitivity of Bleak (*Alburnus alburnus*) in Detection of the Wastewater Related Pressure in Large Lowland Rivers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 105(2):224-229 .
- Junger, H., Kotrschal, K., & Goldschmid, A. (1989). Comparative morphology and ecomorphology of the gut in European cyprinids (Telostei). *Journal of Fish Biology*, 34(2), 315-326.
- Kaoud, H. A., & El-Dahshan, A. R. (2010). Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. *Nature and science*, 8(4), 147-156.
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na⁺, K⁺-ATPase. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 511-535.
- Kara, H. M. (2012). Freshwater fish diversity in Algeria with emphasis on alien species. *European journal of wildlife research*, 58(1), 243-253.

- Karachle, P. K., & Stergiou, K. I. (2010). Intestine morphometrics of fishes: a compilation and analysis of bibliographic data. *Acta ichthyologica et piscatoria*, 40, 45-54.
- Karkman, A., Do, T.T., Walsh, F., & Virta, M.P.J., 2018. Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in Microbiology*, 26 (3) : 220–228. Doi:10.1016/j.tim.2017.09.005
- Katagi, T. (2010). Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 1-132.
- Keith P, Allardi J (2001) Atlas des Poissons d'Eau Douce de France. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, p 387
- Kiabi, B. H., Abdoli, A., & Naderi, M. (1999). Status of the fish fauna in the South Caspian Basin of Iran. *Zoology in the Middle East*, 18(1), 57-65.
- Kiki, U. N., Mgbemena, A. S., Arimoro, F. O., & Omalu, I. C. (2020). Biomonitoring of effects and accumulations of heavy metals insults using some helminth parasites of fish as bio-indicators in an Afrotropical stream. *Frontiers in environmental science*, 8, 576080.
- Klingelfus, T., Lirola, J.R., Oya Silva, L.F., Disner, G.R., Vicentini, M., Nadaline, M.J.B., Robles, J.C.Z., Trein, L.M., Voigt, C.L., Silva de Assis, H.C., Leme, D.M., & Cestari, M.M., 2017. Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a Neotropical fish *Hoplias intermedius*. *NeuroToxicology*, 63 : 146-154.
- Kobayashi, I., Kuniyoshi, S., Saito, K., Moritomo, T., Takahashi, T., & Nakanishi, T. (2008). Long-term hematopoietic reconstitution by transplantation of kidney hematopoietic stem cells in lethally irradiated clonal ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorfii*). *Developmental & Comparative Immunology*, 32(8), 957-965.
- Kokou, F., Con, P., Barki, A., Nitzan, T., Slosman, T., Mizrahi, I., & Cnaani, A. (2019). Short-and long-term low-salinity acclimation effects on the branchial and intestinal gene expression in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 231, 11-18.
- Könen, S., & Çavaş, T. (2008). Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environmental and molecular mutagenesis*, 49(6), 434-438.
- Kotusz, J., WitKoWsKi, A., BArAn, M., & Blachuta, J. (2006). Fish migrations in a large lowland river (Odra R., Poland)-based on fish pass observations. *FOLIA ZOOLOGICA-PRAHA*, 55(4), 386.
- Kouassi, K. D., D'Almeida, M. A., Miessan, J. J., Yao, S., N'Douba, V., & Gnahoue, G. (2017). Anatomie et histologie ee l'hépatopancreas chez le male du poisson *Brachydeuterus auritus*

Références bibliographiques

- (Haemulidae, Valenciennes, 1831) En Cote D'ivoire. *European Scientific Journal, ESJ*, 13(24), 289.
- Krupke, CH, Hunt, GJ, Eitzer, BD, Andino, G., & Given, K. (2012). Multiples voies d'exposition aux pesticides pour les abeilles domestiques vivant à proximité des champs agricoles. *PLoS un*, 7 (1), e29268.
- Kumar, G., & Denslow, N. D. (2017). Gene expression profiling in fish toxicology: A review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 241, 1-38.
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J., Adeyi, O., Arnold, R., Baldé, A. B., ... & Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The lancet*, 391(10119), 462-512.
- Latli, B., Than, C., Morimoto, H., Williams, P.G. & Casida, J.E. (1996). Néonicotinoïdes [6-chloro-3-pyridylméthyl-3H] comme radioligands de haute affinité pour le récepteur nicotinique de l'acétylcholine : préparation utilisant NaB³H₄ et LiB³H₄. *Journal des composés marqués et des produits radiopharmaceutiques*. 38 (11): 971-978.
- Latorre, D., Masó, G., Cano-Barbacil, C., Zamora-Marin, J. M., Almeida, D., Vilizzi, L., ... & Ribeiro, F. (2023). A review and meta-analysis of the environmental biology of bleak *Alburnus alburnus* in its native and introduced ranges, with reflections on its invasiveness. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 33(4), 931-975.
- Latorre, D., Masó, G., Hinckley, A., Rubio-Gracia, F., Vila-Gispert, A. et Almeida, D. (2016). Plasticité inter-population dans les caractéristiques alimentaires de l'ablette envahissante *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) dans les eaux douces ibériques. *Journal d'ichtyologie appliquée*, 32 (6).
- Latorre, D., Masó, G., Hinckley, A., Verdiell-Cubedo, D., Castillo-García, G., González-Rojas, A. G., ... & Almeida, D. (2020). Interpopulation variability in dietary traits of invasive bleak *Alburnus alburnus* (Actinopterygii, Cyprinidae) across the Iberian Peninsula. *Water*, 12(8), 2200.
- Latorre, D., Masó, G., Hinckley, A., Verdiell-Cubedo, D., Tarkan, AS, Vila-Gispert, A., ... et Almeida, D. (2018). Variabilité interpopulationnelle de la croissance et de la reproduction de l'ablette envahissante *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) dans toute la péninsule ibérique. *Recherche marine et en eau douce*, 69 (8), 1326-1332.
- Leaner, J. J., & Mason, R. P. (2002). Methylmercury accumulation and fluxes across the intestine of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 132(2), 247-259.

Références bibliographiques

- Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *New England journal of medicine*, 349(5), 474-485.
- Lerebours, A., Gonzalez, P., Adam, C., Camilleri, V., Bourdineaud, J. P., & Garnier-Laplace, J. (2009). Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(6), 1271-1278.
- Li, Y., & Li, Y. (2024). Photodegradation of Neonicotinoid Insecticides Nitenpyram, Thiacloprid, and Acetamiprid in Water and Soil Environments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 113(6), 1-8.
- Li, Y., Lu, J., Song, X., Wang, Y., Li, Q., Pang, Y., & Gou, M. (2024). Conjoint transcriptomics and metabolomics analyses provide insights into the toxicity of acetamiprid to *Lethenteron reissneri* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 283, 116828.
- Lilja, J., Keskinen, T., Marjomäki, TJ, Valkeajärvi, P. et Karjalainen, J. (2003). Activité de migration vers l'amont de cyprinidés et de percidés dans un chenal, surveillée par un échosondeur horizontal à faisceau divisé. *Ressources vivantes aquatiques* , 16 (3), 185-190.
- Linden, E., Bengtsson, B. E., O. Svanberg, O. & G. Sundström, G. (1979). The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the Bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid (*Nitocra spinipes*). *Chemosphere*. 8(11-12):843–851.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.
- Łuczyńska, J., Paszczyk, B. et Łuczyński, MJ (2018). Le poisson comme bioindicateur de la pollution par les métaux lourds dans l'écosystème aquatique du lac Pluszne, en Pologne, et évaluation des risques pour la santé des consommateurs. *Écotoxicologie et sécurité environnementale* , 153 , 60-67.
- Ma, J., Zhu, J., Wang, W., Ruan, P., Rajeshkumar, S., & Li, X. (2019). Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environmental pollution*, 252, 1288-1300.
- Ma, T. Y. (1997). Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(4), 318-327.

- Ma, X., Xiong, J., Li, H., Brooks, B. W., & You, J. (2022). Long-Term Exposure to Neonicotinoid Insecticide Acetamiprid at Environmentally Relevant Concentrations Impairs Endocrine Functions in Zebrafish: Bioaccumulation, Feminization, and Transgenerational Effects. *Environmental science & technology*, 56(17), 12494–12505. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c04014>
- Macirella, R., & Brunelli, E. (2017). Morphofunctional alterations in zebrafish (*Danio rerio*) gills after exposure to mercury chloride. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 824.
- Macirella, R., Curcio, V., Ahmed, A. I. M., Pellegrino, D., & Brunelli, E. (2022). Effect of short-term exposure to low concentration of tebuconazole: Morphological, histometric and functional modifications in *Danio rerio* liver. *The European Zoological Journal*, 89(1), 331-345.
- Macirella, R., Madeo, G., Sesti, S., Tripepi, M., Bernabò, I., Godbert, N., ... & Brunelli, E. (2020). Exposure and post-exposure effects of chlorpyrifos on *Carassius auratus* gills: An ultrastructural and morphofunctional investigation. *Chemosphere*, 251, 126434.
- Maggi, F., Tang, F. H., la Cecilia, D., & McBratney, A. (2019). PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. *Scientific data*, 6(1), 1-20.
- Mahai, G., Wan, Y., Xia, W., Wang, A., Shi, L., Qian, X., ... & Xu, S. (2021). A nationwide study of occurrence and exposure assessment of neonicotinoid insecticides and their metabolites in drinking water of China. *Water Research*, 189, 116630.
- Main, AR, Michel, NL, Cavallaro, MC, Headley, JV, Peru, KM, & Morrissey, CA (2016). Transport par la fonte des neiges d'insecticides néonicotinoïdes vers les terres humides des Prairies canadiennes. *Agriculture, Ecosystèmes & Environnement*, 215, 76-84.
- Majumder, R., & Kaviraj, A. (2022). Histopathological alterations of gills, liver and kidney of freshwater fish, *Oreochromis niloticus*, exposed to cypermethrin. *Journal of Aquatic Biology & Fisheries*, 10(1), 1-5.
- Mann, R. H. K. (1996). Environmental requirements of European non-salmonid fish in rivers. *Hydrobiologia*, 323(3), 223-235.
- Marcon, L., Bazzoli, N., Honor Munteer, A., & Anjos Benjamin, L. D. (2015). Histological and histometric evaluation of the liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae), exposed to different concentrations of an organochlorine insecticide. *The Anatomical Record*, 298(10), 1754-1764.

- Martelo J, da Costa LM, Ribeiro D, Gago J, Magalhães MF, Gante HF, Alves MJ, Cheoo G, Gkenas C, Banha F, Gama M, Anastácio PM, Tiago PM, Ribeiro F (2021) Evaluating the range expansion of recreational non- native fishes in Portuguese freshwaters using scientific and citizen science data. *BioInv Rec* 10(2):378–389 10.
- Martínez-Morcillo, S., Rodríguez-Gill, J.L., Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Mozaz, S., Míguez-Santiyán, M.P., Valdes, M.E., Barceló, D., & Valcárcel, Y., 2020. Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for human health: Results from a case study in North- Western Spain. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223 :10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.011>
- Masó, G., Latorre, D., Tarkan, A. S., Vila-Gispert, A., & Almeida, D. (2016). Inter-population plasticity in growth and reproduction of invasive bleak, *Alburnus alburnus* (Cyprinidae, Actinopterygii), in northeastern Iberian Peninsula. *Folia Zoologica*, 65(1), 10-14.
- McClure, C.M., Smalling, K.L., Blazer, V.S., Sperry, A.J., Schall, M.K., Kolpin, D.W., Phillips, P.J., Hladik, M.L., & Wagner, T., 2020. Spatiotemporal variation in occurrence and co-occurrence of pesticides, hormones, and other organic contaminants in rivers in the Chesapeake Bay Watershed, United States. *Science of the Total Environment*, 728:138765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138765>
- Mehner, T., Diekmann, M., Brämick, U. et Lemcke, R. (2005). Composition des communautés de poissons dans les lacs allemands en relation avec la morphologie du lac, l'état trophique, la structure des rives et l'intensité de l'utilisation humaine. *Biologie de l'eau douce* , 50 (1), 70-85.
- Miller, L. C., & Tainter, M. (1944). Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 261-264.
- Mishchuk, O. V., & Stoliar, O. B. (2008). The effect of pesticide acetamiprid on biochemical markers in tissues of fresh water bivalve mussels *Anodonta cygnea* L.(Unionidae). *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal (1999)*, 80(5), 117-124.
- Mohammad Mostakim, G., Zahangir, M. M., Monir Mishu, M., Rahman, M. K., & Islam, M. S. (2015). Alteration of blood parameters and histoarchitecture of liver and kidney of silver barb after chronic exposure to quinalphos. *Journal of toxicology*, 2015(1), 415984.
- Monteiro, DA, De Almeida, JA, Rantin, FT, & Kalinin, AL (2006). Biomarqueurs du stress oxydatif chez le poisson characidé d'eau douce, *Brycon cephalus*, exposé à l'insecticide

- organophosphoré Folisuper 600 (méthyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143 (2), 141-149.
- Moraes, F. D., Venturini, F. P., Rossi, P. A., Avilez, I. M., da Silva de Souza, N. E., & Moraes, G. (2018). Assessment of biomarkers in the neotropical fish *Brycon amazonicus* exposed to cypermethrin-based insecticide. *Ecotoxicology*, 27, 188-197.
- Morrissey, CA, Mineau, P., Devries, JH, Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, MC et Liber, K. (2015). Contamination par les néonicotinoïdes des eaux de surface mondiales et risque associé pour les invertébrés aquatiques : un examen. *Environnement international*, 74, 291-303.
- Moussaoui, Y., Tuduri, L., Kerchich, Y., Meklati, B., & Eppe, G. (2012). Atmospheric concentrations of PCDD/Fs, dl-PCBs and some pesticides in northern Algeria using passive air sampling. *Chemosphere*. 88, 270–277.
- Mutshekwa, T., Mugwedi, L., Moyo, B., Madala, N.E., Wasserman, R.J., Dondofema, F. & Dalu, T. (2023). Assessing acetamiprid and chlorpyrifos pesticide concentrations in water and sediments across macadamia orchard and communal area small reservoirs. *Chemistry and Ecology*. 39(4):1-11. <https://doi.org/10.1080/02757540.2023.2199015>
- Navodaru, I., Buijse, A. D., & Staras, M. (2002). Effects of hydrology and water quality on the fish community in danube delta lakes. *International review of hydrobiology*, 87(2-3), 329-348.
- Newbold, T., Hudson, L. N., Hill, S. L., Contu, S., Lysenko, I., Senior, R. A., ... & Purvis, A. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520(7545), 45-50.
- Nocita, A. (2007). La fauna ittica del bacino dell'Arno. *Biologia Ambientale*, 21(2), 97-105.
- Nuyttens, D., Devarrewaere, W., Verboven, P., & Foqué, D. (2013). Émission et dérive de poussières chargées de pesticides à partir de semences traitées pendant le semis : une revue. *Science de la lutte antiparasitaire*, 69 (5), 564-575.
- OCDE (2019), *Essai n° 203 : Poisson, essai de toxicité aiguë*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 2, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069978-fr>
- Okumah, M., Chapman, P., Martin-Ortega, J., & Novo, P., 2019. Mitigating agricultural diffuse pollution: uncovering the evidence base of the awareness–behaviour–water quality pathway. *Water*, 11 (1) : 29. DOI: 10.3390/w11010029
- OMS, FAO (2018). Code de conduite international sur la gestion des pesticides. Rome : OMS, FAO, 2018. <http://www.fao.org/3/I5566FR/i5566fr.pdf>

Références bibliographiques

- Osterberg, J., Darnell K.M., Blickley, T. M. & Romano J.A. (2012). Acute toxicity and sub-lethal effects of common pesticides in post-larval and juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, s 424–425:5-14.
- Özcan Oruç, E., & Üner, N. (2002). Marker enzyme assesment in the liver of cyprinus carpio (L.) exposed to 2, 4-D and azinphosmethyl. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(4), 182-188.
- Özdemir, E., & Bayır, M. (2023). Clonage moléculaire et caractérisation du gène de la superoxyde dismutase Cu-Zn (sod1) chez la truite brune et son expression en réponse aux facteurs de stress aigus de l'aquaculture. *Animal Biotechnology* , 34 (6), 1968-1978.
- Pagano, AD, Gonçalves, NM, Domingues, WB, da Silveira, TLR, Kütter, MT, Junior, ASV, ... & Campos, VF (2024). Évaluation des biomarqueurs du stress oxydatif chez le poisson killifish annuel menacé, *Austrolebias charrua*, exposé au Roundup. *Biochimie et physiologie comparées Partie C : Toxicologie et pharmacologie*, 276, 109787.
- Pagliarani, A., Ventrella, V., Trombetti, F., Trigari, G., & Borgatti, A. R. (1988). (Na⁺⁺ K⁺)-and Na⁺-stimulated Mg²⁺-dependent ATPase activities in kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 90(1), 41-52.
- Pandey, S., Parvez, S., Ansari, R. A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., ... & Raisuddin, S. (2008). Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch (Effets de l'exposition à de multiples métaux traces sur les caractéristiques biochimiques, histologiques et ultrastructurales des branchies d'un poisson d'eau douce). *Chemico-biological interactions*, 174(3), 183-192
- Parvez, S., Sayeed, I., & Raisuddin, S. (2006). Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicology and environmental safety*, 65(1), 62-66.
- PEHLIVANOV, L., STEFANOV, T., MIHOV, S., BISERKOV, V., VASSILEV, M., APOSTOLOU, A., & VELKOV, B. (2011). Recent ichthyofauna in the wetlands along the Bulgarian section of the Danube. *Sc. Annals of DDI*, 17, 83-88.
- Penczak, T., Galicka, W., Głowacki, Ł., Koszaliński, H., Kruk, A., Zięba, G., ... & Marszał, L. (2004). Fish assemblage changes relative to environmental factors and time in the Warta River, Poland, and its oxbow lakes. *Journal of Fish Biology*, 64(2), 483-501.
- Pérez-Bote, J.L., Roso, R., Pula, H.J., Díaz, F. & López, M.T. (2004). Primeras citas de la lucioperca, Sander (= Stizostedion) lucioperca (Linnaeus, 1758) y del alburno, *Alburnus*

- alburnus* (Linnaeus,1758) en las cuencas extremeñas de los ríos Tajo y Guadiana, SO de la Península Ibérica. *Anales de Biología*. 26: 93-100.
- Perry, SF (1997). La cellule chlorure : structure et fonction dans les branchies des poissons d'eau douce. *Revue annuelle de physiologie*, 59 (1), 325-347.
- Pfeiler, E., & Kirschner, L. B. (1972). Studies on gill ATPase of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 282, 301-310.
- Pistorius, J., Bischoff, G., Heimbach, U., & Stähler, M. (2010). Incidents d'intoxication des abeilles en Allemagne au printemps 2008 causés par l'abrasion de la substance active des semences traitées lors du semis de maïs. *Julius-Kühn-Archiv* , (423), 118.
- Politou, C. Y., Economidis, P. S., & Sinis, A. I. (1993). Feeding biology of bleak, *Alburnus alburnus*, in Lake Koronia, northern Greece. *Journal of fish biology*, 43(1), 33-43.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution*, 25(6), 345-353.
- Prysiashniuk, N., Grynevych, N., Slobodeniuk, O., Kuzmenko, O., Tarasenko, L., Bevz, O., ... & Magrelo, N. (2019). Monitoring of morphological parameters of Cyprinidae liver. *Ukrainian Journal of Ecology*, 9(3), 162-167.
- Qadri, H., & Bhat, R.A., 2020. The Concerns for Global Sustainability of Freshwater Ecosystems. The Concerns for Global Sustainability of Freshwater Ecosystems, 1- 13. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2_1
- Rahmoune, H., Mimeche, F., Guimeur, K., & Cherif, K. (2020). Utilisation des pesticides et perception des risques chez les agriculteurs de la région de Biskra (Sud Est d'Algérie). *International Journal of Environmental Studies*.
- Raj, J. & Joseph, B. (2015). Impact of Acetamiprid Toxicity on Lactate Dehydrogenase in Some Tissues of the Fish *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Zoological Research*. 11(3):112-115.
- Randhawa, M. A. (2009). Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 21(3), 184-185.
- Rask, M. (2000). *Enquête sur l'état des poissons des lacs nordiques : composition des espèces, répartition, effets des changements environnementaux* . Conseil nordique des ministres.
- Relyea, R. A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological applications*, 15(2), 618-627.

- Revitalisierung, R. (2002). Temperaturpräferenzen und-limiten von Fischarten Schweizerischer Fließgewässer.
- Říha, M., Hladík, M., Mrkvička, T., Prchalová, M., Čech, M., Draštík, V., ... & Kubečka, J. (2013). Post-spawning dispersal of tributary spawning fish species to a reservoir system. *Folia Zoologica*, 62(1), 1-13.
- Ringø, E., Olsen, RE, Mayhew, TM, et Myklebust, R. (2003). Microscopie électronique de la microflore intestinale des poissons. *Aquaculture* , 227 (1-4), 395-415.
- Rocha, E., Monteiro, R. A., & Pereira, C. A. (1994). The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. *Journal of Anatomy*, 185(Pt 2), 241.
- Rohani, M. F. (2023). Pesticides toxicity in fish : Histopathological and hemato-biochemical aspects—A review. *Emerging Contaminants*, 100234.
- Rohonczy, J.L.M., Koprivnikar, J., Waltho, N., & Robinson, S.A., 2020. The Effects of the Commercially Formulated Neonicotinoids Imidacloprid and Thiamethoxam on the Survival of Infectious Stages of Two Trematode Parasites. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231 (3) : 125. Doi:10.1007/s11270-020-04510-4
- Rosell, G., Quero, C., Coll J. & Guerrero, A. (2008). Biorational insecticides in pest management. *Journal of Pesticide Science*. 33(2):103-21. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R08-01>
- Roux, A. L., & Copp, G. H. (1996). Fish populations in rivers. In *The Fluvial Hydrosystems* (pp. 167-183). Dordrecht: Springer Netherlands
- Saadi, L., Bouazza, M. & Lebaili, N. (2019). Acetamipride induced histopathological alteration in lung and liver of male mice. *Revue Agrobiologia*. 9(2): 1499-1505.
- Sabrina, L., Lidia, C., Loreto, S., Marina, M. & Estarlich (2012) Prenatal and postnatal residential usage of insecticides in a multicenter birth cohort in Spain. *Science of the Total Environment*. 273: 445-446.
- Saha, R., & Dutta, S. M. (2024). Pesticides' mode of action on aquatic life. *Toxicology reports*, 13, 101780. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2024.101780>
- Sánchez-Bayo, F., & Hyne, RV (2014). Détection et analyse des néonicotinoïdes dans les eaux fluviales - développement d'un échantillonneur passif pour trois insecticides couramment utilisés. *Chimiosphère* , 99 , 143-151.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment international*. 2016;89–90:7–11.

- Santos, J. M., Ferreira, M. T., Godinho, F. N., & Bochechas, J. (2002). Performance of fish lift recently built at the Touvedo Dam on the Lima River, Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(2), 118-123.
- Scharbert, A., & Borchering, J. (2013). Relationships of hydrology and life-history strategies on the spatio-temporal habitat utilisation of fish in European temperate river floodplains. *Ecological indicators*, 29, 348-360.
- Schiemer, F. (1985). Die Bedeutung von Auegewässern als Schutzzonen für die Fischfauna. *Österreichische Wasserwirtschaft*, 37(9-10), 239-245.
- Serrano, R., Hernandez, F., Pena, JB, Dosda, V., & Canales, J. (1995). Toxicité et bioconcentration de pesticides organophosphorés sélectionnés chez *Mytilus galloprovincialis* et *Venus gallina*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 284-290.
- Shao, S., Hu, Y., Cheng, J., & Chen, Y., 2018. Research progress on distribution, migration, transformation of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38 : 1-14. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471038>
- Sharma, P., Chadha, P., & Saini, H. S. (2019). Tetrabromobisphenol A induced oxidative stress and genotoxicity in fish *Channa punctatus*. *Drug and chemical toxicology*, 42(6), 559-564.
- Sharma, R., & Jindal, R. (2020). Assessment of cypermethrin induced hepatic toxicity in *Catla catla*: A multiple biomarker approach. *Environmental Research*, 184, 109359.
- Sheets, LP (2010). Imidaclopride : un insecticide néonicotinoïde. Dans *le manuel de toxicologie des pesticides de Hayes* (pp. 2055-2064). Academic Press.
- Shi, Q., Xiong, X., Wen, Z., Qin, C., Li, R., Zhang, Z., ... & Wu, X. (2022). Cu/Zn superoxyde dismutase et catalase de l'esturgeon du Yangtze, *Acipenser dabryanus* : clonage moléculaire, distribution tissulaire et réponse au jeûne et à la réalimentation. *Poissons*, 7 (1), 35.
- Shiloh, Y., & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(4), 197-210.
- Siddiqui, M. S., & Wanule, D. D. (2010). Acetamiprid induced changes in Total leucocytes and erythrocytes count in a Freshwater Fish, *Channa Punctatus* (Bloch). *Int. Quart. J. Life. Sci*, 5, 163-164.
- Silva, V., Mol, H. G., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils—A hidden reality unfolded. *Science of the Total Environment*, 653, 1532-1545.

- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., & Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology*, 170 : 31-41. Doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.012
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, G., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, DP., 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., H. 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. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(1):5-34
- Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et biophysica acta*, 23, 394-401.
- Šmejkal, M., Baran, R., Blabolil, P., Vejřík, L., Prchalová, M., Bartoň, D., ... & Kubečka, J. (2017). Early life-history predator-prey reversal in two cyprinid fishes. *Scientific reports*, 7(1), 6924.
- Soltani, N. & Morsli, S. M. (2003). Quantification du DimilinR par chromatographie liquide haute performance: étude de la dégradation dans l'eau de mer. *Journal de Recherche en Océanographie*. 28(1/2): 118-120.
- Sori, A. J., Rush Jr, B. F., Lysz, T. W., Smith, S., & Machiedo, G. W. (1988). The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *The American journal of surgery*, 155(2), 187-192.
- Soudani, N., Belhamra, M., Ugya, A.Y., Patel, N., Carretta, L., Cardinali, A., Toumi, T. (2020). Environmental risk assessment of pesticide use in Algerian agriculture. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 8(05): 36-47.
- Sousa-Santos, C., Matono, P., Janine Da Silva, J. & Ilhéu, M. (2018). Evaluation of potential hybridization between native Fishes and the invasive bleak, *Alburnus alburnus* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 48(2):109-122. DOI: 10.3750/AIEP/02395.
- Staline, A., Suganthi, P., Mathivani, S., Paray, BA, Al-Sadoon, MK, Gokula, V. et Musthafa, MS (2019). Impact du chlorpyrifos sur le comportement et les indices histopathologiques dans différents tissus du poisson d'eau douce *Channa punctatus* (Bloch). *Recherche sur les sciences de l'environnement et la pollution* , 26 , 17623-17631.

Références bibliographiques

- Stefanov T (2007) Fauna and distribution of fishes in Bulgaria. In: Fet V, Popov A. (Eds) *Biogeography and ecology of Bulgaria*. Monographiae Biologicae, Vol. 82. Springer,
- Storelli, C. A. R. L. O., Vilella, S. E. B. A. S. T. I. A. N., & Cassano, G. (1986). Na-dependent D-glucose and L-alanine transport in eel intestinal brush border membrane vesicles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 251(3), R463-R469.
- Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Sverko, E., McGoldrick, D., & Marvin, CH (2017). Facteurs influençant la présence et la distribution des insecticides néonicotinoïdes dans les eaux de surface du sud de l'Ontario, Canada. *Chemosphere* , 169 , 516-523.
- Su, G., Logez, M., Xu, J., Tao, S., Villéger, S., & Brosse, S. (2021). Impacts humains sur la biodiversité mondiale des poissons d'eau douce. *Sciences* , 371 (6531), 835-838.
- Suhail, M. (2010). Na⁺, K⁺-ATPase : ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions. *Journal of clinical medicine research*, 2(1), 1.
- Tandjir, L. & Djebbar, A. (2010). L'ichtyofaune de l'oued Kebir (Oum Toub, Skikda, Algérie. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies* : 51-58.
- Tang, F. H., Jeffries, T. C., Vervoort, R. W., Conoley, C., Coleman, N. V., & Maggi, F. (2019). Microcosm experiments and kinetic modeling of glyphosate biodegradation in soils and sediments. *Science of the Total Environment*, 658, 105-115.
- Taylor, M. K., & Cooke, S. J. (2012). Meta-analyses of the effects of river flow on fish movement and activity. *Environmental Reviews*, 20(4), 211-219.
- Thany, S.H., Reynier, P. & Lenaers, G. (2013). Neurotoxicity of pesticides: Its relationship with neurodegenerative diseases. *Medecine sciences*. 29(3):273-8. DOI:10.1051/medsci/2013293013.
- Thomson, AJ, Sargent, JR et Owen, JM (1977). Influence de la température d'acclimatation et de la salinité sur la composition de l'adénosine triphosphatase et des acides gras dépendantes de (Na⁺⁺ K⁺) dans les branchies de l'anguille (*Anguilla anguilla*). *Biochimie comparée et physiologie, partie B : Biochimie comparée* , 56 (3), 223-228.
- Tian, X., Hong, X., Yan, S., Li, X., Wu, H., Lin, A., & Yang, A., 2020. Neonicotinoids caused oxidative stress and DNA damage in juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 197 : 110566. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110566>

- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., & Trebše, P. (2009). Identification des dangers de l'imidaclopride pour l'environnement aquatique. *Chimiosphère*, 76 (7), 907-914.
- Tomizawa, M. & Casida, J.E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*. 48 (1), 339-364.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45: 247-268.
- Trigari, G., Borgatti, AR, Pagliarani, A. et Ventrella, V. (1985). Caractérisation de la branche (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase chez le bar (*Dicentrarchus labrax* L.). *Biochimie comparée et physiologie, partie B : Biochimie comparée*, 80 (1), 23-33.
- Vajargah, M. F., Namin, J. I., Mohsenpour, R., Yalsuyi, A. M., Prokić, M. D., & Faggio, C. (2021). Histological effects of sublethal concentrations of insecticide Lindane on intestinal tissue of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Veterinary Research Communications*, 45, 373-380.
- Varsamos, S., Diaz, J. P., Charmantier, G. U. Y., Flik, G., Blasco, C., & Connes, R. (2002). Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to fresh water, seawater, and doubly concentrated seawater. *Journal of Experimental Zoology*, 293(1), 12-26.
- Vasek, M., & Kubecka, J. (2004). In situ diel patterns of zooplankton consumption by subadult/adult roach *Rutilus rutilus*, bream *Abramis brama*, and bleak *Alburnus alburnus*. *FOLIA ZOOLOGICA-PRAHA*-, 53(2), 203-214.
- 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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 257: 109336.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E. I., & Unlu, E. (2009). Histopathological changes in the gill and liver tissues of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* exposed to dichlorvos. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 1291-1296.
- Ventrella, V., Trombetti, F., Pagliarani, A., Trigari, G., Pirini, M., & Borgatti, A. R. (1992). Salinity dependence of the ouabain-insensitive Mg²⁺-dependent Na⁺-ATPase in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) adapted to fresh and brackish water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 101(1-2), 1-7.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome

Références bibliographiques

- in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(3), 281-300.
- Vinni, M., Horppila, J., Olin, M., Ruuhijärvi, J., & Nyberg, K. (2000). The food, growth and abundance of five co-existing cyprinids in lake basins of different morphometry and water quality. *Aquatic Ecology*, 34, 421-431.
- Vinyoles, D., Robalo, JI, Sostoa, AD, Almodóvar, AM, Elvira, B., Nicola, GG, ... et Almada, VC (2007). Propagation de l'ablette exotique *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) (Actinopterygii cyprinidae) dans la péninsule ibérique : le rôle des réservoirs. *Graellsia*, 101-110.
- Vodiasova, E. A., Meger, Y. V., & Lantushenko, A. O. (2021). Identification and characterization of the novel genes encoding glutathione S-transferases in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 40, 100926.
- Vøllestad, L. A. (1985). Resource partitioning of roach *Rutilus rutilus* and bleak *Alburnus alburnus* in two eutrophic lakes in SE Norway. *Ecography*, 8(2), 88-92.
- Wallace, D.R. (2005). Encyclopedia of Toxicology. Second Edition. Elsevier, p:23-25.
- Wallet, F. (2020). Pesticides / Biocides. *Environnement, Risques & Santé*, 19, 147-148. <https://www.cairn.info/revue--2020-2-page-147.htm>.
- Wang, B., Feng, L., Jiang, WD, Wu, P., Kuang, SY, Jiang, J., ... & Zhou, XQ (2015). Modifications de l'expression de l'ARNm des jonctions serrées induites par le cuivre, apoptose et réponses antioxydantes via les molécules de signalisation NF-κB, TOR et Nrf2 dans les branchies des poissons : rôle préventif de l'arginine. *Toxicologie aquatique*, 158, 125-137.
- Wang, G., Xiong, D., Wu, M., Wang, L., & Yang, J. (2020). Induction d'un stress oxydatif dépendant du temps et de la dose du triazophos dans le cerveau et le foie chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 228, 108640.
- Wang, Y., Li, Q., Yun, X., Zhou, J., & Wang, J. (2022). A review on the ecotoxicological effects of heavy metals on aquatic organisms. *J. Earth Sci. Environ. Stud*, 6(2), 148-161.
- Wei, F., Wang, D., Li, H., Xia, P., Ran, Y., & You, J., 2020. Toxicogenomics provides insights to toxicity pathways of neonicotinoids to aquatic insect, *Chironomus dilutus*. *Environmental Pollution*, 260 :114011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114011>
- Welcomme RL (1988) *International introductions of inland aquatic species*. FAO Fisheries Technical Paper 294, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 318.

Références bibliographiques

- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Wentzel, A. S., Janssen, J. J., De Boer, V. C., Van Veen, W. G., Forlenza, M., & Wiegertjes, G. F. (2020). Fish macrophages show distinct metabolic signatures upon polarization. *Frontiers in immunology*, 11, 152.
- Wheeler, A. (1977). L'origine et la répartition des poissons d'eau douce des îles britanniques. *Journal de biogéographie*, 1-24.
- Williams, WP (1965). La densité de population de quatre espèces de poissons d'eau douce, le gardon (*Rutilus rutilus* (L.)), l'ablette (*Alburnus alburnus* (L.)), le naseux (*Leuciscus leuciscus* (L.)) et la perche (*Perca fluviatilis* L.) dans la rivière Tamise à Reading. *Le Journal de l'écologie animale*, 173-185.
- Wolter, C., & Bischoff, A. (2001). Seasonal changes of fish diversity in the main channel of the large lowland River Oder. *Regulated Rivers: Research & Management: An International Journal Devoted to River Research and Management*, 17(4-5), 595-608.
- Wong, M. K. S., Pipil, S., Ozaki, H., Suzuki, Y., Iwasaki, W., & Takei, Y. (2016). Flexible selection of diversified Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms for osmoregulation in teleosts. *Zoological letters*, 2(1), 1-22.
- Wood, TJ et Goulson, D. (2017). Les risques environnementaux des pesticides néonicotinoïdes : un examen des preuves après 2013. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (21), 17285-17325.
- Wu, H. C., Chen, P. C., & Tsay, T. T. (2010). Assessment of nematode community structure as a bioindicator in river monitoring. *Environmental pollution*, 158(5), 1741-1747.
- Xu, N., Chen, P., Liu, L., Zeng, Y., Zhou, H. & Li, S. (2014). Effects of combined exposure to 17 α -ethynylestradiol and dibutyl phthalate on the growth and reproduction of adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 107: 61-70.
- Xu, R., Pan, L., Zhou, Y., Gao, Z., Miao, J., Yang, Y., & Li, D. (2022). Reproductive toxicity induced by benzo [a] pyrene exposure: first exploration highlighting the multi-stage molecular mechanism in female scallop *Chlamys farreri*. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(32), 48675-48693.
- Yamamoto, I., & Casida, J.E., (Eds.), 1999. Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor. Edition illustrée, Springer Science & Business Media, 2012, 300p. https://books.google.dz/books?id=HnL8CAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=fr&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- Yang, J., Harino, H., Liu, H., & Miyazaki, N. (2008). Monitoring the organotin contamination in the Taihu Lake of China by bivalve mussel *Anodonta woodiana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 164-168.
- Yoshikawa, J. S., McCormick, S. D., Young, G., & Bern, H. A. (1993). Effects of salinity on chloride cells and Na⁺ K⁺-ATPase activity in the teleost *Gillichthys mirabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105(2), 311-317.
- Yuan, X., Jiang, G., Cheng, H., Cao, X., Shi, H. et Liu, W. (2019). Une évaluation du remplacement de la farine de poisson par un hydrolysât de protéines de farine de graines de coton dans l'alimentation des daurades juvéniles à museau arrondi (*Megalobrama amblycephala*) : croissance, antioxydant, immunité innée et résistance aux maladies. *Nutrition aquacole*, 25 (6), 1334-1344.
- Zaidi, N. & Soltani, N. (2013). Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. *Advances in Environmental Biology*. 7(4): 605-613.
- Zaidi, N., Farine, J. P. & Soltani, N. (2013). Experimental study on diflubenzuron: degradation in freshwater and bioconcentration in mosquitofish following chronic exposure. *Journal of Environmental Protection*. 4(2): 188-194.
- Zhang, C., Wang, J., Zhang, S., Zhu, L., Du, Z., & Wang, J., 2017. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 188 : 510–516. Doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.025
- Zhu, H., Zhang, X., Li, C., Li, X., & Wu, J. (2024). Photochemical Degradation of the New Nicotine Pesticide Acetamiprid in Water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 112(4), 62.
- Zogaris, S., Chatzinikolaou, Y., Koutsikos, N., Economou, AN, Oikonomou, E., Michaelides, G., ... et Ferreira, MT (2012). Assemblages de poissons d'eau douce à Chypre avec un accent sur les effets des barrages. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 42 (3), 165-175.
- Zoumenou, B.G.Y.M., Aïna, M.P, Toko, I.I., Igout, A., Douny, C., Brose F., Schiffers B., Gouda, I., Sika, K.C., Kestemont, P. & Scippo, M.L. (2019). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 102:7-12. doi.org/10.1007/s00128-018-2476-4

Valorisation scientifique

Valorisation scientifique

• Publication catégorié A (01):

- **Agaguena, R.**, Zaidi, N., Brunelli, E., Hamdani, A., & Macirella, R. (2025). Sub-lethal effects of acetamiprid on the gills of the bleak *Alburnus alburnus*: histopathological and molecular alterations. *The European Zoological Journal*, 92(1), 61–73. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2434122>

• Communication internationale (4)

- **AGAGUENA Rania** , ZAIDI Nedjoudia . Impact d'un produit agricole sur les organismes non visés , cas d'un poisson d'eau douce bioindicateur de pollution : *Alburnus alburnus* (Linnaeus 1758).*The international seminar on Bioresources and Sustainable Development (BDD 2023)* .Bouira (Algerie), Mai 3-4 2023.(communication orale)
- **AGAGUENA Rania** , ZAIDI Nedjoudia ,2023 .Experimental in vitro Contamination of Commestible Fish by an Antiparasitic Product. *4th international conference on food, agriculture and animal sciences*. Sivas (Turquie), 27- 29 Avril 2023.(communication orale)
- **AGAGUENA Rania** , ZAIDI Nedjoudia ,2023 . Growth and nutrient levels of a freshwater fish treated with neonicotinoid pesticide added to the rearing water. *1st Virtual International Seminar on geosciences*, Constantine (Algérie), 7-9 Mars 2023.(communication orale)
- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudia ,2023 . Evaluation of the sensitivity of a cyprinid fish to an agricultural pesticide . *The 1st international conference: Trends & methods in analytical chemistry* , Bechar (Algérie), 06-08 Mars 2023.(communication orale)

• Communication nationale (06):

- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudia ,2023 . Evaluation of the side effects of a neonicotinoid insecticide on the lipidocarbohydrate and protein metabolism of juvenile fresh water fish .*National seminar on phytotherapy and pharmacognosy* , Sétif (Algérie) 14/15Mars 2023. (Communication orale)
- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudia ,2023 . Etude de la variation des taux de glucides, lipides et protéines au niveau de l'hépatopancréas des alevins des

poissons d'eau douce contaminés par un insecticide néonicotinoïde. *Séminaire national de toxicologie et phyto-aromatiques*, Ghilizan (Algérie), 21 février 2023 (communication orale)

- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudja ,2023 .Évaluation de la composition biochimique des hépatopancées d'alevins de poissons d'eau douce traités à l'insecticide néonicotinoïde . *The 2nd National Wetlands day : towards wetlands restoration* ,OUARGLA (Algérie),1 Février 2023.(communication orale)
- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudja ,2022. Contrôle de l'état de santé des alevins de poissons d'eau douce traités par un insecticide néonicotinoïde additionné à l'eau d'élevage ,*1^{er} séminaire national sur l'agropastoralisme (SNAP - 1)*,Djelfa (Algérie),26 décembre 2022 .(communication affichée)
- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudja ,2022. Etude des effets secondaires du traitement des alevins de poissons d'eau douce par un pesticide néonicotinoïde sur quelques paramètres biométriques, physiologiques et biochimiques. *La Journée Scientifique en écologie et durabilité environnementale des écosystèmes terrestres* ,Blida (Algérie),14 décembre 2022.(communication orale)
- **AGAGUENA Rania** ,TALBI Faiza et ZAIDI Nedjoudja ,2022. Etude de l'influence d'un insecticide néonicotinoïde sur les indices biométriques et physiologiques des alevins de poissons d'eau douce. *Journée scientifique sur l'agriculture durable et la sécurité alimentaire* , Mila (Algérie)5 décembre 2022 (communication affichée)

Tâche pédagogique

- Chargé travaux pratiques de :
- Biologie cellulaire 1^{er} année SNV.
- Biologie végétale 1^{er} année SNV.

Annexe



The European Zoological Journal



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/tizo21

Sub-lethal effects of acetamiprid on the gills of the bleak *Alburnus alburnus*: histopathological and molecular alterations

R. Agaguena, N. Zaidi, E. Brunelli, A. Hamdani & R. Macirella

To cite this article: R. Agaguena, N. Zaidi, E. Brunelli, A. Hamdani & R. Macirella (2025) Sub-lethal effects of acetamiprid on the gills of the bleak *Alburnus alburnus*: histopathological and molecular alterations, *The European Zoological Journal*, 92:1, 61-73, DOI: [10.1080/24750263.2024.2434122](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2434122)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2434122>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 08 Jan 2025.



[Submit your article to this journal](#)



Article views: 56



[View related articles](#)



[View Crossmark data](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tizo21>

Sub-lethal effects of acetamiprid on the gills of the bleak *Alburnus alburnus*: histopathological and molecular alterations

R. AGAGUENA^{1,2*}, N. ZAIDI¹, E. BRUNELLI^{3*}, A. HAMDANI⁴, & R. MACIRELLA³

¹Laboratory of the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Areas, Faculty of Sciences, University of Skikda, Skikda, Algeria, ²Laboratory of Interactions, Biodiversity, Ecosystems and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Skikda, Skikda, Algeria, ³Department of Biology, Ecology and Earth Science (DiBEST) - University of Calabria, Rende, Cosenza, Italy, and ⁴Laboratory of Applied Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar of Annaba, Annaba, Algeria

(Received 21 June 2024; accepted 30 October 2024)

Abstract

The widespread and uncontrolled application of neonicotinoid pesticides represents a major threat to freshwater ecosystems, especially those near agricultural lands and farms. Here, we determined for the first time the mean lethal concentration (LC50–96 h) of acetamiprid on bleak *Alburnus alburnus* juveniles and investigated the effect on gills of two environmentally relevant concentrations after short-term exposure (96 h). After defining the LC50 value (34.546 mg/L), we evaluated the effects of two low concentrations (150 and 300 µg/L) through a histological examination and molecular evaluation of Na⁺/K⁺-ATPase expression in gills. No morphological alterations were observed in the control group. Severe structural modifications were observed in samples exposed to both tested concentrations, including hyperplasia and hypertrophy of chloride cells, epithelial detachment and aneurysm formation, which are recognised as a common and early response of freshwater gills to chemical insults. Exposure to the highest tested concentration induced more severe damage, with the appearance of necrotic pavement cells and degeneration of pillar cells. Na⁺/K⁺-ATPase downregulation was observed following the exposure to both tested concentrations. Our results highlight the importance of expanding the panel of ecotoxicological tests required to approve agrochemical compounds and using different diagnostic tools for an in-depth examination of xenobiotic toxicity.

Keywords: Gills, pesticides, LC50, histopathology, Na⁺/K⁺-ATPase

Introduction

Pesticides are a broad group of chemicals widely employed in modern agriculture to protect crops and increase production (Ahmed et al. 2023). Food production systems still rely on chemical pesticides, as indicated by the continuous growth in the selling rate of these compounds worldwide (Tudi et al. 2021). However, their widespread and uncontrolled application causes serious threats to the environment and human health (Rosell et al. 2008; Thany et al. 2013;

Crenna et al. 2017; Soudani et al. 2020). Due to leaching, adsorption, volatilisation and runoff, pesticides can move from the application site to the surrounding area (Lau et al. 2023). They therefore reach all environmental compartments, including aquatic ecosystems, and are widely recognised as a major threat to freshwater communities (Ghayyur et al. 2021).

Over the years, numerous studies have been carried out to determine the fate of these compounds in the aquatic environment (Zaidi et al. 2013;

*Correspondence: R. Agaguena, Laboratory of the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Areas, Faculty of Sciences, University of Skikda, Skikda, 21000, Algeria. Email: r.agaguena@univ-skikda.dz

*E. Brunelli, Department of Biology, Ecology and Earth Science (DiBEST) - University of Calabria, Via P. Bucci, Rende, Cosenza, 87036, Italy. Email: elvira.brunelli@unical.it

El Badaoui et al. 2015) and to evaluate their toxicity against non-target organisms (Osterberg et al. 2012; Zaidi & Soltani 2013; Sánchez-Bayo et al. 2016; Belhabib et al. 2023); however, comprehending and foreseeing the impacts of pesticides is challenging.

Neonicotinoids belong to a new class of insecticides developed in the 1980s to replace toxic and persistent products such as organophosphates and carbamates (Simon-Delso et al. 2015; Zhang et al. 2023), and since then, they have become the most widely used insecticide worldwide (Mitchell et al. 2017; Klingelhöfer et al. 2022). Structurally distinct from all other synthetic and plant insecticides, neonicotinoid insecticides are nicotine agonists that act at the binding site of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), making them an important class of optimised pesticides (Vignet et al. 2019; Zuščíková et al. 2023). Acetamiprid (ACE) is a neonicotinoid insecticide with a cyanamidine structure. This compound was synthesised by Nippon Soda Co. in 1989 during research on nitromethylene derivatives and registered in Japan in 1995. This insecticide is currently being developed and used worldwide for its general crop protection characteristics, broad spectrum of effectiveness, systemic nature and translaminar action (Naranjo & Akey 2005). Acetamiprid is primarily used to control piercing-sucking insects on fruits and vegetables; and species, such as aphids, which infest and damage foliage plants. Due to their high water solubility, relative stability to hydrolysis at environmental temperatures, and slow photodegradation in water (Guedegba et al. 2019), acetamiprid residues have been detected in surface waters around the world at concentrations ranging from 2 ng/L to 410 µg/L (Zoumenou et al. 2019; Veedu et al. 2022; Mutshekwa et al. 2023).

According to an European Food Safety Authority (EFSA) report, aquatic insects are the most sensitive organisms to acetamiprid, whereas fish, algae, and aquatic plants are considered at low risk (EFSA 2022). However, there are several studies in the literature reporting the harmful effects of acetamiprid on both invertebrate and vertebrate species. It has been demonstrated that the intensive use of this pesticide may affect non-target organisms such as bees (Shi et al. 2020; Capela et al. 2022), bivalves (Mishchuk & Stoliar 2008), birds (Humann-Guillemot et al. 2019) and gastropods (Shaker et al. 2015; Cossi et al. 2020).

Contributing to biomass production and regulation of trophic networks and nutrient cycles, fish are essential for maintaining ecosystem functioning and stability (Macirella et al. 2023). Fish easily absorb

xenobiotics dissolved in the water through their gills and body surfaces or by direct ingestion (Afshan et al. 2014) and are highly sensitive to the presence of pollutants, thus representing well-acknowledged bioindicators (Macirella & Brunelli 2017; Keke et al. 2020).

Nevertheless, there is a need for more information concerning the effects induced by acetamiprid in fish. The few available studies mainly focused on behavioural alterations (Azadikhah et al. 2023), modification of protein and carbohydrate content in several tissues (Raj & Joseph 2015), alteration of biochemical parameters, Na^+/K^+ -ATPase modulation and induction of oxidative stress (Veedu et al. 2022). It must be emphasised that all these reports refer to high acetamiprid concentrations, leaving this compound's toxic potential largely undisclosed.

The gills of fish are complex organs that perform several crucial functions. They represent the site of gas exchange but are also involved in osmotic and acid-base regulation, nitrogenous waste excretion, detoxification, and hormone production (Brunelli et al. 2008, 2011; Fasulo et al. 2012; Noreen et al. 2022). Due to their large surface area and continuous contact with the aquatic environment, fishes' gills are the main absorption route and the first organ affected by toxic substances (De Marco et al. 2022, 2023). The adverse effects exerted by toxicants may compromise the multiple functions of gills, resulting in potential health issues for the entire organism (Ahmed et al. 2023). Considering the crucial physiological role of fish gills, it is surprising that only a limited number of studies have examined the effects of acetamiprid on this organ.

In this study, the bleak *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) has been chosen as a model species. *Alburnus alburnus* is a small-sized cyprinid species widely spread in Europe and Asia (Sousa-Santos et al. 2018) that was accidentally introduced in Algeria (North Africa) in 2006 (Attou & Arab 2013). It is recognised as one of the most sensitive species to pollution, making it a good sentinel for wastewater-related pressure in aquatic environments (Duran et al. 2003; Ionescu et al. 2016; Jovanović Marić et al. 2020).

Given this background, we first determined the lethal concentration of acetamiprid after 96 h (LC₅₀₋₉₆). In the second step, we evaluated the morpho-functional alteration of gills after short-term exposure (96 h) to two low and environmentally relevant concentrations of acetamiprid through an in-depth histological analysis and the molecular determination of Na^+/K^+ -ATPase expression. Na^+/K^+ -ATPase expression is considered a sensitive marker of osmotic stress in fish (Su

et al. 2022) and has been successfully used to evaluate the disturbance induced by several pollutants (Brunelli et al. 2008; Macirella & Brunelli 2017; Macirella et al. 2019, 2019). To the best of our knowledge, this is the only report on the histological and functional effects induced by low acetamiprid concentrations on fish gills.

Materials and methods

Fish maintenance

Juveniles (2 months old) of both sexes of *A. alburnus* (mean weight 0.90 ± 0.02 g) were obtained from the Ziban Aquaculture Farm, province of Biskra (north-east Algeria), and transported to the laboratory. Fish were kept under controlled conditions in glass tanks (50 L) for the acclimatisation period (15 days) (temperature $21.03 \pm 0.30^\circ\text{C}$; pH 7.30; dissolved oxygen 7.9 ± 0.5 mg/L and NH_3 less than 0.01 mg/L, and 14:10 light:dark photoperiod). During acclimatisation, fish were fed daily using commercial dry feed (Tetramin R, Germany) at 1.5% of their weight.

Insecticide preparation

A stock solution of acetamiprid [(E)-N-(6-Chloro-3-pyridylmethyl)-N-cyano-N-(methyl-d3) acetamidine] (Sigma-Aldrich Chemical Co., Gillingham, UK) was prepared in ultrapure water. The stock solution was diluted in dechlorinated tap water to reach the nominal concentrations of acetamiprid according to the exposure condition (acute toxicity test or molecular and histological analyses).

Experimental design

Based on data available in the literature showing 100% stability of acetamiprid in water within 24 h (El-Garawani et al. 2022), all tests were performed in a semi-static system, with the solution renewed daily to ensure consistent exposure. During the experiment (96 h), fish were fed on alternate days. All water quality parameters were monitored and kept constant; moreover, food waste and debris were removed daily using a fine mesh. Three independent biological replicates of the whole experiment were performed.

Experiments were conducted according to the laws protecting animals and were approved by the Laboratory for the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Areas Committee, University of Skikda (Ref. 01/2023–01/11/2023).

Acute toxicity tests

Acute toxicity tests were performed according to the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guideline (OECD 2019). Acetamiprid was dissolved in tap water to obtain nominal concentrations of 25, 30, 40, 45 and 50 mg/L. For each experimental set ($n = 5$ treated groups and $n = 1$ control group), 15 fish of comparable body dimensions were placed in test aquaria (capacity 50 L). A total of four replicates was performed. Mortality was recorded every day, and dead fish were promptly removed. The calculation of the lethal concentration was performed using the method proposed by Miller and Tainter (1944) and Randhawa (2009), with a confidence interval of 95%.

Sub-lethal effects

Histological and molecular analysis was conducted on individuals exposed to two sub-lethal doses of acetamiprid for 96 h. Selected concentrations (150 and 300 $\mu\text{g/L}$) correspond to 0.46 and 0.92% of the median lethal concentration at 96 h ($\text{LC}_{50-96\text{h}}$), respectively. Besides, the dose selection was based on preexisting data on the worldwide concentration of acetamiprid in surface water, thus ensuring that the doses can be considered very low and environmentally realistic (Zoumenou et al. 2019; Veedu et al. 2022; Mutshekwa et al. 2023).

For each tested concentration, including the control, 10 fish were placed into 20 L glass tanks containing the appropriate treatment solution. The control group was maintained in tap water. After 96 h of exposure, fish were euthanised using ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS 222, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the gills were quickly excised and processed for subsequent molecular and histological analyses.

Morphological analysis

Six animals each of the control and acetamiprid exposed groups were used for histological analysis. Excised gills were fixed for 3 h in 3% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in phosphate-buffered saline solution (PBS 0.1 M, pH 7.2) and post-fixed in 2% osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 2 h at 4°C . The samples were dehydrated in increasing ethanol concentrations, soaked in propylene oxide and embedded in Epon-Araldite (Araldite 502/Embed 812, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Semi-thin sections (1 μm) were cut using a Leica UltraCut UCT (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), stained in

toluidine blue (1% toluidine in 2% borate), and examined under a light microscope (DM1000 LED; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a digital camera (ICC50; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Molecular analysis Four animals each of the control and acetamiprid exposed groups were used for molecular analyses. The gill samples were fixed in RNA later™ Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at -80°C for 24 h. The PureLink RNA Mini kit and PureLink™ DNase Set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used following the manufacturer's protocols to extract total RNA from gill samples. The NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1.5% agarose gel electrophoresis were used to check RNA quantity and quality, respectively. The High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used for first-strand cDNA synthesis. The resulting cDNA was stored at -20°C until it was used for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis (RT-qPCR) to quantify the expression of Na^+/K^+ -ATPase transporting subunit alpha 1a (*atp1a1a.1*, The National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence NM_131686.1). cDNA amplification was made using the TaqMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a Light Cycler (Applied Biosystems Step One, Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA). Each reaction contained 2 μL of cDNA, 10 μL of master mix (TaqMan Universal Master Mix II, Applied Biosystems), 1 μL of assay mix (TaqMan Gene Expression Assay), and 7 μL of RNase- and DNase-free water. The temperature and the time of each cycle were as follows: one cycle at 50°C for 2 min,

40 cycles at 95°C for 15 min, and 60°C for 1 min. Two internal reference genes were used: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*, NCBI reference sequence: NM_001115114.1) and the actin beta 1 (*actb1*, NCBI reference sequence: NM_131031.2); three technical replicates were performed. The $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method was used to calculate the relative mRNA expression of the analysed gene (Livak & Schmittgen 2001).

Statistical analyses

Graph Pad Prism Program 8.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) was used for the statistical evaluation ($p = .05$). Data from the three biological replicates were statistically compared (Mann-Whitney test); since no significant differences were detected among the three replicates ($p > .05$), data were pooled to perform the statistical analyses. The assumption of normality was tested using the Shapiro-Wilk test. Fisher's exact probability test was used to compare mortality (number alive versus number dead) between the acetamiprid-treated and control groups. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison tests was applied to statistically compare significant differences in mRNA expression levels between the acetamiprid-treated and control groups.

Results

Acute exposure

During the exposure, no mortality was observed in the control group or in the 25 mg/L acetamiprid-treated group (Table I). For each dose, the percentage of animals that died was transformed to probit and data analyses showed that the nominal 96-h LC50 value of acetamiprid for *A. alburnus* juveniles was equal to 34.546 mg/L (Table II, 95% confidence limits).

Table I. Mortality rate of *A. alburnus* juveniles.

Concentration mg/L	No. of exposed fish	No. of dead fish	% of dead	log 10	Probit
Control	15	0	0	/	/
25	15	0	1.66	1.397	2.855
35	15	10	66.66	1.544	5.268
40	15	13	86.66	1.602	6.107
45	15	14	93.33	1.653	6.498
50	15	15	98.33	1.698	7.120

Table II. Estimated 96-h LC50 in *A. alburnus* juveniles.

Exposure time (h)	Right of regression	Slope	LC 50 (mg/L)
96	$Y = 14.128 \times - 16.735$	0.9879	34.546 ± 0.025

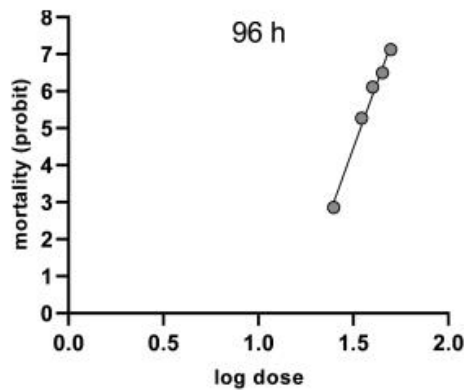


Figure 1. Plot of log-doses versus probits from Table 1 for the determination of 96-h LC50 value of acetamiprid for *A. alburnus* juveniles.

Figure 1 shows the probit values plotted against log-doses.

Morphology

No morphological changes were detected in samples from the control group during the experimental period. Our observations of gills under basal conditions revealed a structural organisation similar to that of other freshwater teleosts. The gills are supported by four cartilaginous arches from which depart a double series of primary filaments or main

filaments. The primary filaments give insertion to the secondary filaments or respiratory lamellae (Figure 2(a)). The epithelium of the main filament is made up of four cell types: pavement cells (PVCs), chloride cells (CCs), mucous cells (MCs) and basal cells (BCs) (Figures 2(b)). PVCs are the most abundant cell type, forming the nearly continuous outer epithelial layer. Both CCs and MCs are scattered beneath the PVCs. Their apical surface is partially covered by adjacent PVCs, and small pores allow for their opening outwards. CCs, also called mitochondria-rich cells, are large specialised cells often distributed in clusters along the filament margins and interlamellar region. MCs, also called goblet cells, are easily recognisable by the abundant mucus-secreting granules that fill the whole cytoplasm. In the innermost layer, undifferentiated BCs lie on the underlying basal lamina (Figures 2(b)). The thin epithelium of the secondary filament is very simple and composed of an external layer made up of PVCs and BCs distributed in the inner layer. It is possible to recognise pillar cells (PCs) that regulate the blood flow of the lamellar capillaries (Figure 2(b)).

Fish exposed to 150 µg/L of acetamiprid showed numerous morphological alterations in both primary and secondary filaments. In the primary epithelium, hyperplasia and hypertrophy of both CCs and MCs were observed (Figure 3(a)). Large intercellular gaps were frequently noted, leading to the complete loss of the regular organisation of the gill's primary epithelium. In particular, intercellular gaps were mostly detected in the deeper layers of the epithelium, where degenerated basal cells can also be detected

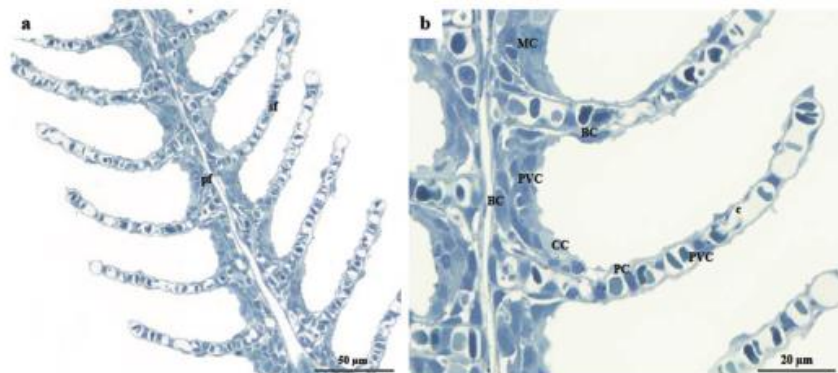


Figure 2. Light micrographs of *A. alburnus* gills in the control group. (a) The gills are formed by a double series of primary filaments (pf) that give insertion to the secondary filaments (sf). (b) The epithelium of the primary filament is composed of pavement cells (PVC), mucous cells (MC), chloride cells (CC), and basal cells (BC). The secondary epithelium is composed of pavement cells (PVC) and basal cells (BC); the pillar cells (PC) regulate the blood's flow capillary (c).

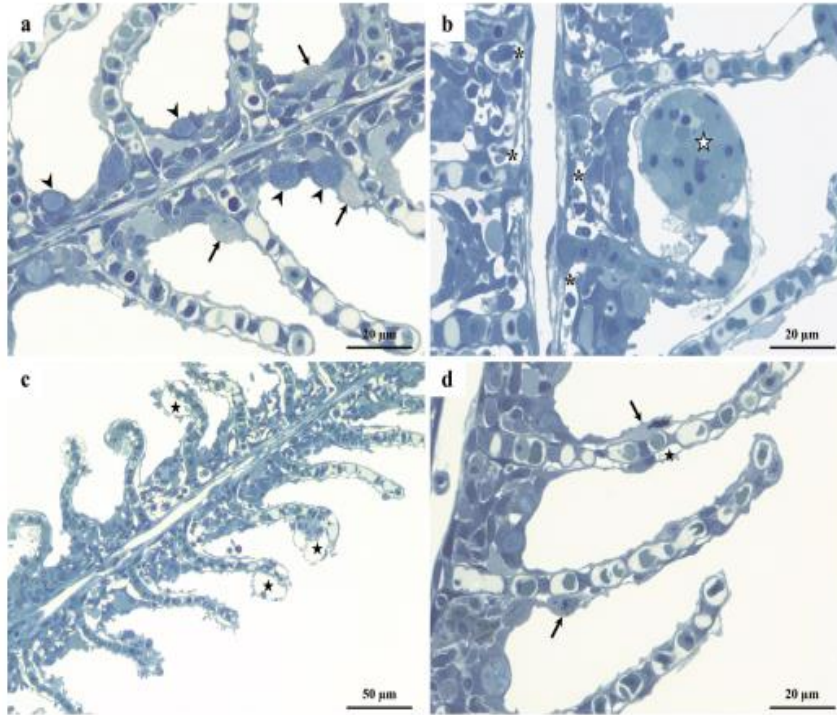


Figure 3. Light micrographs of *A. alburnus* gills after 96 h of exposure to 150 µg/L of acetamiprid. (a) The hyperplasia and hypertrophy of chloride cells (arrows) and mucous cells (arrowheads) were evident in the primary filament. (b) Large intercellular gaps appeared in the deeper layers of primary epithelium along with the degeneration of basal cells (asterisks). In the secondary filament, aneurysms were observed (white star). (c) Note the detachment of the secondary epithelium from the connective tissue (black star). (d) Chloride cells proliferated in the secondary filament (arrows); black star = detachment of the secondary epithelium.

(Figure 3(b)). Numerous alterations also occurred in the secondary filament, where it was possible to observe the detachment of the epithelium from the connective tissue. The detachment led to the formation of large lacunae that were observed in both the intermediate and the apical portions of the lamellae (Figures 3(c,d)). In some cases, the lamellae appeared curved, and in the apical portion, aneurysms were frequently noted (Figure 3(b)). The ectopia of CCs was marked, and these cells were frequently detected all along the lamellar surface (Figure 3(d)).

Gill alterations were more conspicuous and severe after exposure to 300 µg/L of acetamiprid. In all samples, a complete disarrangement of the structure of both primary and secondary epithelium was detected (Figure 4). In some cases, it was possible to observe a prominent proliferation of the primary epithelium; often, the increase in thickness gave origin to lamellar fusion (Figures 4(a,b)). Several hyperplastic and hypertrophic cells were

detected; in particular, the number and the size of CCs increased, and often, these cells showed a degenerated appearance (Figures 4(c)). Degeneration also involved the secondary filaments. Some lamellae were curved, and in some areas, the tissue of the apical tips proliferated (Figures 4(d,e)). Many CCs were detected in the secondary lamellae, and often, they appeared severely degenerated (Figures 4(d,e)). Other cell populations, such as PVCs, displayed a pale cytoplasm, typical of necrotic cells (Figures 4(d,e)). Moreover, extensive phenomena of epithelial detachment were visible, along with the appearance of dilated apical tips (Figures 4(c,f)). In the dilated apical tips, numerous erythrocytes and a few macrophages were recognisable (Figure 4(f)). In this exposed group, a complete disarrangement of the vascular component was also noted, and the pillar cells were no longer distinguishable (Figures 4(e,f)).

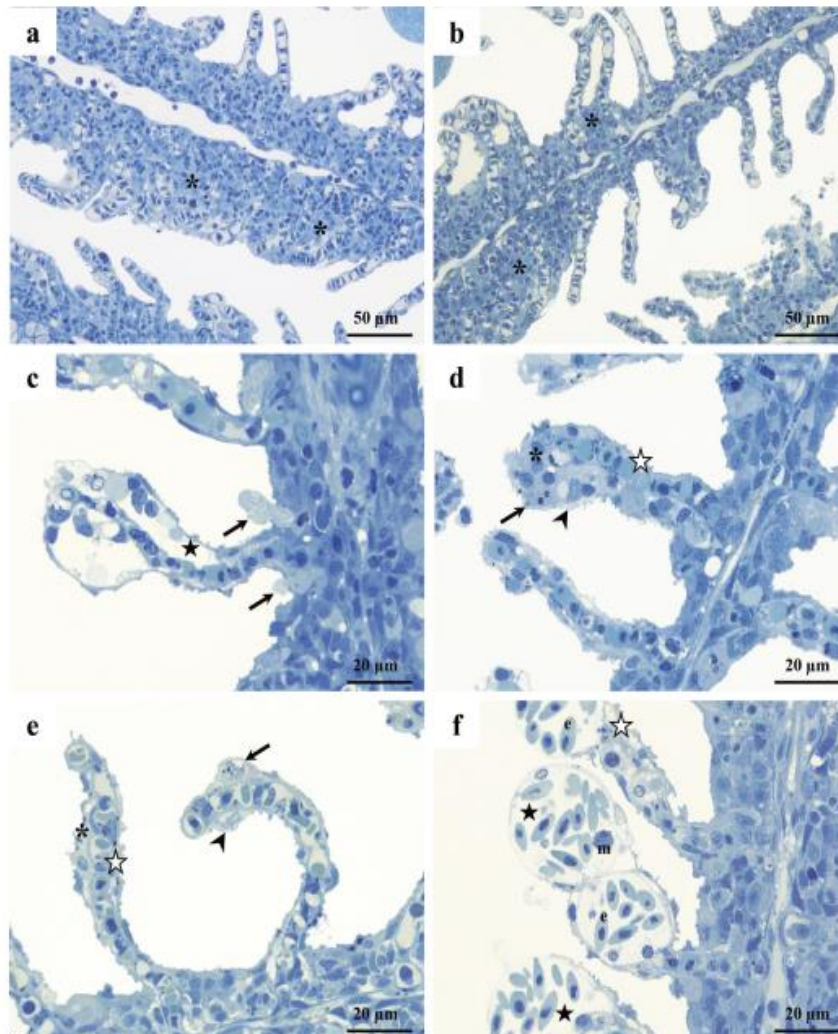


Figure 4. Light micrographs of *A. alburnus* gills after 96 h of exposure to 300 µg/L of acetamiprid. (a,b) the proliferation of the primary epithelium and the lamellar fusion were visible (asterisks). (c) Numerous degenerated chloride cells were observed in the primary filament (arrows); note the dilation of the secondary epithelium (black star). (d,e) in the secondary filament, the proliferation of the epithelium was severe (asterisk), and degenerated pavement cells (arrowhead) and chloride cells (arrow) were observed. Note the disarrangement of the vascular component (white star). (f) In the dilated apical tips (black stars), erythrocytes (e) and macrophages (m) were observed; white star = degeneration of the pillar cell system.

Na⁺/K⁺-ATPase gene expression

Compared to the control, a significant increase ($p \leq .1$) in the expression of Na^+/K^+ -ATPase was detected after 96 h of exposure to 150 µg/L of

acetamiprid. The same upregulation was also detected after exposure to 300 µg/L. No differences were noted among the different treated groups (Figure 5).

68 R. Agaguena et al.

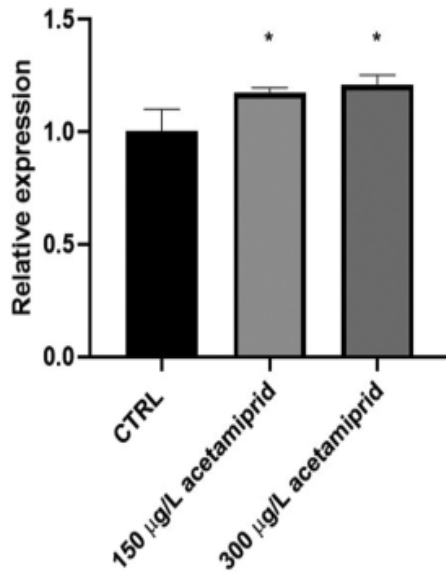


Figure 5. Gene expression (mean \pm standard deviation) in *A. alburnus* gills after 96 h of exposure to 150 and 300 $\mu\text{g/L}$: relative mRNA expression of Na^+/K^+ -ATPase. Asterisks indicate significant differences between the treated and control groups; * $p \leq .1$.

Discussion

Acute toxicity

Standardised acute toxicity tests are widely employed for environmental risk assessment, and they represent an effective tool when evaluating the potential impact of hazardous substances on fish (Mahi et al. 2022; Hu et al. 2022; Pulido-Reyes et al. 2024).

The median lethal concentration of acetaminiprid for *A. alburnus* juveniles determined here was 34.546 mg/L. When comparing our results with available data on the mortality rate of juveniles belonging to other freshwater fish species, substantial differences in sensitivity could be evidenced. Indeed, the LC50 values reported for *Ctenopharyngodon idella*, *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus* range from about 121 to 265 mg/L (Guedegba et al. 2019; Houndji et al. 2020; El-Garawani et al. 2022; Azadikhah et al. 2023).

Species-specific sensitivity of fish to toxicants is well acknowledged since the interaction of the chemicals with the physiology of species is strictly related to taxonomic traits (Spurgeon et al. 2020; Gasser et al. 2024). However, the influence of body

size in determining these mortality outcomes cannot be excluded. Ferro et al. (2021) recently reported a strong correlation between body weight and mortality in fish exposed to cadmium, with bigger species being more resistant than smaller ones. One may speculate that the high sensitivity of *A. alburnus* to acetaminiprid may be related to both biological/physiological features of the species (Spurgeon et al. 2020) and an allometric phenomenon. Since this topic has been surprisingly under-investigated in ecotoxicology, more studies are needed to better understand the mechanism(s) involved.

Sub-lethal effects

Gills are fishes' main respiratory organs, also playing an essential role in osmotic and acid-base regulation (Brunelli et al. 2008). Their direct and continuous exposure to the external medium and their wide surface area make them vulnerable to diverse xenobiotic compounds, including pesticides (Fernandes et al. 2007; Fasulo et al. 2012; Curcio et al. 2022).

In this study, we showed, for the first time, the noxious effects induced by two low concentrations of acetaminiprid on the gills of *A. alburnus* juveniles and demonstrated that the severity of observed alterations increased with an increase in the exposure dose.

Morphology

Histopathological investigations can be used to identify the harmful effects of several chemicals (Macirella & Brunelli 2017; Macirella et al. 2019; Manjunatha et al. 2022; Shah & Parveen 2022; Shahid et al. 2022; Rohani 2023). In our study, both acetaminiprid concentrations affect *A. alburnus* gills' structural arrangement. The histological modifications involved both the primary and secondary epithelium, and the most frequent modifications found were the hyperplasia and hypertrophy of CCs, epithelial detachment, aneurysm formation, degeneration of the vascular component, and the appearance of necrotic cells. Our results are in agreement with the few available reports on the effects of acetaminiprid on the gills of other freshwater species. Hypertrophy, hyperplasia, epithelial detachment, and necrosis have been reported in *Ctenopharyngodon idella* gills after 96 h of exposure to high concentrations (50 and 200 mg) of acetaminiprid (Azadikhah et al. 2023). Similar alterations have also been observed in *Oreochromis niloticus* and *Cirrhinus mrigala* after long-term exposure to

high concentrations (3 and 19.5 mg/L) of acetamiprid (Ghayyur et al. 2021; El-Garawani et al. 2022).

In the present study, epithelial detachment was frequently detected in *A. alburnus* exposed to acetamiprid, and it is recognised as a common and early response of freshwater gills to chemical insults (Brunelli et al. 2008, 2011; Ahmed et al. 2023). Indeed, epithelial lifting may represent an attempt to counteract the further entry of the toxicant by increasing the diffusion barrier (Carvalho et al. 2020; Curcio et al. 2022). Hypertrophic and hyperplastic events involving chloride cells were frequently detected in *A. alburnus* gills after exposure to both tested concentrations. Chloride cells have been recognised as the cellular type with the highest enzyme concentration (McCormick et al. 2009) and a target for several classes of pollutants, including pesticides (Macirella et al. 2019, 2019, 2020; Ahmed et al. 2023). Indeed, when environmental modifications threaten ion exchange, chloride cells may become hypertrophic and/or proliferate on the lamellae (Perry 1997; Macirella & Brunelli 2017). According to Omirinde et al. (2017), this may lead to lamellar fusion, thus occluding the interlamellar space through which water flows. Both types of epithelial alterations have the potential to affect the functional roles of gill epithelium (Curcio et al. 2022), hampering the gills' capacity to regulate the transmembrane transport of water, ions and gases.

When *A. alburnus* samples were exposed to the highest tested concentrations, injuries became severe, and necrotic PVCs could often be recognised among the epithelial tissue. This is considered an irreversible change that may completely disrupt respiratory and osmotic regulation, even culminating in the animals' death (Strzyzewska et al. 2016; Carvalho et al. 2020). Degeneration also involves the PC system, damaging vascular integrity and enhancing blood flow in the lamellae, thus inducing aneurysm formation (Macirella et al. 2020).

Na⁺/K⁺-ATPase expression

Here, we demonstrated, in both treatment groups, that exposure to acetamiprid significantly increased the expression of the *atp1a1* gene, which encodes the catalytic component of the Na^+/K^+ -ATPase. The only available study on acetamiprid effects on biochemical indices in the gills of *Catla catla* juveniles reports conflicting results following a significant decrease in the

Na^+/K^+ -ATPase activity after 96 h of exposure to two high concentrations (0.5 and 1 mg/L) of acetamiprid (Veedu et al. 2022). This is not surprising considering the significant difference in tested doses between the two experimental setups. It can be hypothesised that the osmoregulatory disturbance caused by a low concentration of acetamiprid stimulates a compensatory proliferative mechanism and an increase in the Na^+/K^+ -ATPase expression. In contrast, exposure to very high concentrations, inducing a profound modification of the morphology and ultrastructure of the chloride cells, could induce a downregulation.

Besides, an increase in Na^+/K^+ -ATPase expression has previously been reported in the gills of other freshwater fish after exposure to several chemicals, including pesticides (Macirella & Brunelli 2017; Macirella et al. 2020; Pagano et al. 2024).

Interestingly, in our study we also observed the proliferation of CCs in both primary and secondary filaments, which could be considered an attempt by the organ to achieve ionic equilibrium (Macirella & Brunelli 2017). It is conceivable that the up-regulation of the *atp1a1* in the gills of *A. alburnus* may result from a numerical increase in CCs.

Conclusion

The acute toxicity test performed here revealed a high sensitivity of *A. alburnus* juveniles compared to other freshwater species, highlighting that variability in fish response should also be considered for an accurate pesticide environmental risk assessment.

Moreover, our results clearly demonstrate that even low concentrations of acetamiprid can severely affect gill morphology in *A. alburnus* juveniles, also interfering with the expression of the Na^+/K^+ -ATPase, a key enzyme involved in osmotic and acid-base regulation.

Overall, our results indicate that it is crucial to define an extended ecotoxicological test strategy that includes lethal dose evaluation and the use of well-recognised markers of exposure.

With its high sensitivity, histological analysis can detect early alterations even after exposure to very low concentrations of pollutants, allowing for proactive and vigilant monitoring.

In agreement with the data available in the literature, the authors suggest expanding the panel of tests required for the approval of agrochemical compounds and using different diagnostic tools for ecotoxicological investigations.

Acknowledgments

The authors thank the management of the Ziban Aquaculture Farm and all individuals who helped them to finish this study.

Funding

This study was supported by the Algerian Fund for Scientific Research (Laboratory for the Optimization of Agricultural Production in Subhumid Areas), the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria [PRFU Projet to Pr. N. ZAIDI] and accommodated in the Incubator of SKIKDA University.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Compliance with ethical standards

All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Data availability statement

Data analysed in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

E. Brunelli  <http://orcid.org/0000-0003-3669-1395>

References

- Afshan S, Ali S, Ameen US, Farid M, Bharwana SA, Hannan F, Ahmad R. 2014. Effect of different heavy metal pollution on fish. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences* 2(1):74–79.
- Ahmed AI, Macirella R, Talarico F, Curcio V, Trotta G, Aiello D, Gharbi N, Mezzasalma M, Brunelli E. 2023. Short-term effects of the strobilurin fungicide dimoxystrobin on zebrafish gills: A morpho-functional study. *Chemosphere* 333:138914. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2023.138914.
- Attou F, Arab A. 2013. Impact de l'introduction d'*Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1759) sur l'espèce autochtone *Barbus setivimensis* (Valenciennes, 1842) (poissons cyprinidés) dans le lac de barrage de Keddara (Algérie). *Revue d'Écologie* 68 (2):193–202. DOI: 10.3406/revec.2013.1693.
- Azadikhah D, Baghdari MV, Dadras M, Kadhim SI, Kareem AK, Hussein HA. 2023. Evaluation of histopathological and hematological effects of neonicotinoid (acetamiprid 20% SP) on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Research* 2023:1–9. DOI: 10.1155/2023/9951536.
- Belhabib L, Belhoucine F, Tabeche A, Alioua A. 2023. Bioaccumulation and biomarker responses caused by organochlorine pesticides in Bogue *Boops boops* (Linnaeus, 1758) from the Bay of Oran, Algeria. *Applied Ecology and Environmental Research* 21(2):1629–1654. DOI: 10.15666/aeet/2102_16291654.
- Brunelli E, Mauceri A, Maisano M, Bernabò I, Giannetto A, De Domenico E, Corapi B, Tripepi S, Fasulo S. 2011. Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L. exposed to cadmium. *Acta Histochemica* 113(2):201–213. DOI: 10.1016/j.acthis.2009.10.002.
- Brunelli E, Talarico E, Corapi B, Perrotta I, Tripepi S. 2008. Effects of a sublethal concentration of sodium lauryl sulphate on the morphology and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*). *Ecotoxicology & Environmental Safety* 71(2):436–445. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.09.010.
- Capela N, Xu M, Simões S, Azevedo-Pereira HM, Peters J, Sousa JP. 2022. Exposure and risk assessment of acetamiprid in honey bee colonies under a real exposure scenario in Eucalyptus sp. landscapes. *Science of the Total Environment* 840:156485. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156485.
- Carvalho TLADB, Nascimento AAD, Gonçalves CFDS, Santos MAJD, Sales A. 2020. Assessing the histological changes in fish gills as environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Research* 48(4):590–601. DOI: 10.3856/vol48-issue4-fulltext-2351.
- Cossi PF, Herbert LT, Yusseppone MS, Pérez AF, Kristoff G. 2020. Toxicity evaluation of the active ingredient acetamiprid and a commercial formulation (Assail® 70) on the non-target gastropod *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae). *Ecotoxicology & Environmental Safety* 192:110248. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110248.
- Crenna E, Sala S, Polce C, Collina E. 2017. Pollinators in life cycle assessment: Towards a framework for impact assessment. *Journal of Cleaner Production* 140:525–536. DOI: 10.1016/j.jclepro.2016.02.058.
- Curcio V, Macirella R, Sesti S, Ahmed AI, Talarico F, Tagarelli A, Mezzasalma S, Brunelli E. 2022. Morphological and functional alterations induced by two ecologically relevant concentrations of lead on *Danio rerio* gills. *International Journal of Molecular Sciences* 23(16):9165. DOI: 10.3390/ijms23169165.
- De Marco G, Billè B, Brandão F, Galati M, Pereira P, Cappello T, Pacheco M. 2023. Differential cell metabolic pathways in gills and liver of fish (white seabream *Diplodus sargus*) coping with dietary methylmercury exposure. *Toxics* 11(2):181. DOI: 10.3390/toxics11020181.
- De Marco G, Brandão F, Pereira P, Pacheco M, Cappello T. 2022. Organ-specific metabolome deciphering cell pathways to cope with mercury in wild fish (golden grey mullet *Chelon auratus*). *Animals* 12(1):79. DOI: 10.3390/ani12010079.
- Duran M, Tüzen M, Kayim M. 2003. Exploration of biological richness and water quality of stream Kelkit, Tokat-Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin* 12(4):370–375.
- El Badaoui N, Amar Y, Joaoum-Justo C, Djahed B, Ammar H, Benosman R. 2015. Assessment of pollution in Sidi M'Hamed Benali Lake (Algeria) based on bioindicators and physicochemical parameters. *Iranica Journal of Energy & Environment* 6(4):308–315. DOI: 10.5829/idosi.ijee.2015.06.04.09.
- El-Garawani IM, Khallaf EA, Alne-Na-Ei AA, Elgendy RG, Sobhy HM, Khairallah A, Hathout HMR, Malhat F, Nofal AE. 2022. The effect of neonicotinoids exposure on *Oreochromis niloticus* histopathological alterations and genotoxicity. *Bulletin of*

- Environmental Contamination and Toxicology 109 (6):1001–1009. DOI: 10.1007/s00128-022-03611-6.
- European Food Safety Authority (EFSA). Statement on the active substance acetamiprid. EFSA Journal 2022. DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7031. Accessed Jan 2024 17.
- Fasulo S, Maisano M, Sperone E, Mauceri A, Bernabò I, Cappello T, D'Agata A, Tripepi S, Brunelli E. 2012. Toxicity of Forrozan crude oil to ornate wrasse (*Thalassoma pavo*, Osteichthyes, Labridae): ultrastructure and cellular biomarkers. Italian Journal of Zoology 79(2):182–199. DOI: 10.1080/11250003.2011.623139.
- Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Monteiro SM, Salgado MA. 2007. Histopathological gill changes in wild leaping grey mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. Environmental Toxicology 22 (4):443–448. DOI: 10.1002/tox.20269.
- Ferro JP, Ferrari L, Eissa BL. 2021. Acute toxicity of cadmium to freshwater fishes and its relationship with body size and respiratory strategy. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 248:109109. DOI: 10.1016/j.cbpc.2021.109109.
- Gasser L, Schür C, Perez-Cruz F, Schirmer K, Jesi MB. 2024. Machine learning-based prediction of fish acute mortality: Implementation, interpretation, and regulatory relevance. Environmental Science: Advances. DOI: 10.1039/D4VA00072B.
- Ghayyur S, Khan MF, Tabassum S, Ahmad MS, Sajid M, Badshah K, Khan MA, Khan S, Ghayyur NA, Qamer B, Ahmad S. 2021. A comparative study on the effects of selected pesticides on hemato-biochemistry and tissue histology of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). Saudi Journal of Biological Sciences 28(1):603–611. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.10.049.
- Guedgeba NL, Imorou Toko I, Agbohessi PT, Zoumenou BS, Douny C, Mandiki SN, Schiffers B, Scippo ML, Kestemont P. 2019. Comparative acute toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) juveniles. Journal of Environmental Science and Health, Part B 54(7):580–589. DOI: 10.1080/03601234.2019.1616986.
- Houndji MA, Imorou Toko I, Guedgeba L, Yacouto E, Agbohessi PT, Mandiki SN, Scippo ML, Kestemont P. 2020. Joint toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. Journal of Environmental Science and Health, Part B 55(7):669–676. DOI: 10.1080/03601234.2020.1763712.
- Hu G, Wang H, Wan Y, Zhou L, Wang Q, Wang M. 2022. Combined toxicities of cadmium and five agrochemicals to the larval zebrafish (*Danio rerio*). Scientific Reports 12 (1):16045. DOI: 10.1038/s41598-022-20364-8.
- Humann-Guillemot S, de Montaigu CT, Sire J, Grünig S, Gning O, Glauser G, Vallat A, Helfenstein F. 2019. A sublethal dose of the neonicotinoid insecticide acetamiprid reduces sperm density in a songbird. Environmental Research 177:108589. DOI: 10.1016/j.envres.2019.108589.
- Ionescu P, Deak G, Diacu E, Radu VM. 2016. Assessment of heavy metal levels in water, sediment and fish from Plumbuita Lake, Romania. Revista de Chimie 67:2148–2150.
- Jovanović Marić JM, Kolarević MK, Kolarević SM, Đorđević JZ, Paunović MM, Kostić Vuković JM, Sunjog KZ, Smiljanić PB, Gačić ZM, Vuković Gačić BS. 2020. Sensitivity of bleak (*Alburnus alburnus*) in detection of the wastewater related pressure in large lowland rivers. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 105(2):224–229. DOI: 10.1007/s00128-020-02944-4.
- Keke UN, Mgbemena AS, Arimoro FO, Omalu IC. 2020. Biomonitoring of effects and accumulations of heavy metals insults using some helminth parasites of fish as bio-indicators in an Afrotropical stream. Frontiers in Environmental Science 8:576080. DOI: 10.3389/fenvs.2020.576080.
- Klingelhöfer D, Braun M, Brüggemann D, Groneberg DA. 2022. Neonicotinoids: a critical assessment of the global research landscape of the most extensively used insecticide. Environmental Research 213:113727. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113727.
- Lau YY, Hernandez E, Kristanti RA, Wijayanti Y, Emre M. 2023. Exploring the potential of composting for bioremediation of pesticides in agricultural sector. Industrial and Domestic Waste Management 3(1):47–66. DOI: 10.53623/idwm.v3i1.245.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method. Methods 25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Macirella R, Brunelli E. 2017. Morphofunctional alterations in zebrafish (*Danio rerio*) gills after exposure to mercury chloride. International Journal of Molecular Sciences 18(4):824. DOI: 10.3390/ijms18040824.
- Macirella R, Curcio V, Ahmed AI, Talarico F, Sesti S, Paravani E, Odetti L, Mezzasalma M, Brunelli E. 2023. Morphological and functional alterations in zebrafish (*Danio rerio*) liver after exposure to two ecologically relevant concentrations of lead. Fishes 8(7):342. DOI: 10.3390/fishes8070342.
- Macirella R, Curcio V, Brunelli E. 2020. Morpho-functional alterations in the gills of a seawater teleost, the ornate wrasse (*Thalassoma pavo* L.), after short-term exposure to chlorpyrifos. Toxics 8(4):97. DOI: 10.3390/toxics8040097.
- Macirella R, Madeo G, Sesti S, Tripepi M, Bernabò I, Godbert N, La Russa D, Brunelli E. 2020. Exposure and post-exposure effects of chlorpyrifos on *Carassius auratus* gills: An ultrastructural and morphofunctional investigation. Chemosphere 251(251):126434. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126434.
- Macirella R, Sesti S, Bernabò I, Tripepi M, Godbert N, Brunelli E. 2019. Lead toxicity in seawater teleosts: A morphofunctional and ultrastructural study on the gills of the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo* L.). Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands) 211:193–201. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.04.009.
- Macirella R, Tripepi M, Brunelli E. 2019. Morphological and immunohistochemical modifications in zebrafish (*Danio rerio*) gills after short-term exposure to the fungicide tebuconazole. Zebrafish 16(1):65–76. DOI: 10.1089/zeb.2018.1638.
- Mahi TF, Chowdhury G, Hossain MA, Baishnab AK, Schneider P, Iqbal MM. 2022. Assessment of lead (Pb) toxicity in juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*-growth, behaviour, erythrocytes abnormalities, and histological alterations in vital organs. Toxics 10(12):793. DOI: 10.3390/toxics10120793.
- Manjunatha B, Seo E, Bangyappagari D, Lee SJ. 2022. Histopathological and ultrastructural alterations reveal the toxicity of particulate matter (PM_{2.5}) in adult zebrafish. Journal of Hazardous Materials Advances 7:100135. DOI: 10.1016/j.hazadv.2022.100135.
- McCormick SD, Regish AM, Christensen AK. 2009. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in gill

- chloride cells of Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology* 212(24):3994–4001. DOI: 10.1242/jeb.037275.
- Miller LC, Tainter M. 1944. Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine: Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 57(2):261–264. DOI: 10.3181/00379727-57-14776.
- Mishchuk OV, Stolar OB. 2008. The effect of pesticide acetamiprid on biochemical markers in tissues of fresh water bivalve mussels *Anodonta cygnea* L. (Unionidae). *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* 80(5):117–124.
- Mitchell EA, Mulhauser B, Mulot M, Mutabazi A, Glauser G, Aebi A. 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358(6359):109–111. DOI: 10.1126/science.aan3684.
- Mutshakwa T, Mugwedi L, Moyo B, Madala NE, Wasserman RJ, Dondofema F, Dalu T. 2023. Assessing acetamiprid and chlorpyrifos pesticide concentrations in water and sediments across macadamia orchard and communal area small reservoirs. *Chemistry & Ecology* 39(4):393–403. DOI: 10.1080/02757540.2023.2199015.
- Naranjo SE, Akey DH. 2005. Conservation of natural enemies in cotton: comparative selectivity of acetamiprid in the management of *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science* 61(6):555–566. DOI: 10.1002/ps.1030.
- Noureen A, De Marco G, Rehman N, Jabeen F, Cappello T. 2022. Ameliorative hematological and histomorphological effects of dietary trigonella foenum-graecum seeds in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper oxide nanoparticles. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(20):13462. DOI: 10.3390/ijerph192013462.
- OECD. 2019. OECD guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals. No. 23. 2nd Edition. Paris: OECD Publishing. [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2000)6/REV1/en/pdf).
- Omirinde JO, Audu BS, Mohammed OM, Gosomji IJ. 2017. Histomorphometric changes in the gill of *Clarias gariepinus* exposed to acute concentrations of chlorpyrifos. *Journal of Morphological Sciences* 34(3):197–202. DOI: 10.4322/jms.105516.
- Osterberg JS, Darnell KM, Blickey TM, Romano JA, Rittschof D. 2012. Acute toxicity and sub-lethal effects of common pesticides in post-larval and juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 424:5–14. DOI: 10.1016/j.jembe.2012.05.004.
- Pagano AD, Gonçalves NM, Domingues WB, da Silveira TLR, Kütter MT, Junior ASV, Corcini CD, Nascimento MC, dos Reis LRV, Costa PG, Gomes P, Bianchini A, Volcan MV, Campos VF. 2024. Assessment of oxidative stress biomarkers in the threatened annual killifish *Austrolebias charrua* exposed to roundup. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 276:109787. DOI: 10.1016/j.cbpc.2023.109787.
- Perry SF. 1997. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology* 59(1):325–347. DOI: 10.1146/annurev.physiol.59.1.325.
- Pulido-Reyes G, Moreno-Martin G, Gómez-Gómez B, Navas JM, Madrid Y, Fernández-Cruz ML. 2024. Fish acute toxicity of nine nanomaterials: Need of pre-tests to ensure comparability and reuse of data. *Environmental Research* 245:118072. DOI: 10.1016/j.envres.2023.118072.
- Raj SJ, Joseph B. 2015. Impact of acetamiprid toxicity on lactate dehydrogenase in some tissues of the fish *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Zoology & Research* 11(3):112–115. DOI: 10.3923/ijzr.2015.112.115.
- Randhawa MA. 2009. Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC* 21(3):184–185.
- Rohani MF. 2023. Pesticides toxicity in fish: Histopathological and hemato-biochemical aspects—A review. *Emerg Contam* 9(3):100234. DOI: 10.1016/j.emcon.2023.100234.
- Rosell G, Quero C, Coll J, Guerrero A. 2008. Biorational insecticides in pest management. *Pesticide Science* 33(2):103–121. DOI: 10.1584/jpestics.R08-01.
- Sánchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux N. 2016. Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment International* 89:7–11. DOI: 10.1016/j.envint.2016.01.009.
- Shah ZU, Parveen S. 2022. Oxidative, biochemical and histopathological alterations in fishes from pesticide contaminated river Ganga, India. *Scientific Reports* 12(1):3628. DOI: 10.1038/s41598-022-07506-8.
- Shahid S, Sultana T, Sultana S, Hussain B, Al-Ghanim KA, Al-Bashir F, Riaz MN, Mahboob S. 2022. Detecting aquatic pollution using histological investigations of the gills, liver, kidney, and muscles of *Oreochromis niloticus*. *Toxics* 10(10):564. DOI: 10.3390/toxics10100564.
- Shaker N, Badawy ME, Hussein AM. 2015. Snail control with different and unspecific pesticides. *Journal of Plant Protection* 6(12):1653–1661. DOI: 10.21608/JPPP.2015.75783.
- Shi J, Zhang R, Pei Y, Liao C, Wu X. 2020. Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults. *Environmental Pollution* 266:115345. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115345.
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio G, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke CH, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs JP, Whitehorn PR, Wiemers M. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1):5–34. DOI: 10.1007/s11356-014-3470-y.
- Soudani N, Belhamra M, Ugya AY, Patel N, Carretta L, Cardinali A, Toumi K. 2020. Environmental risk assessment of pesticide use in Algerian agriculture. *Journal of Applied Biology* 8(5):36–47. DOI: 10.7324/JABB.2020.80505.
- Sousa-Santos C, Matono P, Da Silva J, Ilheu M. 2018. Evaluation of potential hybridization between native fishes and the invasive bleak, *Alburnus alburnus* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 48(2):109–122. DOI: 10.3750/AIEP/02395.
- Spurgeon D, Lahive E, Robinson A, Short S, Kille P. 2020. Species sensitivity to toxic substances: Evolution, ecology and applications. *Frontiers of Environmental Science* 8:588380. DOI: 10.3389/fenvs.2020.588380.
- Strzyewska E, Szarek J, Babinska I. 2016. Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: A review. *Veterinary Medicine* 61(3):123–132. DOI: 10.17221/8763-VETMED.