UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

Senseur énergétique et signalisation de la reproduction

THÈSE présentée par :

Mathias FRÉVILLE

soutenue le : **20 septembre 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Science de la vie

Impact d'un herbicide à base de glyphosate chez la poule domestique

THÈSE dirigée par :

Mme DUPONT Joëlle	Directrice de Recherche, INRAE, PRC, Tours

RAPPORTEURS :

Mr DRIDI Sami	Professor, Laboratory of Avian Endocrinology & Molecular Genetics Center of Excellence for Poultry Science, Arkansas University, USA
Mr ANGELIER Frédéric	Directeur de Recherche, CNRS, CEBC, Villiers-en-Bois

---

JURY :

Mme DUPONT Joëlle	Directrice de Recherche, INRAE, PRC, Tours
Mr DRIDI Sami	Professor, Laboratory of Avian Endocrinology & Molecular Genetics Center of Excellence for Poultry Science, Arkansas University, USA
Mr ANGELIER Frédéric	Directeur de Recherche, CNRS, CEBC, Villiers-en-Bois
Mme TESSERAUD Sophie	Directrice de Recherche, INRAE, BOA, Tours
Mme SOLER Laura	Chargée de Recherche, INRAE, Toxalim, Toulouse

“The heart went in two ways and the brain has gone in stereo
Invent and reinvest, what do we know?”

Periphery (2019). Satellites. Sur Hail Stan. 3DOT Recordings

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier l'UMR PRC (Unité Mixte de Recherche Physiologie de la Reproduction et des Comportements) de m'avoir accueilli pendant ces trois années. Merci à son directeur Matthieu KELLER ainsi qu'à l'ensemble du personnel de la direction et du secrétariat, notamment Sophie MARY, Ghislaine PLOUX, Sandra CAVALIE et Anne MYCHAK.

Un IMMENSE merci à ma directrice de thèse Joëlle DUPONT qui m'a accordé sa confiance pour réaliser ce travail. Vous avez été d'une incroyable efficacité durant ces trois ans. Vous m'avez guidé dans mes recherches et maintenu dans le droit chemin, tout en m'aidant à transformer mes idées (parfois un peu tirées par les cheveux) en réels plans d'expérience. Vous avez un don pour faire grandir vos étudiants et je suis conscient de la chance que j'ai d'avoir pu apprendre à vos côtés. J'espère vous avoir donné satisfaction pendant ces trois ans et vous souhaite le meilleur dans tous vos futurs projets.

Pascal FROMENT, que dire ? MERCI PATRON. Vous êtes un scientifique exceptionnel et nos nombreuses discussions scientifiques ont renforcé ma passion pour la recherche. Votre vision et vos conseils m'ont été précieux durant ma thèse. J'ai toujours senti que vous vouliez le meilleur pour moi et je vous en remercie. Sans oublier bien évidemment votre bonne humeur et votre second degré qui apportent un peu de rire dans le monde très sérieux de la recherche scientifique.

Merci également aux rapporteurs Sami DRIDI et Frédéric ANGELIER, ainsi qu'aux membres du jury Sophie TESSERAUD et Laura SOLER qui ont accepté d'évaluer mes travaux.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse Agnès NARCY, Namya MELLOUK et Pascal VAUDIN, dont les conseils m'ont apporté une vision élargie de mes résultats et m'ont permis d'orienter au mieux mes travaux de recherche.

Je souhaite aussi remercier les différents collaborateurs avec qui j'ai pu travailler durant ces trois années et dont l'expertise a permis de considérablement améliorer la qualité de mes travaux. Merci notamment à Jérôme HENRI du laboratoire ANSES de Fougère d'avoir pris du

temps pour analyser mes résultats et de m'avoir appris les rudiments du monde de la toxicocinétique. Merci également à Benoît PIÉGU (avec un accent) et Gaëlle LEFORT pour leur aide dans l'analyse de mes résultats OMICS et dans la valorisation de ces derniers. Merci aussi à Martine MIGAUD et Jean-Philippe DUBOIS pour leur aide dans la réalisation des marquages immunohistochimique dans les cerveaux de poules. Un immense merci à l'équipe Microbiote, Monogastriques et Salmonella de m'avoir accueilli durant plusieurs semaines dans ses locaux, et notamment à Émilie BARILLEAU et Sébastien HOLBERT, qui m'ont enseigné l'art des tests bactériologiques et m'ont accompagné dans mes travaux.

Merci également aux doctorants de la PRC que j'ai pu côtoyer et à qui je souhaite réussite personnelle et professionnelle. Petite dédicace aux locataires (et anciennes locataires) du bureau au fond du couloir ; Pico, il manque à la langue française un qualificatif à la hauteur de ton génie ; ME oups je veux dire Marie, je ne peux que souhaiter le meilleur pour une âme aussi bienveillante que la tienne (et merci pour les cookies) ; Coline, je salue ta grandeur d'âme ainsi que ta résistance à la douleur et te souhaite de ne plus laisser traîner tes doigts dans la porte ; et pour finir Yasmine, dont le génie est à la hauteur de celui de ses colocataires.

Chrichri, merci bien évidemment pour ton aide précieuse lors des manips, mais aussi et surtout pour ta bonne humeur. Merci pour ton écoute durant mes périodes d'improvisation théâtrale et pour ta reconnaissance de l'immense artiste que je suis. Je reste disponible pour toute conversion de fichier Word et Excel et pour tout remix musical. Plus sérieusement, merci pour tout. Je te souhaite le meilleur, à toi mais aussi à Gaël, Mimi et Gwen.

Merci à mademoiselle CORBIN, pour sa bonne humeur et pour toutes ces expressions dont seules elle et l'Académie Française connaissent l'existence. Merci pour les rires, notamment à la cantine, tu apportes une bonne dose de coolitude dans l'équipe.

Merci à toi Claire alias Maman. Je peux maintenant t'avouer que j'ai développé une addiction au Sybr Green et que c'était bien moi qui dilapidais tous tes stocks. La fluorescence de mes cellules durant la nuit agit un peu comme une veilleuse et m'empêche de faire des cauchemars. Merci pour ton aide précieuse et pour la joie que tu apportes.
PS : mon agent va te contacter pour signer les papiers pour notre trio avec Coutinho.

Coutinho justement, aussi connue sous le nom de Nono ou encore Couty (normal c'est ton nom). Je te souhaite courage et réussite pour les trois (belles) années qui t'attendent. Je sais que tout ira pour le mieux pour toi, je t'ai vue à l'œuvre. Comme je l'expliquais précédemment à ta collègue Maman, tu recevras bientôt les papiers pour le trio. Tu n'as qu'à signer en bas des pages (pas la peine de tout lire c'est des formalités ennuyantes sur la répartition des royalties).

Merci à Lou-Anne (Louloutte), que j'ai pu encadrer durant son stage dans l'équipe ainsi qu'à son chat Tupac (je rigole rien qu'en l'écrivant). Je pense que nous avons tous les deux beaucoup appris pendant ces quelques semaines, mais il nous reste encore à confirmer le sens de l'expression « faire table rase du passé ». Je te souhaite bon courage pour ton M2 et au-delà, tu as toutes les qualités pour réussir.

En parlant de qualités pour réussir, merci à ce cher Teddy. Y'en a pas deux comme toi. Merci pour les bons moments passés et à venir, et évidemment bon courage dans la réalisation de tes projets (la science a besoin de ton énorme cerveau). Passe le bonjour à May ! Promis, on passe bientôt vous faire coucou à Orléans.

Joggito… Par où commencer. Déjà désolé pour ma sueur sur le siège passager de la BM, j'aime à penser que son odeur te rappelle le temps béni de la salle de Saint-Cyr à chaque trajet. J'ai une pensée émue en me rappelant cette ère, on était vraiment les protagonistes de cet endroit… Merci pour tous ces fous rires, notamment dans l'ascenseur à Belfast, c'était vraiment le pic de l'humour. Je pense que la Pouletologie est fort bien représentée avec une ambassadrice telle que toi. Dire que tout aurait pu prendre fin sur une voie de bus… Merci pour tout et bon courage pour la suite !

Lolo… aaahh Lolo… le bureau n'est plus le même depuis ton départ. D'ailleurs jusqu'à présent personne ne s'est installé à ta place. J'ai beaucoup apprécié nos longs débats, nous n'étions pas très souvent d'accord mais il y avait toujours de l'écoute et ça c'est très appréciable. J'ai d'ailleurs changé d'avis sur quelques sujets (oui oui !), nous serions peut-être d'accord aujourd'hui qui sait ! Je suis très heureux de voir que tu as trouvé ta voie professionnelle et de voir que tu es heureuse dans ce que tu fais. Au plaisir de te revoir très bientôt.

Merci aussi à Wijden, tu es l'incarnation de la gentillesse, en plus d'être une excellente cuisinière. J'espère que tu deviendras très très riche grâce à ta plante aux mille vertus. Bon courage pour la fin de ta thèse qui est aussi très proche. Hâte de venir te voir la défendre en Tunisie.

Special thanks to you Dominique, and congratulations for winning the Western Blot award of 2024. Thank you for the good times we all had together, I can't wait to discover another country with you and Mattu.
PS : I promise we will come to see you in Poland and discover the local biodiversity, such as the famous *Bobr K*.

Merci Max, pour tous ces moments passés ensemble. Merci également pour tous tes conseils, tu m'as beaucoup appris, tant sur le plan professionnel que personnel. J'ai également passé de très bons moments avec tes collègues du SYSAAF, que ce soit à Rennes ou à Lyon (il n'était cependant pas nécessaire de leur parler du chihuahua).

Messieurs mesdames les Canadiens. Comme je ne sais pas par qui commencer je vais faire dans l'ordre des départs.
Merci à toi Paulette, ta personnalité manque beaucoup à l'équipe depuis ton départ au Canada. D'ailleurs c'est finalement à Belfast et à Édimbourg qu'on aura vraiment appris à se connaître… comme quoi ! Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse que je sais très proche et pour la suite de ta carrière scientifique.

Dr Pierre-Marie Chevillard. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, tu es devenu mon frérot dès le jour 1. Merci pour les Lundis du Seigneur, pour les soirées, les vacances, pour les discussions scientifiques, pour les PR à la salle, bref… Merci pour tout le S. Je te souhaite de continuer de tout déchirer au Canada.

Antho, mon mentor et ami. J'espère rendre honneur à tes enseignements dans ce document. Si j'énumère toutes les raisons pour lesquelles je te remercie, je vais avoir besoin de 300 pages de plus. Je me dois quand même de te remercier pour les soirées à la Gaub', pour tes

encouragements, tes conseils etc. Tu es quelqu'un de très inspirant et je suis fier de voir ce que tu fais au Canada. Évidemment, je remercie également mister Oliv, avec qui il me tarde de pouvoir débattre à nouveau. Tu as toujours été à l'écoute. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance, j'espère que tu te plais chez les Canadiens.

Guillaume, Gui, Mr Bourdon ou encore Le Bourd's. Tu as toujours été là quand j'avais besoin de toi. Je sais que je pourrai toujours compter sur toi et j'espère que tu sais que tu pourras toujours compter sur moi. T'es vraiment le sang de la veine comme on dit. Merci pour les pas de danse, merci pour les matchs de foot, merci pour les discussions politiques, pour ton riz au curry… Merci pour tout frérot.

J'enchaîne avec Maugri. Team 98. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance au quotidien. Il me manque le temps où on faisait notre fameux check dans les couloirs de l'INRAe. Merci aussi pour toutes les fois où j'ai squatté ton canapé jusqu'à pas d'heure à me régaler de délicieux fast-foods. Passe le bonjour au Colonel Minou de ma part. J'ai hâte de tous passer vous voir au Canada très bientôt.

Il va sans dire que je te remercie Ina. Cela ne doit pas être facile de me supporter au quotidien. Tu fais énormément pour moi tous les jours. Merci pour ton support et tes encouragements. Merci de croire en moi plus que moi-même et d'ouvrir mes horizons. Toutes ces choses font que tu m'aides à avancer, alors merci pour tout.

Pour finir, je remercie ma famille pour leur soutien et pour tout ce qu'ils font chaque jour pour moi. Merci, Cédric. Ton accompagnement au quotidien m'a donné la force d'aller au bout de cette œuvre. Pour la gloire de Rome. Merci à Papa et Maman, il est clair que sans votre éducation je ne serais pas là où je suis aujourd'hui. J'espère vous rendre fiers. Merci aussi à Taïs, pour ton soutien et ta gentillesse. Merci de veiller sur les parents en mon absence. Bravo pour ton courage et ta ténacité dans les études. Ta réussite est pour moi une grande source d'inspiration.

Table des matières

REMERCIEMENTS 4

LISTE DES ABREVIATIONS 14

LISTE DES FIGURES 20

LISTE DES TABLEAUX 27

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 29

INTRODUCTION 32

I. L'INTENSIFICATION DES PRATIQUES AGRICOLES ET LE DECLIN DES POPULATIONS D'OISEAUX 32

1. LA 6EME EXTINCTION DE MASSE 32

2. LE DECLIN DES OISEAUX 33

3. LE ROLE DES PESTICIDES 34

II. LES HERBICIDES A BASE DE GLYPHOSATE 36

1. LE GLYPHOSATE 36

2. LA REGLEMENTATION EN VIGUEUR SUR L'UTILISATION DU GLYPHOSATE 37

i. L'approbation de la substance 37

ii. Les seuils règlementaires 39

3. LES HERBICIDES A BASE DE GLYPHOSATE 41

III. CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE ET ALIMENTAIRE AU GLYPHOSATE 42

1. EXPOSITION ENVIRONNEMENTALE AU GLYPHOSATE 42

i. Dans les sols 42

ii. Dans l'eau 43

iii. Dans l'air 44

iv. Dans la nourriture 44

2. EFFETS CONNUS DES HERBICIDES A BASE DE GLYPHOSATE 45

i. Sur la reproduction des mammifères 45

ii. Les GBH, perturbateurs endocriniens ? 47

iii. Sur le métabolisme des mammifères 51

iv. Sur la reproduction et le métabolisme des oiseaux 54

3. TOXICOCINETIQUE DU GLYPHOSATE 56

i. Absorption 57

ii. Distribution 57

iii. Biotransformation 59

a. Les cytochromes P450 60

b. Les Glutathion S-Transférases (GST) 61

c. Autres enzymes 62
d. Biotransformation, ce que l'on sait dans le cas du glyphosate 62
iv. Élimination 63
IV. PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : LA POULE 63
1. UN MODELE D'ETUDE TOXICOLOGIQUE 63
2. LE SYSTEME REPRODUCTEUR 64
i. L'ovaire de poule 64
ii. Le contrôle endocrinien de la reproduction 66
iii. L'ovulation 69
iv. L'oviducte et la formation de l'œuf 69
v. Le cycle de ponte 72
vi. Le développement embryonnaire 72
3. LE SYSTEME DIGESTIF 75
i. Description 75
ii. Le microbiote 76
a. La variabilité temporelle 77
b. La variabilité spatiale 77
c. Le microbiote caecal 78
d. Les fonctions du microbiote 79
OBJECTIFS DE LA THESE 82
MATERIEL ET METHODES 83
I. CONSIDERATIONS ETHIQUES 83
II. HERBICIDE A BASE DE GLYPHOSATE UTILISE 83
III. TECHNIQUES DE LABORATOIRE 85
1. DOSAGE DU GLYPHOSATE ET DE L'AMPA PLASMATIQUES 85
2. THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS) ASSAY DANS LE PLASMA SANGUIN 85
3. DOSAGES DES LIPIDES ET DE L'ACIDE URIQUE DANS LE PLASMA SANGUIN 85
4. MESURE DES NIVEAUX D'EXPRESSIONS DE TRANSCRITS (QPCR) 86
i. Extraction des ARN totaux 86
ii. Rétrotranscription 86
iii. Quantitative Polymerisation Chain Reaction (qPCR) 86
5. MESURE DES NIVEAUX D'EXPRESSIONS PROTEIQUES (WESTERN BLOT) 90
6. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE *IN VITRO* 92
7. MESURE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE *IN VITRO* 92
8. DOSAGE DE LA PROGESTERONE 92

9. Dosage de la chemerine plasmatique 93
IV. Protocole Toxicocinetique - Determination de parametres toxicocinetiques chez la poule adulte a la suite d'une exposition alimentaire aigue 94
V. Protocole Adulte - Étude de l'impact d'un herbicide a base de glyphosate chez la poule de chair adulte 95
1. Metabolisme et microbiote caecal 95
2. Reproduction et descendance 98
VI. Protocole Poules en Croissance - Étude de l'impact d'un herbicide a base de glyphosate chez la poule de chair en croissance 101
VII. Étude de l'impact *in ovo* du GBH 104
1. Injections *in ovo* 104
2. CAM assay 105
VIII. Étude de l'impact du GBH sur des cultures primaires de cellules de la granulosa 107
IX. Étude de l'effet du GBH sur la sensibilite de deux modeles cellulaires aux infections par la salmonelle 109
1. Mesure de la croissance de Salmonella en presence de GBH 110
2. Mesure de la viabilite et de la proliferation cellulaire 110
3. Tests bacteriologiques 110
i. Adhésion 111
ii. Invasion 111
iii. Multiplication 112
iv. Inoculum 112
v. Comptage des colonies bactériennes 112
4. Marquage a l'huile rouge des cellules LMH 113
X. Analyses statistiques 114
RESULTATS ET DISCUSSION 115
I. Cinetique du glyphosate et de l'AMPA 115
1. Determination des parametres toxicocinetiques du glyphosate et de l'AMPA a la suite d'une exposition alimentaire aiguë au GBH (Freville et al., 2023) 115
i. Résultats 115
ii. Conclusion 118
2. Accumulation plasmatique et tissulaire du glyphosate et de l'AMPA 119
i. Poules adulte s(Fréville et al., 2022) 119
ii. Poule en croissance (Fréville et al., 2024a) 123
iii. Conclusion 124

3. BIOTRANSFORMATION HEPATIQUE DU GBH 125
i. Poules adultes (Fréville et al., 2022) 125
ii. Poules en croissance (Fréville et al., 2024) 127
iii. Conclusion 127
II. IMPACT DU GBH SUR LE METABOLISME DES POULES 129
1. POULES ADULTES (FREVILLE ET AL., 2022) 129
2. POULES EN CROISSANCE (FREVILLE ET AL., 2024) 131
3. IMPACT DU GBH SUR LE MICROBIOTE CAECAL CHEZ L'ADULTE 134
i. Diversité bactérienne 136
ii. Production de SCFA 139
iii. Autres effets 140
4. CONCLUSION 141
III. IMPACT DU GBH SUR LA REPRODUCTION DES POULES ET SUR LE DEVELOPPEMENT DE LEUR DESCENDANCE 142
1. POULE ADULTE (ESTIENNE ET AL., 2022) 142
i. Accumulation du glyphosate dans les œufs et mortalité embryonnaire 142
2. POULE EN CROISSANCE (FREVILLE ET AL., 2024A) 144
3. LES GBH, PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CHEZ LA POULE ? 150
i. Synthèse de Pg par les cellules de la granulosa (Fréville et al., 2024b) 150
ii. Synthèse de Pg par les explants ovariens (Fréville et al., 2024a) 152
4. DEVELOPPEMENT DE LA DESCENDANCE 154
i. Suivis du développement embryonnaire des œufs GBH 154
ii. Impact in ovo du GBH 155
iii. Suivis du développement de la descendance Ex-GBH (Estienne et al., 2023) 157
5. CONCLUSION 163
RESULTATS D'OUVERTURE 164
OUVERTURE I. IMPACT DU GBH SUR LA REGULATION CENTRALE DE LA PRISE ALIMENTAIRE 165
OUVERTURE II. IMPACT DU GBH SUR L'EXPRESSION D'ADIPOKINES DANS LE TRACTUS DIGESTIF 168
OUVERTURE III. IMPACT DU GBH SUR L'IMMUNITE ET LA SENSIBILITE AUX INFECTIONS 170
6. POULES ADULTES 170
7. CAS D'UNE INFECTION A *SALMONELLA ENTERITIDIS* 171
i. Impact du GBH sur la croissance de Salmonella Enteritidis 172
ii. Impact du glyphosate sur l'infection des cellules LMH par Salmonella enteritidis 173
iii. Impact du glyphosate sur l'infection des cellules HD11 par Salmonella enteritidis 179
iv. Conclusion 180
BILAN DES RESULTATS 181

DISCUSSION GENERALE 184
CONCLUSION 204
BIBLIOGRAPHIE 205
PRINCIPAUX ARTICLES PUBLIES AU COURS DE LA THESE 222
I. FREVILLE ET AL., 2023 222
II. FREVILLE ET AL., 2022 223
III. FREVILLE ET AL., 2024A 224
IV. ESTIENNE ET AL., 2022 225
V. FRÉVILLE ET AL., 2024B 226
VI. ESTIENNE ET AL., 2023 227
AUTRES ARTICLES PUBLIES AU COURS DE LA THESE 228
I. SERRA ET AL., 2023 228
II. BERNARDI ET AL., 2024 229
RESUME 230
SUMMARY 232

Liste des abréviations

3β-HSD	3β-hydroxystéroïde déshydrogénase
ACTB	Actine Beta
AdipoQ	Adiponectine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AdipoR1	Récepteur 1 de l'adiponectine
AdipoR2	Récepteur 2 de l'adiponectine
AgRP	Agouti-related peptide
AhR	Récepteur d'aryl hydrocarbone
ALDEx2	Flavine adénine dinucléotide
ALP	Phosphatase Alcaline
ALT	Alanine Aminotransférase
AM	Noyau anteromédian
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
ANOVA	ANalyse Of VAriance
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APJ	Apelin receptor
APOA4	Apolipoprotéine A-IV
ARC	Noyau arqué
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
AST	Aspartate aminotransférase
ASTL	Métalloendopeptidase de type astacine
AUC	Aire sous la courbe
AUCinf	Aire sous la courbe extrapolée à l'infinie
BCA	Acide bicinchoninique
BRDU	Bromodésoxyuridine
BSEP	Pompe d'export des sels biliaires
CAM	Membrane chorioallantoïque
CAR	Récepteur antigénique chimérique
CCK8	Cell Counting Kit 8
CCRL2	Récepteur de type chimiokine C-C 2

CE	Carbohydrate estérase
Ces1	Carboxylestérase 1
CLt	Clairance totale
Cmax	Concentration maximale
CMKLR1	Récepteur de type chimiokine 1
COLEC12	Collectine 12
COX-2	Cyclooxygénase 2
Cq	Cycle de quantification
CRH	Hormone de libération de la corticotropine
CT	Contrôle
Ct	Cycle de seuil
CYP P450	Cytochrome P450
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DJA	Dose journalière admissible
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DO	Densité optique
DTI	Indice de toxicité dermique
Dx	Facteur de dilution 10^x
E	Efficacité de du couple d'amorce
E2	Estradiol
ECL	Électrochimiluminescence
ED	Développement embryonnaire
EDC	Perturbateur endocrinien
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EEF1α	Facteur d'élongation 1-alpha 1
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EGTA	Acide éthylène glycol-bis-(bêta-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétracétique
ELISA	Dosage immuno-enzymatique
ELOVL	Élongase des acides gras
EM	Éminence médiane
EPHX1	Époxyde Hydrolase 1
EPSPS	5-EnolylPyruvyl-Shikimate 3-Phosphate Synthase
ER	Récepteur des œstrogènes
EROD	Ethoxyrésorufine-O-dééthylase

F	Phénylalanine
F%	Biodisponibilité
F0	Première génération
FMOC-Cl	Chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBH	Herbicide à base de glyphosate
geom	Moyenne géométrique
GH	Glycoside hydrolase
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
gly eq	Équivalent glyphosate
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines
GPX1	Glutathione peroxidase 1
GST	Glutathion S-Transferase
HCl	Acide chlorhydrique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMGCR	Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase
HPG	Hypothalamo-Pituito-Gonadique
HSP	Protéine de choc thermique
IARC	Agence internationale de recherche sur le cancer
IFN	Interféron
IGF	Facteur de croissance de type insuline
IL	Interleukine
iNOS	Synthase d'oxyde nitrique inductible
INRAe	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
IP	Intrapéritonéale
IPA	Acide indolepropionique
IUCN	Union internationale pour la conservation de la nature
J	Jour
kg pc	kg de poids corporel
Kow	Coefficient de partage octanol/eau
LD50	Dose léthale 50
LDH	Lactates Déshydrogénases
LH	Hormone lutéinisante
LMH	Hépatome mâle de Leghorn

MCF-7	Fondation du cancer du Michigan - 7
MDA	Malondialdéhydes
MDR	Multi Drug Resistance
MPVE	Membrane périvitelline externe
MPVI	Membrane périvitelline interne
MRL	Limite maximale de résidu
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
mT	miliTesla
NF-κB	Facteur nucléaire-kappa B
NOAEL	Niveau sans effet indésirable observé
NPY	Neuropeptide Y
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P450scc	P450 side chain clivage
PAF	Paraformaldéhyde
PAL	Phénylalanine ammonia lyase
PBS	Tampon phosphate salin
PECMBS	Pan-European Common Bird Monitoring Scheme
PEP	Phosphoenol pyruvate
Pg	Progestérone
PGA5	Pepsine A-5
PGC	Progastricsine
PgP	Permeability-GlycoProteine
pH	Potentiel Hydrogène
PL	Polysaccharide lyase
PLIN1	Périlipine
PM10	Particule dont le diamètre est inférieur à 10 µm
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
POEA	Polyoxyéthylène amine
POMC	Proopiomélanocortine
PPAR	Récepteur activé par les prolifférateurs de peroxysomes
ppm	Parties par million
PTGES	Prostaglandin E Synthase
PVN	Noyau paraventriculaire
PXR	Récepteur de la pregnane X

PYY	Peptide YY
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
RARRES2	Répondeur 2 au récepteur de l'acide rétinoïque
RE	Éteint régionalement
REACH	Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques
RNAseq	Séquençage ARN
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Rétrotranscription
RT-MMLV	Transcriptase inverse (RT) du M-MLV (virus de la leucémie murine de Moloney)
S3P	Shikimate-3-phosphate
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
SCFA	Acide gras à chaîne courte
SDS	Laurylsulfate de sodium
SEM	Erreur standard de la moyenne
SL	Septum latéral
SLCO1B3	Membre de la famille des transporteurs d'anions organiques solubles 1B3
SOD	Superoxyde dismutase
spz	Spermatozoïde
StAR	Régulateur aigu de la stéroïdogenèse
SVF	Sérum de veau fétal
T	Testostérone
t.test	Test de Student
T1/2	Demi-vie
TAA	Tissu adipeux abdominal
Tas1r1	Récepteur de type 1 de la saveur 1
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
THRSP	Réponse à l'hormone thyroïdienne
TNF	Facteur de nécrose tumorale
Tris	Tampon trisaminométhane
TSB	Bouillon de soja trypticase
Tukey HSD	Différence significative honnête de Tukey
UGT	Glucuronosyltransférase
US-EPA	Agence de protection de l'environnement des États-Unis
VEGF	Facteur de croissance de l’endothélium vasculaire
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité

Vss	Volume à l'état d'équilibre
W	Tryptophane
Y	Tyrosine
γ-GT	Gamma-glutamyl transpeptidase

Liste des figures

Figure 1. Statut des oiseaux européens selon la liste rouge de l'IUCN (Adapté de European red list of birds 2021, 2022) 33
Figure 2. Évolution des effectifs de 168 espèces dans 30 pays européens entre 1980 et 2022 (adapté de PECBMS, 2024) 35
Figure 3. L'inhibition de la voie du Shikimate par le glyphosate (adapté de Schönbrunn et al., 2001). 36
Figure 4. Zones administratives européennes (Kudsk and Mathiassen, 2020). 39
Figure 5. Quelques NOAEL déterminées par l'EFSA. Les NOAEL des modèles porcins, bovins et ovins sont déterminées sur la base de celle du lapin. 40
Figure 6. Fréquence de détection du glyphosate et de l'AMPA (≥ 0,05 mg/kg) ainsi que les concentrations maximales respectives (mg/kg) dans les sols agricoles de l'UE (0–15/20 cm) par région NUTS 2, superposées aux cartes de perte de sol par érosion éolienne (Silva et al., 2018). 43
Figure 7. Illustration d'une courbe dose-réponse non monotonique (en bleu) et d'une courbe dose-réponse monotonique (en rouge). Adaptée de (Vandenberg et al., 2012). 47
Figure 8. Schéma représentant l'entrée d'un xénobiotique (X) dans une cellule hépatique, sa biotransformation puis sa sortie de la cellule pour élimination (adapté de Maïbèche, 2020). 60
Figure 9. Photo de la hiérarchie folliculaire (adapté de Briere et al., 2011). 64
Figure 10. Schéma du follicule ovarien de la poule (adapté de Bahr, 1991). 65
Figure 11. Axe HPG chez la poule. 67
Figure 12. Représentation schématique des étapes enzymatiques de la stéroïdogenèse (adapté de Fontaine, 2014). 68
Figure 13. Schéma représentant les compartiments du tractus reproducteur de la poule (adapté de Nys and Guyot, 2011). 70
Figure 14. Schéma représentant les compartiments du tractus reproducteur de la poule (adapté de Guérin et al., 2010). 71
Figure 15. Photo de l'embryon de poule à différents stades de développement (adapté de Bellairs and Osmond, 2005). 73

Figure 16. Les compartiments du tractus digestif de la poule. 75
Figure 17. Composition du microbiote dans le tractus digestif de la poule (adapté de Yeoman et al., 2012). 78
Figure 18. Protocole Adulte (adapté de Fréville et al., 2022). 95
Figure 19. Schéma de la procédure permettant d'évaluer la reproduction des animaux pendant le protocole adulte (adapté de Estienne et al., 2023). 98
Figure 20. Illustration de la technique de mirage. 99
Figure 21. Protocole Poules en Croissance (adapté de Fréville et al., 2024). 101
Figure 22. Protocole CAM assay. 105
Figure 23. Protocole des tests bactériologiques. 110
Figure 24. Concentration plasmatique de glyphosate (A) et d'AMPA (B) chez les poules après une exposition alimentaire aiguë au GBH (40 mg de glyphosate/kg pc ; n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM. 116
Figure 25. Stress oxydatif plasmatique évalué par la méthode TBARS dans le plasma sanguin des poules adultes pendant (J42, n=10)) et après (J70, n=10) l'exposition au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 120
Figure 26. Concentrations de glyphosate (A) et d'AMPA (B) dans les muscles des pattes, le foie et le tissu adipeux abdominal (TAA) des poules pendant (J42, n=10) et après (J70, n=10) l'exposition au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 121
Figure 27. Concentrations plasmatiques de glyphosate et d'AMPA chez les poules en croissances CT (n = 10), GBH- (n = 10) et GBH+ (n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 123
Figure 28. Stress oxydatif dans le plasma sanguin chez des poules en croissances CT (n = 10), GBH- (n = 10) et GBH+ (n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 123
Figure 29. Fréquence des coups de becs donnés à la mangeoire par les poules contrôles (CT, n = 45) et celles exposées au GBH (GBH, n = 45) pendant et après (Ex-CT, n = 45 ; Ex-GBH, n = 45) l'exposition au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 129
Figure 30. Gain de poids corporel (A) et épaisseur de la couche de gras abdominal (B) pendant l'exposition alimentaire au GBH (J0 à J42 ; CT, n = 75 ; GBH, n = 75) et après (J42 à J70 ; Ex-CT, n = 66 ; Ex-GBH, n = 66) l'exposition alimentaire au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 130

Figure 31. Concentration en triglycérides (A), cholestérol (B) et phospholipides (C) dans le plasma des poules adultes pendant l'exposition (à J0, J21 et J42). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 131
Figure 32. Pourcentage d'aliment consommé par les animaux des groupes CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 131
Figure 33. Quantité de glyphosate et d'AMPA ingérés par les animaux des groupes CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20) au cours du protocole. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 132
Figure 34. (A) Poids corporel (g) et (B) épaisseur de la couche de gras abdominal (mm) des animaux des groupes CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 133
Figure 35. Diversité α du microbiote dans les groupes CT+Ex-CT (n=12), GBH (n=9) et Ex-GBH (n=12) mesurée par les indices Chao (C), Shannon (D) et Faith (E)..... 136
Figure 36. Abondance relative des taxons différentiels dans le contenu caecal de poules exposées au GBH pendant 42 jours (GBH, n=9), exposées pendant 42 jours puis non exposées jusqu'au jour 70 (Ex-GBH, n=12) et contrôles aux jours 42 et 70 pris ensemble (CT + Ex-CT, n=10), identifiés de manière commune par les méthodes ALDEx2, DESeq2 et ANCOM-BC. Une barre entre deux groupes indique que l'abondance relative est significative entre ces deux groupes. Les taxons sont identifiés au niveau de l'ordre, de la famille et du genre. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± erreur standard de la moyenne (SEM). 137
Figure 37. Concentrations en SCFA totaux dans les contenus caecaux des animaux (µmol/g). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 141
Figure 38. Concentrations de glyphosate mesurées dans l'albumen de oeufs issus des animaux GBH (n=10) et Ex-GBH (n=10) au début du protocole (A) et après le retrait du produit (B). Concentration de glyphosate mesurée dans l'albumen et le vitellus des oeufs issus des animaux GBH, à J42 (C). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 142
Figure 39. Poids relatif du tissu adipeux abdominal (TAA), de l'ovaire et de la rate des poules présenté sous forme de ratio ramené au poids corporel des animaux (n=20 pour chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 144
Figure 40. (A) Les termes GO les plus enrichis chez les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de l'ovaire entre les animaux CT (n=5) et GBH+ (n=5), avec une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. (B) Réseau d'interaction génique des DEGs

dans l'ovaire des animaux CT (n=5) et GBH (n=5), où les nœuds et les arêtes représentent les associations entre gènes, avec les nœuds rouges et violets correspondant respectivement aux gènes up-régulés et down-régulés, et une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. 145
Figure 41. (A) Les termes GO les plus enrichis chez les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de l'ovaire entre les animaux CT (n=5) et GBH+ (n=5), avec une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. (B) Réseau d'interaction génique des DEGs dans l'ovaire des animaux CT (n=5) et GBH (n=5), où les nœuds et les arêtes représentent les associations entre gènes, avec les nœuds rouges et violets correspondant respectivement aux gènes up-régulés et down-régulés, et une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. 146
Figure 42. (A) Les termes GO les plus enrichis chez les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de l'ovaire entre les animaux CT (n=5) et GBH+ (n=5), avec une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. (B) Réseau d'interaction génique des DEGs dans l'ovaire des animaux CT (n=5) et GBH (n=5), où les nœuds et les arêtes représentent les associations entre gènes, avec les nœuds rouges et violets correspondant respectivement aux gènes up-régulés et down-régulés, et une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. 147
Figure 43. (A) Niveaux relatifs d'ARNm de facteurs stéroïdogènes dans les ovaires des animaux (n=8 dans chaque groupe). (B) Niveaux protéiques relatifs de facteurs stéroïdogènes dans les ovaires des animaux (n=6 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 148
Figure 44. Viabilité et prolifération des cellules de la granulosa primaires issues de follicules F1 (A et C) et de follicules F3 et F4 (B et C) en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=4, N=4) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 150
Figure 45. Concentration en Pg (ng/mL) dans le milieu de culture des cellules de la granulosa primaires issues de follicules F1 et de follicules F3 et F4 en présence de concentrations croissantes de GBH (A et B), avec ou sans ajout de LH et FSH (10^{-8} M) dans le milieu de culture (n=4 par groupe) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 151

Figure 46. Concentration en Pg (A) et E2 (B) (ng/mL) dans le milieu de culture des explants ovariens en présences de concentrations croissantes de GBH pendant 24h (n=4). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 152
Figure 47. (A) Niveaux relatifs d'ARNm de facteurs stéroïdogènes dans les explants ovariens exposés à des doses croissantes de GBH pendant 24h (n=4 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 152
Figure 48. Poids relatif du coeur des embryons (ng gly eq/g d'oeuf) (n=12 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 156
Figure 49. Viabilité (A) et prolifération (B) des cellules primaires cardiaques après 24h d'exposition à des doses croissantes de GBH (n=4 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 156
Figure 50. Aire vascularisée sur la CAM après 72h d'exposition au GBH (CT, n=18; VEGF, n=7, 1,8 mg gly eq/L, n=23; 18 mg gly eq/L, n=26; 180 mg gly eq/L, n=26). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 157
Figure 51. Mesures lipidomiques dans le tissu adipeux abdominal des poussins au jour 5 de vie. La quantité de plusieurs lipides (mg/mg de tissu adipeux) a été déterminée et les résultats pour ceux présentant des différences significatives entre Ex-CT (n = 5) et Ex-GBH (n = 5)..Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 160
Figure 52. (A) Prédiction des niveaux d'expression des enzymes des voies de synthèse des lipides. L'analyse bio-informatique et la représentation graphique des résultats ont été réalisées grâce au programme open source LIPIDMAP (https://lipidmaps.org/biopan). La figure est présentée sous forme de comparaison des données Ex-CT vs Ex-GBH. Les gènes identifiés comme up-régulés sont représentés en bleu et les gènes que la prédiction a identifié comme down-régulés sont représentés en jaune. (B) Niveau relatif des transcrits des enzymes impliquées dans les voies lipidomiques identifiées (Ex-CT, n = 10 et Ex-GBH, n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 161
Figure 53. Niveaux relatifs d'ARNm du système chémérine et de FASN dans le foie des poussins issus des œufs Ex-GBH (n=10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 162
Figure 54. Concentrations de chémérine dans les plasmas des animaux du protocole Poules en Croissance à J1, J9 et J25. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. ... 165

Figure 55. Détection immunohistochimique de la chémérine dans (1.) le septum latéral, (2.) le noyau paraventriculaire, (3.) le noyau anteromédiant et (4.) l'éminence médiane de l'hypothalamus des animaux CT. 166
Figure 56. Détection immunohistochimique de la chémérine (A) et de CMKLR1 (B) dans l'éminence médiane de l'hypothalamus des animaux CT, GBH- et GBH+ (n=3 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 167
Figure 57. Niveaux relatifs de transcrits d'adipokines dans le tractus digestif des animaux en CT, GBH- et GBH+ (n=8 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 169
Figure 58. Croissance de *Samonella* Enteritidis en présence de doses croissantes de GBH (n=3 pour chaque concentration). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 173
Figure 59. Viabilité (A) et prolifération (B) des cellules de la lignée LMH en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=3 pour chaque concentration) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 174
Figure 60. Adhésion (A), invasion (B) et multiplication (C) des bactéries *Salmonella* Enteritidis dans les cellules de la lignée LMH en présence de conentrations croissantes de GBH (n=4 pour chaque concentration). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 174
Figure 61. Niveaux relatifs d'ARNm de facteurs lipogèniques dans les cellules de lignée LMH exposées à des doses croissantes de GBH pendant 24h (n=9 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 175
Figure 62. Observation au microscope optique de cellules LMH exposées aux dilutions D3, D4, D8 ainsi qu'au CT pendant 0, 24, 48 et 72h. 176
Figure 63. Observation au microscope optique de cellules LMH marquées à l'huile rouge et exposées aux dilutions D3, D4, D8 ainsi qu'au CT pendant 0, 24, 48 et 72h. 176
Figure 64. Intensité du marquage à l'huile rouge dans les cellules LMH exposées aux dilutions D3, D4, D8 ainsi qu'au CT pendant 24h (n=6 dans chaque groupe). 177
Figure 65. Viabilité des cellules de la lignée LMH en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=3 pour chaque concentration) pendant 24h (A), 48h (B) et 72h (C). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 177

Figure 66. Viabilité (A) et prolifération (B) des cellules de la lignée HD11 en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=3 pour chaque concentration) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 179
Figure 67. Adhésion (A), invasion (B) et multiplication (C) des bactéries *Salmonella* Enteritidis dans les cellules de la lignée HD11 en présence de concentrations croissantes de GBH (n=4 pour chaque concentration). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 179
Figure 68. Niveaux relatifs d'ARNm de gènes liés à l'immunité dans les cellules de lignée HD11 exposées à des doses croissantes de GBH pendant 24h (n=9 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 180
Figure 69. Schéma bilan des expériences menées durant la thèse..... 181
Figure 70. Impact (simplifié) de l'introduction environnementale d'un GBH sur un réseau trophique (adapté de Saaristo et al., 2018) 197

Liste des tableaux

Tableau 1. Effets des GBH sur la reproduction des mammifères 50
Tableau 2. Effets des GBH sur le métabolisme des mammifères 52
Tableau 3. Paramètres toxicocinétiques couramment déterminés dans les études de toxicocinétique..... 59
Tableau 4. Principales bactéries productrices de SCFA (adapté de Blaak et al., 2020) 80
Tableau 5. Composition de la nourriture des animaux. 84
Tableau 7. Séquences des amorces qPCR. 89
Tableau 8. Composition des tampons utilisés pour les analyses Western-Blot. 91
Tableau 9. Anticorps utilisés pour les analyses Western blot 92
Tableau 6. Concentrations de GBH utilisées pour les tests bactériologiques. 109
Tableau 10. Analyse non compartimentale des concentrations plasmatiques de glyphosate et d'AMPA après une exposition alimentaire aiguë au GBH (40 mg/kg pc) chez 10 poules pondeuses..... 117
Tableau 11. Concentrations de glyphosate et d'AMPA dans le plasma des poules pendant (n=10) et après (n=10) la période d'exposition alimentaire au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes..... 119
Tableau 12. Expression relative de l'ARNm de différents gènes dans les organes des poules à la fin de l'exposition alimentaire au GBH (J42, CT, n = 9 et GBH, n = 9) et après exposition alimentaire au GBH (J70, Ex-CT, n = 12 et Ex-GBH, n = 12 poules). 125
Tableau 13. Expression relative de transcrits codant pour des enzymes de la biotransformation hépatique dans les foies de poules en croissance (CT, n = 11, GBH-, n = 13, GBH+, n = 16). 127
Tableau 14. Concentration de cholestérol, de triglycérides et de phospholipides dans le plasma des animaux CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 133
Tableau 15. Concentration des acides gras à chaîne courte dans le contenu caecal (µmol/g) pendant l'exposition alimentaire au GBH (GBH, J42, n=8) chez les poules contrôles (CT, n=8) et après l'exposition alimentaire au GBH (Ex-CT, J70, n=12 et Ex-GBH, n=11). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes. 140

Tableau 16. Pourcentage d'œufs fertiles et mortalités embryonnaires précoces et tardives des œufs issus des animaux CT (n=478), GBH (n=477), Ex-CT (n=369) et Ex-GBH (n=367). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 143
Tableau 17. Poids des organes des embryons des œufs issus des animaux CT (n=20) et GBH (n=20) à ED15 et ED21. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 154
Tableau 18. Paramètres obtenus à la suite de l'Open-field test. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 157
Tableau 19. Poids des poussins issus des poules des groupes Ex-CT (n=213) et Ex-GBH (n=186) 0, 5 et 10 jours après l'éclosion. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 158
Tableau 20. Ratio poids organe/poids corporel des poussins issus des poules Ex-CT et Ex-GBH 0, 5 et 10 jours après l'éclosion. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. 159
Tableau 21. Niveaux relatifs d'ARNm de divers gènes liés à l'immunité dans les gésiers, caeca et rates des animaux du Protocole Adulte pendant l'exposition (J42, n=9 dans chaque groupe) et après l'exposition (J70, n=12 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM..... 170

Liste des publications et communications

Articles originaux

Mathias Fréville, Ophélie Bernardi, Christelle Ramé, Pascal Froment, Joëlle Dupont, Vitamin E alleviates Glyphosate-based herbicide-induced progesterone secretion inhibition and oxidative stress increase in chicken primary granulosa cells, Poultry Science, 2024, 104194, ISSN 0032-5791, https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104194.

Mathias Fréville, Jean-Philippe Dubois, Martine Batailler, Christelle Ramé, Patrice Ganier, Marie Chahnamian, Pascal Froment, Martine Migaud and Joëlle Dupont. Expression of Chemerin in chicken brain: effect of a chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide. **En soumission.**

Estienne, A., **Fréville, M.**, Bourdon, G., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., et al. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. Ecotoxicology and Environmental Safety 241, 113741. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113741.

Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Chahnamian, M., Staub, C., et al. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. Front. Physiol. 13, 974688. doi: 10.3389/fphys.2022.974688.

Estienne, A., **Fréville, M.**, Bernardi, O., Ramé, C., Calandreau, L., Cornilleau, F., et al. (2023). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide in broiler hens has long-term impacts on the progeny metabolism. *Poultry Science*, 102877. doi: 10.1016/j.psj.2023.102877

Serra, L., Bourdon, G., Estienne, A., **Fréville, M.,** Ramé, C., Chevaleyre, C., et al. (2023). Triazole pesticides exposure impaired steroidogenesis associated to an increase in AHR and CAR expression in testis and altered sperm parameters in chicken. Toxicology Reports 10, 409–427. doi: 10.1016/j.toxrep.2023.03.005

Fréville, M., Henri, J., Estienne, A., Serra, L., Ramé, C., Ganier, P., et al. (2023). Determination of the elimination half-life of Glyphosate and its main metabolite, AMPA, in chicken plasma. *Toxicology Letters* 389, 19–25. doi: 10.1016/j.toxlet.2023.10.009

Bernardi, O., **Fréville, M.**, Ramé, C., Reverchon, M., and Dupont, J. (2024). Chemerin concentration in egg white in layer and broiler hens during the laying period for 2 successive generations. *Poultry Science* 103, 103342. doi: 10.1016/j.psj.2023.103342

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, B. Piégu, M. Chahnamian, P. Froment, and J. Dupont. 2024. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide alters ovarian functions in young female broilers. Poultry Science:103767.

Communications orales

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont “Effect of chronic exposure to a glyphosate-based herbicide on fertility, growth and fattening of the progeny in broiler hens”. IATDMC, Prague, République tchèque (2022).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Christelle Ramé, Gaëlle Lefort, Marine Chahnamian, Christophe Staub, Eric Venturi, Christine Leterrier, Julie Lemarchand, Elise Maximin, Véronique Douard, Olivier Zemb, Pascal Froment, et Joëlle Dupont « Exposition alimentaire à un herbicide à base de glyphosate, effets et réversibilité chez les poules reproductrices ». BioTechnoCentre, Nouan-le-Fuselier, France (2022).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Christelle Ramé, Gaëlle Lefort, Marine Chahnamian, Christophe Staub, Eric Venturi, Christine Leterrier, Julie Lemarchand, Elise Maximin, Véronique Douard, Olivier Zemb, Pascal Froment, et Joëlle Dupont. « Exposition alimentaire à un herbicide à base de glyphosate, effets et réversibilité chez les poules reproductrices ». Journées techniques interfilières du SYSAAF, Rennes, France (2022).

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, B. Piégu, M. Chahnamian, P. Froment, and J. Dupont “Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide in young broiler hen increases ovary weight and modulates ovarian transcriptome”. Fertility, Belfast, Irlande du Nord (2023).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont « May antioxidants reduce glyphosate-based herbicides adverse effects on chicken embryo development? ». Fertility, Belfast, Irlande du Nord (2023).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont « Les herbicides à base de glyphosate, une menace pour le développement embryonnaire chez la poule ? ». BioTechnoCentre, Nouan-le-Fuselier, France (2023).

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé and J. Dupont “Characterization of adipokines distribution in hens digestive tract”. French-Polish Symposium, Paris, France (2023).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont « May antioxidants reduce glyphosate-based herbicides adverse effects on chicken embryo development? ». Fertility, Édimbourg, Ecosse (2024).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont “Glyphosate-based herbicides, a threat to avian biodiversity?” HEALTH & ENVIRONMENT 2024 (SUEZ), Cannes, France (2024)

Posters

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Christelle Ramé, Gaëlle Lefort, Marine Chahnamian, Christophe Staub, Eric Venturi, Christine Leterrier, Julie Lemarchand, Elise Maximin, Véronique Douard, Olivier Zemb, Pascal Froment, et Joëlle Dupont. « Dietary exposure to a glyphosate-based herbicide, effects and reversibility in breeding hens ». ISAE, Édimbourg, Ecosse (2022).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Christelle Ramé, Gaëlle Lefort, Marine Chahnamian, Christophe Staub, Eric Venturi, Christine Leterrier, Julie Lemarchand, Elise Maximin, Véronique Douard, Olivier Zemb, Pascal Froment, et Joëlle Dupont « Exposition alimentaire à un herbicide à base de glyphosate, effets et réversibilité chez les poules reproductrices ». BioTechnoCentre, Nouan-le-Fuselier, France (2022).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont « Les herbicides à base de glyphosate, une menace pour le développement embryonnaire chez la poule ? ». BioTechnoCentre, Nouan-le-Fuselier, France (2023).

Communications au sein de l'organisme d'accueil

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Christelle Ramé, Gaëlle Lefort, Marine Chahnamian, Christophe Staub, Eric Venturi, Christine Leterrier, Julie Lemarchand, Elise Maximin, Véronique Douard, Olivier Zemb, Pascal Froment, et Joëlle Dupont « Exposition alimentaire à un herbicide à base de glyphosate, effets et réversibilité chez les poules reproductrices ». Journées Thésards de la PRC, Nouzilly, France (2022).

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, B. Piégu, M. Chahnamian, P. Froment, et J. Dupont « Effet d'une exposition à un herbicide à base de glyphosate sur le métabolisme et les fonctions ovariennes ». Journées Thésards de la PRC, Nouzilly, France (2023).

Mathias Fréville, Anthony Estienne, Joëlle Dupont "Glyphosate-based herbicides, a threat to embryo develoment in hens?" Journées Thésards de la PRC, Nouzilly, France (2024).

Introduction

I. L'intensification des pratiques agricoles et le déclin des populations d'oiseaux

1. La 6ème extinction de masse

En 1992, 1700 scientifiques du monde entier signent une tribune pour alerter de la menace que les activités humaines font peser sur l'environnement (Union of Concerned Scientists, 1992). L'objectif est de porter à l'attention des populations et des dirigeants le message suivant : l'atmosphère, les sols et les océans subissent des pressions, pour beaucoup d'origine anthropique, qui font peser de grands risques sur l'humanité et sur la biodiversité. Ces pressions, ou menaces pour la planète, entrainent le déclin de milliers d'espèces animales et végétales, voire leur extinction. La liste rouge de l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN) répertorie aujourd'hui plus de 44 000 espèces menacées d'extinction, plus de 28% des espèces recensées (UICN, 2024). Les espèces animales les plus menacées sont les amphibiens et le groupe des requins et raies, qui sont respectivement 41% et 37% à être menacés d'extinction (UICN, 2024). Pour information, l'IUCN établit des catégories permettant, selon des critères précis, de définir le degré de menace qui pèse sur chaque espèce évaluée. Une espèce peut alors, selon la taille de ses effectifs et sa répartition géographique (entre autres), entrer dans l'une des catégories suivantes :

- Préoccupation mineure (LC)
- Quasi menacée (NT)
- Vulnérable (VU)
- En danger (EN)
- En danger critique (CR)
- Éteinte à l'état sauvage (EW)
- Éteinte (EX)

Catégories et critères de la Liste rouge de l'UICN : version 3.1 (2012)

On dénombre ainsi plus de 200 espèces de vertébrés éteintes durant les 100 dernières années (Ceballos et al., 2017). Beaucoup d'auteurs parlent de « 6ème extinction de masse » pour décrire ce phénomène. Ce chiffre peut pourtant sembler relativement faible comparé aux

milliers d'espèces connues à ce jour, et devant l'ampleur des extinctions de masse passées, qui avaient conduit la quasi-totalité des espèces vivantes à disparaître. Cependant, cette « 6ème extinction de masse » se distingue par la vitesse à laquelle ces 200 espèces de vertébrés se sont éteintes. À titre de comparaison, il aurait fallu 10 millénaires pour atteindre ce même nombre d'extinction si nous étions traversés par une période d'extinction comparable aux dernières que la Terre a connu (Ceballos et al., 2017).

2. Le déclin des oiseaux

Le sort des oiseaux est particulièrement préoccupant. Douze pour cent d'entre eux sont placés sur la liste rouge de l'IUCN, en 2024 (IUCN). Certaines projections prévoient que d'ici 2100, 6 à 14% des espèces d'oiseaux seront éteintes, avec de nombreuses conséquences écosystémiques (Şekercioğlu et al., 2004).

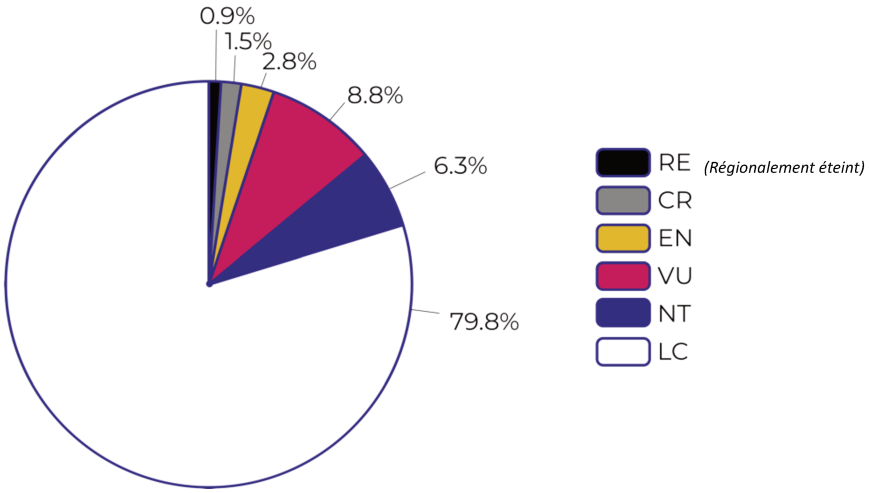


Figure 1. Statut des oiseaux européens selon la liste rouge de l'IUCN (Adapté de European red list of birds 2021, 2022)

Cette problématique suscite un intérêt particulier en Europe, où de récentes études dressent le constat de la chute rapide de l'abondance de plusieurs espèces d'oiseaux, en interrogeant les causes et les conséquences d'un tel déclin. Ce dernier est loin d'être homogène ; ni dans l'espace, puisque sont principalement touchés les oiseaux vivant dans ou aux abords de zones agricoles, dont le nombre a chuté de deux tiers en 30 ans ; ni entre les espèces, puisque leurs sorts diffèrent qu'elles soient communes ou rares, spécialistes ou généralistes etc. En effet, les travaux de Inger et al., 2015 montrent qu'entre 1980 et 2009, le déclin des oiseaux est principalement dû à la chute des effectifs d'un petit nombre d'espèces d'oiseaux communs,

alors que des espèces d'oiseaux plus rares observent des réductions d'effectif plus modérées. Les travaux de Burns et al., 2021 font ce même constat qu'un petit nombre d'espèces contribue grandement au déclin global des oiseaux d'Europe. Parmi les 175 espèces considérées en déclin par les auteurs, 8 sont responsables de 69% de ce déclin, et 27% est attribuable à une seule espèce à savoir le moineau commun *Passer domesticus* (Burns et al., 2021). Au bilan, Burns et al., 2021 chiffrent la perte d'abondance des oiseaux à un peu moins de 20% depuis 1980, soit une perte de 560 à 620 millions d'individus à l'échelle européenne.

La mise en place dès les années 90 de programmes de protections des espèces d'oiseaux rares aurait cependant permis d'augmenter considérablement certains de leurs effectifs et aurait donc ralenti le déclin global des espèces d'oiseaux (Inger et al., 2015). En Europe, la Directive Oiseau (ou directive 2009/147/CE) impose aux états membres de prendre « toutes les mesures nécessaires pour maintenir ou adapter la population de toutes les espèces d'oiseaux […] ». En l'absence de telles mesures, les espèces d'oiseaux spécialistes sont d'ordinaire bien plus sujettes à l'extinction que les espèces plus généralistes. Avec elles, ce sont également les services écosystémiques qu'elles rendent qui sont perdus. La probabilité qu'une espèce généraliste compense cette perte est d'autant plus faible que l'oiseau éteint rendait un service unique d'un point de vu évolutif (Şekercioğlu et al., 2004). Ces travaux soulèvent donc d'importants questionnements éthiques dans la manière dont sont élaborés les programmes de conservation d'espèces. Est-il préférable de concentrer les efforts de conservation sur des espèces communes, rares, d'intérêt patrimonial, écosystémique ou encore clés de voute (Sarrazin, 2012; Vucetich et al., 2017)?

3. Le rôle des pesticides

Étonnamment, le dérèglement climatique, bien que le plus notoire, n'est pas la plus grande menace pour la biodiversité. Les principales menaces sont (1) la surexploitation des ressources naturelles (déboisement, chasse, pêche etc.), (2) les activités agricoles, et (3) l'urbanisation (Maxwell et al., 2016). Ces activités entrainent la fragmentation voire la perte des habitats pour les espèces vivant ou transitant par les zones concernées, ainsi que l'introduction de pollutions de diverses natures dans ces mêmes habitats (Ceballos et al., 2017). En Europe, les activités agricoles sont un important facteur de déclin pour les populations d'oiseaux sauvages. Les travaux de Rigal et al., 2023 montrent que le déclin des espèces d'oiseaux communs que

nous mentionnions précédemment n'est pas distribué de manière homogène entre les groupes d'espèces, et que sont majoritairement touchées les populations vivant dans les milieux agricoles. Ce constat est également dressé par le Programme paneuropéen de surveillance des oiseaux communs (PECBMS, de l'anglais Pan-European Common Bird Monitoring Scheme), un projet visant utiliser les oiseaux communs comme indicateurs de l'état général de la nature (**Figure 2**, PECBMS, 2024).

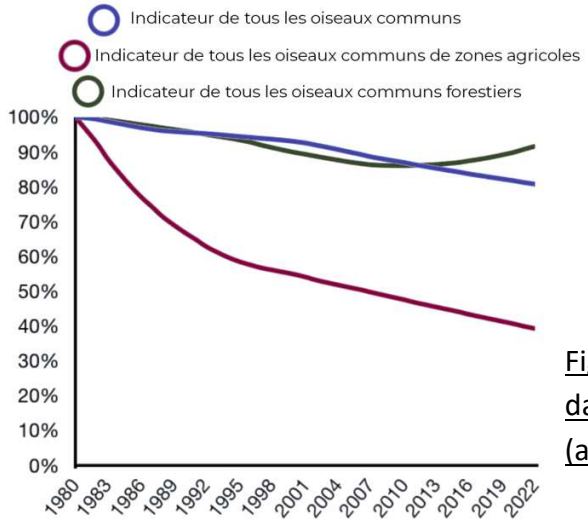


Figure 2. Évolution des effectifs de 168 espèces dans 30 pays européens entre 1980 et 2022 (adapté de PECBMS, 2024)

Le programme cite des exemples concrets, tels que le *Sturnus vulgaris* (étourneau sansonnet) et le *Passer montanus* (moineau friquet), dont les populations ont diminué de 60 % en raison de l'intensification des pratiques agricoles. Ces déclins sont attribués à l'usage accru de pesticides, à la réduction des habitats naturels et à l'agriculture intensive qui affecte directement la disponibilité des ressources alimentaires et des sites de nidification pour ces espèces (PECBMS, 2024). Les travaux de Rigal et al., 2023 désignent eux aussi l'utilisation de pesticides comme principale cause du déclin des oiseaux des zones agricoles, devant l'urbanisation et les changements de températures (Rigal et al., 2023). Chaque pesticide peut avoir des effets délétères propres à sa/ses molécules actives et aux autres substances contenues dans sa formulation. Cependant, il est connu que beaucoup de pesticides agissent sur la disponibilité des ressources alimentaires, notamment sur les invertébrés dont se nourrissent les oiseaux, ainsi que sur leurs habitats (Gill et al., 2018; Rigal et al., 2023). Il paraît donc nécessaire d'évaluer l'impact des produits les plus utilisés en agriculture afin d'établir la

part de déclin populationnel qui leur est imputable et d'établir des stratégies permettant de mitiger leurs potentiels effets délétères.

II. Les herbicides à base de glyphosate

1. Le glyphosate

Le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé en agriculture dans le monde. Il s'agit d'un herbicide non sélectif à large spectre qui doit sa popularité à sa grande efficacité ainsi qu'à sa présumée innocuité pour l'Homme et les animaux. Il est également qualifié de foliaire et de systémique, c'est à dire qu'il pénètre dans les végétaux par leurs feuilles pour être ensuite distribué dans tous leurs organes (BAYER, 2024).

A la différence d'autres pesticides organophosphorés, le glyphosate n'est pas un inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Le pouvoir herbicide du glyphosate lui est conféré par sa capacité à inhiber une réaction enzymatique catalysée par l'EPSPS (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, l'inhibition est compétitive par rapport au PEP (phosphoénol pyruvate) et non-compétitive par rapport au S3P (shikimate 3-phosphate)) et faisant partie d'une voie de synthèse des acides aminés aromatiques (Tyrosine Y, Phénylalanine F et Tryptophane W) propre aux végétaux et à certains microorganismes que l'on appelle la voie du shikimate (Schönbrunn et al., 2001).

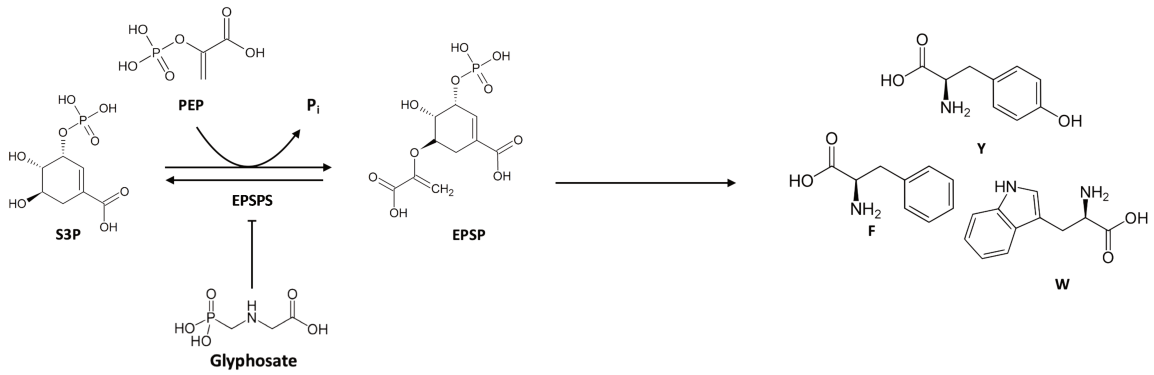


Figure 3. L'inhibition de la voie du Shikimate par le glyphosate (adapté de Schönbrunn et al., 2001).

La résultante de cette inhibition est un défaut en acides aminés aromatiques ainsi que la dérégulation de plusieurs autres voies métaboliques dans la plante qui meurt peu après (Bradberry et al., 2004). Seules les plantes et certains microorganismes expriment la voie du shikimate. Le corollaire de cette proposition est que l'Homme, et plus généralement les

animaux n'exprimant pas la voie du shikimate, le glyphosate n'est pas supposé avoir d'effet toxique sur eux, mais seulement sur les plantes et ces microorganismes.

Il existe 2 types d'EPSPS ; L'EPSPS de classe I, sensible au glyphosate ; et l'EPSPS de classe II, insensible au glyphosate en raison de la mutation de plusieurs acides aminés déstabilisant la fixation du glyphosate à l'enzyme. L'identification de cette deuxième catégorie a permis de générer des plantes transgéniques résistantes à l'herbicide (Mesnage and Antoniou, 2020).

2. La réglementation en vigueur sur l'utilisation du glyphosate

i. L'approbation de la substance

Comme pour toutes les autres substances actives utilisées en agriculture, l'approbation et l'utilisation du glyphosate sont soumises au Règlement n° 1107/2009 du 21/10/09 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.

L'homologation des substances actives commence par une approbation au niveau européen. Un état membre rapporteur ainsi qu'un état membre co-rapporteur soumettent un dossier à l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments, ou European Food Safety Authority en anglais) pour demander l'approbation de la substance active. Il incombe à l'industriel demandant l'approbation de la matière active puis de la formulation de réaliser des études toxicologiques et écotoxicologiques démontrant leur innocuité (Réglementation REACH, Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques, de l'anglais Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals). Il fournit également une revue de littérature incluant les articles de moins de 10 ans décrivant les caractéristiques physicochimiques de la molécule, son devenir dans l'environnement et son écotoxicité (Moreau et al., 2022). La European Chemicals Agency (ECHA) réalise alors une évaluation des dangers liés à l'utilisation de la substance. S'en suit une évaluation des risques liés à l'utilisation de la substance par l'EFSA (EFSA, 2023). Un comité de scientifiques est chargé de réaliser cette évaluation sur la base de la littérature scientifique fournie par l'industriel. Il appartient alors à la Commission Européenne d'approuver ou non la substance, sur la base des conclusions rendues par l'EFSA, généralement pour une durée de 10 ans (Kudsk and Mathiassen, 2020).

Il me semble important ici de préciser la différence entre le danger et le risque lié à l'utilisation de la substance, dont l'évaluation est déterminante dans les processus d'approbation de substance. Le terme **danger désigne la capacité d'un objet ou d'un concept (ici le glyphosate) à causer des effets néfastes** sur la santé des personnes et sur l'environnement. La notion de **risque intègre la probabilité que l'objet ou concept cause effectivement des effets néfastes**. Dans le cas du glyphosate, le danger désigne sa toxicité intrinsèque, alors que le risque prend en compte l'exposition et donc le type d'alimentation, les équipements de protection personnels si on est applicateur etc.

Dans le cas des oiseaux, l'évaluation des risques par l'EFSA se fait en 3 étapes. La première étape permet d'identifier les molécules actives à faible risque, qui sont les molécules les plus spécifiques, même dans des conditions d'exposition jugées extrêmes. Les autres molécules sont ensuite testées dans des conditions d'exposition plus réalistes. Les molécules dont l'innocuité n'aurait pas été assurée par les deux étapes précédentes subissent une analyse plus poussée. L'EFSA fournit des lignes directrices pour ses tests, qui sont celles de l'OCDE (tests de toxicité aiguë par voie orale, expositions alimentaires chroniques à court terme et tests de toxicité sur la reproduction) (Moreau et al., 2022).

Suite à l'approbation, l'autorisation de formulations commerciales de pesticides contenant ladite substance active pourra être évaluée par un état membre, dont l'évaluation se fera au nom de tous les autres états membres de la même zone administrative (Kudsk and Mathiassen, 2020). La délivrance d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) par les états membres de cette zone administrative sera alors possible sans évaluation supplémentaire (Kudsk and Mathiassen, 2020).

S'agissant du glyphosate, bien qu'il eût été autorisé dans la plupart des pays depuis les années 70, son approbation au niveau européen ne date que de 2002, avec l'Allemagne comme état membre rapporteur et pour une durée initiale de 10 ans. Cette autorisation a depuis été étendue à l'année 2016, puis 2017 et 2022. En décembre 2022, cette autorisation a à nouveau été prolongée à décembre 2023 (Kudsk and Mathiassen, 2020). Finalement l'autorisation du glyphosate a récemment été à nouveau prolongée jusqu'en 2033 (Casassus, 2023). En France et en Europe, l'autorisation du glyphosate est sujette à controverses. Les débats ont largement gagné la sphère publique et les arguments avancés par les « pro » et « anti-glyphosate » ne portent pas uniquement sur des considérations scientifiques et de santé publique, mais également sur des aspects politiques, économiques et sociaux (Schummer, 2022).

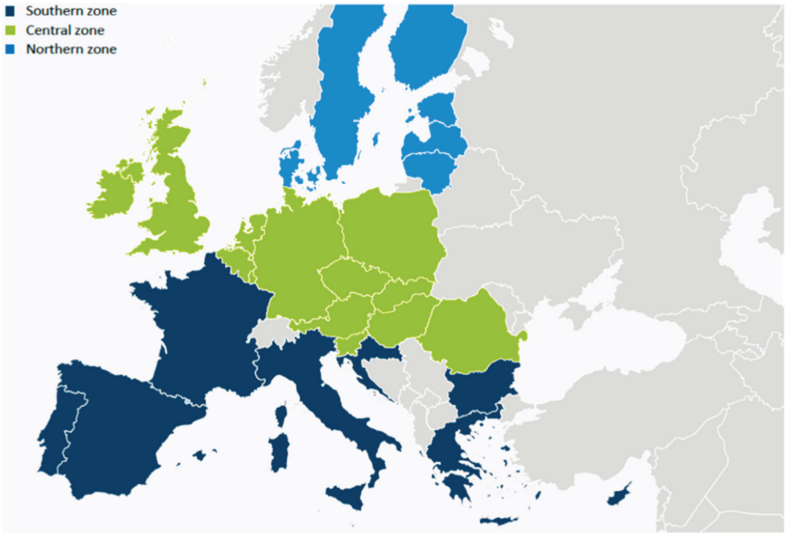


Figure 4. Zones administratives européennes (Kudsk and Mathiassen, 2020).

ii. Les seuils règlementaires

Malgré sa présumée innocuité pour l'humain et les animaux, l'IARC, Centre International de Recherche sur le Cancer classait en 2015 le glyphosate comme « probablement cancérigène pour l'Homme » (Some organophosphate insecticides and herbicides, 2017), classification à contre-courant de celle proposée par une autre autorité sanitaire, l'EFSA. L'Autorité européenne de sécurité des aliments considère le glyphosate comme une substance engendrant « de graves lésions oculaires » et comme étant toxique pour la vie aquatique (EFSA, 2022), mais pas comme une substance cancérigène. Dans son rapport de 2015 sur l'évaluation des risques liés au glyphosate, l'EFSA explique cette divergence dans les conclusions rendues. Les travaux de l'IARC ont porté non seulement sur le glyphosate pur, mais aussi sur des formulations à base de glyphosate, là où l'EFSA a concentré ses travaux sur le glyphosate pur. L'autorité européenne mentionne aussi des divergences dans le choix des

études retenues ainsi que dans l'interprétation des analyses statistiques réalisées (European Food Safety Authority (EFSA), 2015). L'EFSA indique néanmoins qu'il existe des valeurs de dose de glyphosate alimentaire au-delà desquelles des effets néfastes peuvent apparaître. Ces doses sont les NOAELs (No Observed Adverse Effect Level) et diffèrent selon l'espèce. Cinquante mg par kg de poids corporel (kg pc) et par jour pour le lapin, la vache, le cochon et les espèces ovines, et 100 mg/kg pc/jour pour le rat et les espèces aviaires (European Food Safety Authority (EFSA), 2018a).

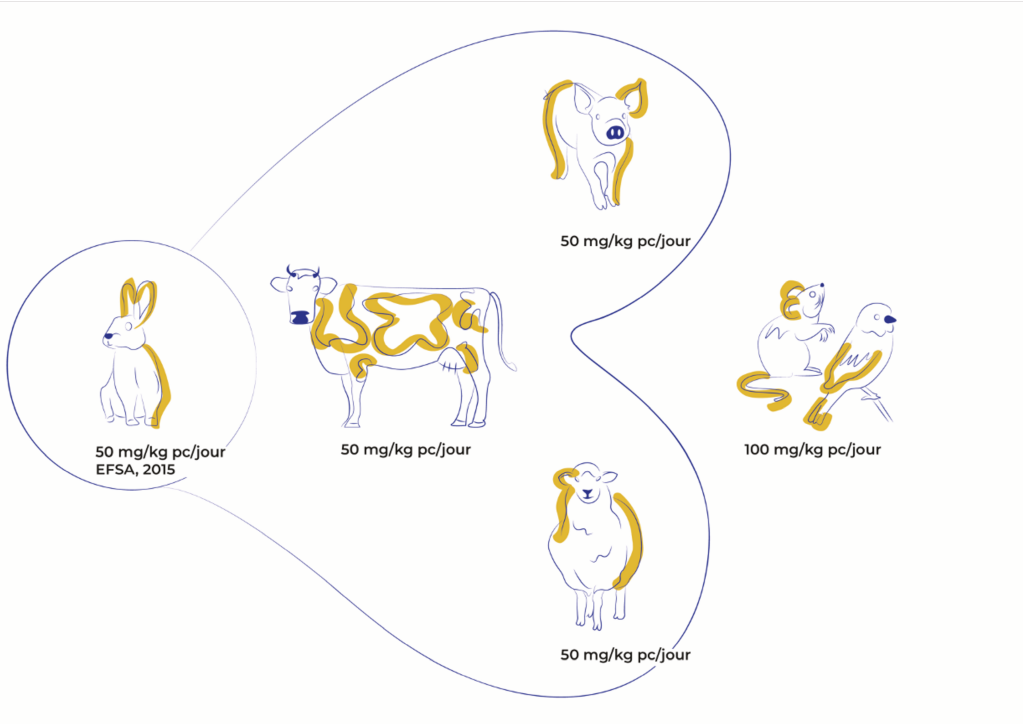


Figure 5. Quelques NOAEL déterminées par l'EFSA. Les NOAEL des modèles porcins, bovins et ovins sont déterminées sur la base de celle du lapin.

L'EFSA établie également des limites maximales de résidus (Maximum Residue Limits, MRL), c'est-à-dire des valeurs de concentration en glyphosate que les aliments ne doivent pas dépasser afin que leur consommation par l'Homme n'entraine pas un dépassement de la dose journalière admissible (DJA, 0,5 mg/kg de poids corporel et par jour). Par exemple, le blé ne doit pas dépasser une teneur de 10 mg/kg, 20 mg/kg pour l'avoine et 0,1 mg/kg pour le sésame et le riz (European Food Safety Authority (EFSA), 2018b).

3. Les herbicides à base de glyphosate

Au regard des différences d'appréciations qu'elle peut engendrer, il paraît important de lever la confusion qui peut exister entre le glyphosate et les herbicides à base de glyphosate (ou glyphosate-based herbicides, nommés GBH ci-après). Les GBH, qui sont les produits effectivement appliqués sur les cultures, sont des formulations dont la molécule active est le glyphosate. Ils en contiennent autour de 40%. Ils renferment également d'autres substances ou co-formulants, souvent des surfactants, pouvant compter pour jusqu'à 50% des formulations. Ces derniers assurent une diffusion homogène du produit et permettent aux molécules de glyphosate de pénétrer d'abord les feuilles, puis les cellules de la plante où elles pourront exercer leur action phytotoxique (Bradberry et al., 2004).

Certains surfactants peuvent être plus toxiques que le glyphosate lui-même, il est donc très important de bien distinguer le glyphosate des GBH (Martins-Gomes et al., 2022). D'autant que comme expliqué précédemment, les conclusions rendues par les agences sanitaires en charge d'évaluer les dangers et les risques liés à l'utilisation des GBH diffèrent selon qu'elles étudient la molécule active ou ses formulations (European Food Safety Authority (EFSA), 2018a). L'enjeu est donc de déterminer si la toxicité des GBH est réellement imputable au glyphosate ou si ce sont en réalité les surfactants qui en sont les éléments toxiques. Les surfactants les plus utilisés sont les POEA (Polyoxyethyleneamines). Ils sont associés à une mortalité plus élevée chez le rat ainsi qu'à d'autres effets toxiques sévères tels que des dommages gastrointestinaux et des diarrhées (Adam et al., 1997). Ils sont néanmoins interdits d'utilisation en Europe depuis 2016 (Martins-Gomes et al., 2022). La composition exacte ainsi que la nature des surfactants ne sont bien souvent pas communiquées par le fabricant.

III. Contamination environnementale et alimentaire au glyphosate

1. Exposition environnementale au glyphosate

i. Dans les sols

Le glyphosate est détecté dans plusieurs sols utilisés pour l'agriculture en Europe. Il est retrouvé dans plus de 10% des sols testés dans une étude de Silva et al., 2018. Les sols portugais semblent être les plus contaminés, alors que les sols grecques et hongrois sont plus épargnés. Les valeurs maximales de concentrations pour le glyphosate et l'AMPA (son métabolite principale) mesurées dans cette étude sont de 2.05 et 1.92 mg/kg, respectivement (Silva et al., 2018). La forte prévalence du glyphosate dans ces sols est néanmoins plus vraisemblablement attribuable à son utilisation intensive qu'à une forte persistance du produit. La persistance du glyphosate dans les sols est fonction de plusieurs facteurs. Ces facteurs sont souvent liés aux propriétés physicochimiques du sol, car la dégradation (minéralisation) du glyphosate dépend de sa sorption au sol. Le glyphosate sera plus stable dans un sol au pH acide et à la teneur en phosphate basse, et dont la capacité d'adsorption est élevée. Il aura donc tendance à être plus stable dans un sol sableux (Al-Rajab and Schiavon, 2010). Il sera également plus stable dans un sol dépourvu des cofacteurs nécessaires à sa biodégradation bactérienne (Mamy et al., 2005). Cependant, bien que l'adsorption du glyphosate aux particules du sol ralentisse sa biodégradation, elle prévient également son transfert vers les eaux souterraines (Al-Rajab and Schiavon, 2010). Les travaux de Silva et al., 2018 fournissent une estimation de la quantité de glyphosate et d'AMPA dans les sols d'Europe. Ils donnent également une prédiction de la quantité de glyphosate et d'AMPA qui pourrait être transférée à l'homme (mais aussi aux animaux) du fait de l'érosion des sols contaminés (par le vent et par l'eau).

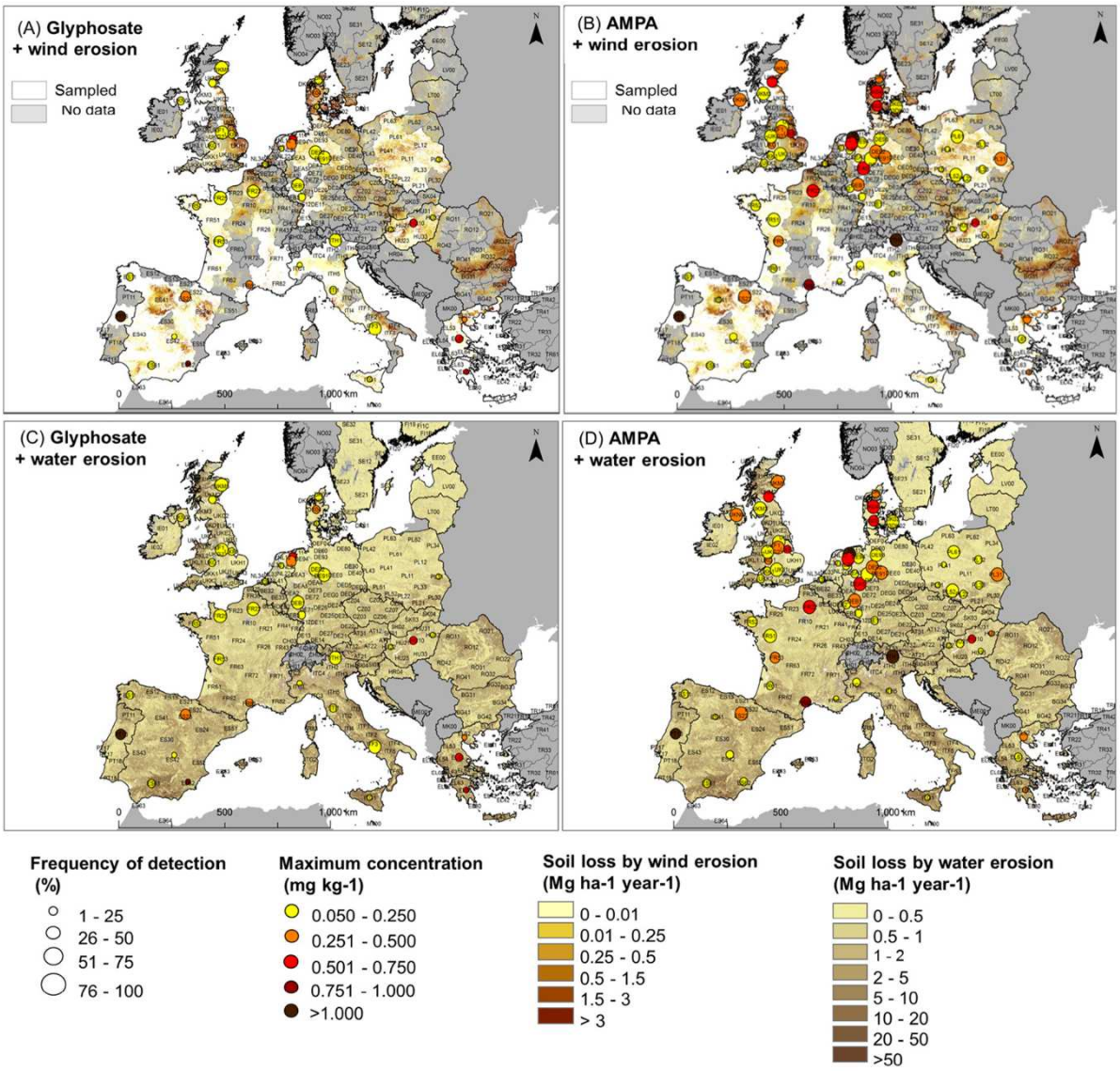


Figure 6. Fréquence de détection du glyphosate et de l'AMPA (≥ 0,05 mg/kg) ainsi que les concentrations maximales respectives (mg/kg) dans les sols agricoles de l'UE (0–15/20 cm) par région NUTS 2, superposées aux cartes de perte de sol par érosion éolienne (Silva et al., 2018).

ii. Dans l'eau

Le glyphosate et l'AMPA ont été détectés dans les eaux souterraines d'Europe, avec des concentrations maximales pouvant atteindre 24 µg/L de glyphosate et 19 µg/L d'AMPA (Geng et al., 2021). Ils ont également été détectés dans des eaux de plusieurs autres régions. Les eaux des Etats-Unis restent les plus fortement concentrées, avec des maximums de concentrations atteignant 427 µg/L de glyphosate et 397 µg/L d'AMPA (Geng et al., 2021). Ces niveaux sont particulièrement préoccupants, surtout si l'on tient compte du fait que l'EFSA désigne le glyphosate comme toxique pour la vie aquatique (EFSA, 2022).

iii. Dans l'air

Le glyphosate et l'AMPA sont également détectables dans l'air, notamment aux abords de surfaces agricoles. Une étude publiée en 2021 chiffre leurs concentrations dans les particules en suspension dans l'air PM10 (particules en suspension de diamètre inférieur à 10 µm) à plus de 600 µg/kg pour de glyphosate et 7000 µg/kg pour l'AMPA sur les routes rurales d'Argentine (Ramirez Haberkon et al., 2021).

iv. Dans la nourriture

La contamination de la faune aviaire se fait vraisemblablement aussi par l'ingestion de graines contaminées. Les travaux de Xu et al., 2019 recensent les données disponibles sur les concentrations de glyphosate mesurées dans différents types de graines. Ces concentrations sont inférieures à 0,1 mg/kg pour la plupart des graines, mais peuvent atteindre 8,8 et 11,1 mg/kg dans certaines études, pour le soja et le blé, respectivement (Xu et al., 2019). A noter que la règlementation en vigueur dans l'Union Européenne est généralement plus stricte en matière de limite maximale de résidu de pesticide dans les graines que d'autres instances telles que l'US-EPA ou l'OMS (Xu et al., 2019). A noter également que la valeur maximale de 11,1 mg/kg mesurée dans le blé l'a été dans un blé canadien, et que cette valeur excède la MRL en vigueur dans cette région (5 mg/kg) (Gélinas et al., 2018).

2. Effets connus des herbicides à base de glyphosate

i. Sur la reproduction des mammifères

Plusieurs études font état d'effets néfastes des GBH sur la reproduction des mammifères. Une revue publiée par notre équipe en 2021 synthétise les conclusions données dans plusieurs dizaines de ces études (Serra et al., 2021b). Les effets des GBH sur la reproduction des mammifères ont été observés à plusieurs niveaux. Fu et al., 2020 ont exposé des porcelets à des doses croissantes de GBH (0, 10, 20, and 40 mg équivalent glyphosate/kg) par voie orale et ont observé une augmentation de leur production de GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) (Fu et al., 2021). Cependant les auteurs relèvent également une diminution de la production de FSH (Follicle Stimulating Hormone), en apparente opposition avec l'augmentation de la production de GnRH. Ce type de résultats apparemment contradictoires est retrouvé dans d'autres travaux. Popoola and Sakpa, 2018 ont observé une diminution de la production de FSH en concomitance avec une augmentation de la production de LH (Luteinizing Hormone) chez des rats exposés à une dose de 2000 mg/kg/jour d'équivalent glyphosate pendant 60 jours (Popoola and Sakpa, 2018). Ces travaux indiquent donc qu'une exposition à un GBH est susceptible de modifier la sécrétion d'hormones au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, mais que le sens de la modification est difficilement prédictible. Ce dernier est vraisemblablement fonction de l'espèce, du sexe et du stade de développement.

> Les mécanismes de libération hormonale au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire seront examinés en détail dans la section **Présentation du modèle d'étude – Le système reproducteur - Le contrôle endocrinien de la reproduction.**

Dans la foulée de cette idée, Popoola et al., 2018 ont également observé une diminution des taux plasmatiques de testostérone, accompagnée d'une augmentation des taux d'estrogène et de progestérone. Owagboriaye et al., 2017 ont exposé oralement des rats mâles à des doses croissantes de GBH (3,6, 50,4, 248,4 mg/kg/jour pc) pendant 12 semaines. Les résultats obtenus étaient moins contradictoires que ceux obtenus lors des travaux précédemment cités ; une diminution dose dépendante des niveaux plasmatiques de LH, FSH et de testostérone. La modification des taux hormonaux plasmatiques peut reposer sur plusieurs

mécanismes. Par exemple, Ren et al., 2018 ont observé une diminution des taux plasmatiques de progestérone chez des souris gestantes oralement exposées à un GBH. Cette diminution était corrélée à une diminution du poids des ovaires ainsi qu'à des modification des niveaux de transcrits de plusieurs enzymes de la stéroïdogenèse (Ren et al., 2018). Une autre revue publiée en 2020 rapporte des effets sur la viabilité des cellules de Sertoli et de Leydig ainsi que des diminutions du nombre de spermatozoïdes, de leur motilité et de leur intégrité chez le rat, la souris et l'Homme (Jarrell et al., 2020). L'utilisation de modèles *in vitro* permet d'explorer davantage les mécanismes à l'œuvre derrière ces perturbations. Par exemples, certaines études rapportent des altérations dans la production d'estrogènes et de progestérone par des cellules ovariennes (cellules de la granulosa) de plusieurs modèles cultivées *in vitro* (Wrobel, 2018; Spinaci et al., 2019). L'étude de Perego et al., 2017 menée sur des cellules de la granulosa bovines montre que des doses croissantes de GBH (10 et 300 µg/mL) réduisent considérablement la viabilité cellulaire, ainsi que la production de progestérone et d'estradiol, alors que le glyphosate seul n'a pas d'effet significatif sur ces paramètres (Perego et al., 2017). Une autre étude montre que des doses croissantes d'un GBH appliquées sur les cellules tumorales MA-10 (cellules de Leydig de souris) pendant 2 heures peuvent réduire leur production de progestérone de manière dose-dépendante, ce qui pourrait être dû à une altération de l'expression protéique du transporteur StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) responsable de l'étape cinétiquement déterminante de la stéroïdogenèse (Walsh et al., 2000). D'après ces travaux, les GBH pourraient donc modifier les dynamiques hormonales, soit en inhibant directement leur sécrétion, soit en modifiant le destin des cellules sécrétrices. De plus, il a été montré que le glyphosate présent dans certains GBH est capable d'activer les ERα (Estrogen receptor α) *in vitro* chez la lignée cellulaire humaine MCF-7 (Michigan Cancer Foundation - 7) (Mesnage et al., 2017). Il a été montré chez la même lignée cellulaire que le glyphosate imite les effets de l'estradiol, en promouvant la phosphorylation des ERα, ainsi que leur activité transcriptionnelle et leur dégradation (Muñoz et al., 2023). Ces constats alimentent donc le doute quant à la possible qualification du glyphosate de perturbateur endocrinien. En effet, ces propriétés font partie des caractéristiques clés des perturbateurs endocriniens. Les GBH regroupent donc plusieurs de ces caractéristiques (Muñoz et al., 2021).

ii. Les GBH, perturbateurs endocriniens ?

Un perturbateur endocrinien EDC (de l'anglais Endocrine-disrupting chemicals) est « une substance ou un mélange de substances, qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)- populations » (International Programme on Chemical Safety, 2002). Un perturbateur endocrinien potentiel est « une substance ou mélange exogène qui présente des propriétés susceptibles de provoquer une perturbation endocrinienne chez un organisme intact, sa progéniture, ou dans des (sous-)populations », selon le Programme international sur la sécurité chimique de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2002 (International Programme on Chemical Safety, 2002). Les EDCs sont un sujet de préoccupation majeur en santé publique, tant le spectre de produits d'usage et de consommation quotidienne les contenant est grand. Il peut s'agir de médicaments, d'objets plastiques ou même de pesticides. A ce titre, le glyphosate est suspecté par certains auteurs de se comporter comme un perturbateur endocrinien (Muñoz et al., 2021). Il convient néanmoins d'établir un certain nombre de caractéristiques clés permettant de débattre des propriétés d'EDC d'une molécule. En effet, les EDC se distinguent d'autres produits toxiques entre autres par leurs mécanismes d'actions, l'importance des effets transgénérationnels et par leur relation effet-dose qui n'est pas toujours monotonique. Autrement dit un EDC peut être actif à faible dose et inactif à plus forte dose, comme illustré en **Figure 7** ci-dessous (Vandenberg et al., 2012).

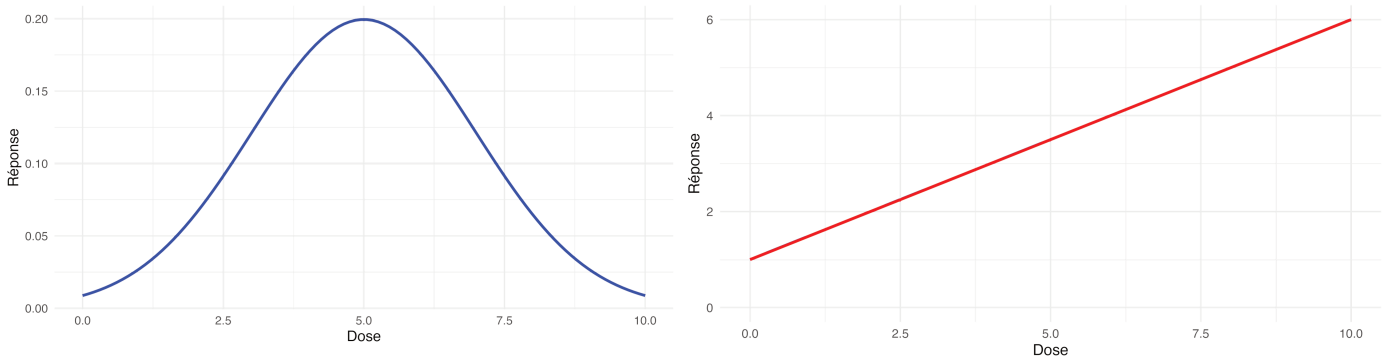


Figure 7. Illustration d'une courbe dose-réponse non monotonique (en bleu) et d'une courbe dose-réponse monotonique (en rouge). Adaptée de (Vandenberg et al., 2012).

Il existe aujourd'hui un consensus sur les caractéristiques clés qui permettent de décrire un EDC. Elles sont au nombre de 10 et sont présentées dans les travaux de La Merrill et al., 2020 :

1. Interagit avec ou active des récepteurs hormonaux
2. Antagonise des récepteurs hormonaux
3. Altère l'expression de récepteurs hormonaux
4. Modifie la transduction du signal dans les cellules sensibles aux hormones
5. Induit des modifications épigénétiques dans les cellules productrices d'hormones ou sensibles aux hormones
6. Altère la synthèse d'hormones
7. Altère le transport d'hormones à travers la membrane cellulaire
8. Modifie la distribution des hormones ou les niveaux d'hormones circulantes
9. Modifie le métabolisme des hormones ou leur clairance
10. Modifie le destin des cellules productrices d'hormones ou sensibles aux hormones

Le danger que représentent les perturbateurs endocriniens est porté à l'attention du grand publique en 1962, lors de la parution du livre Silent Spring de Rachel Carlson, dont le titre fait référence à la réduction des populations d'oiseaux migrateurs dont on n'entendait plus le chant. Cette réduction des effectifs d'oiseaux migrateurs aurait été due à l'action du DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), un insecticide organochloré perturbateur endocrinien, associé à une réduction de l'épaisseur de la coquille des oiseaux exposés. Concernant le glyphosate, la revue de littérature réalisée par l'EFSA ne relève que quelques résultats marginaux s'apparentant à une action endocrinienne de la molécule. Aussi aucune preuve tangible de perturbation endocrinienne n'a été relevée dans les autres études à disposition de l'autorité européenne. L'EFSA conclut donc que le glyphosate ne provoque pas d'effets néfastes liés à une perturbation endocrinienne (European Food Safety Authority (EFSA), 2017).

Cette conclusion étant plus fondée sur une absence de preuve que sur une preuve de l'absence, elle n'exclue pas définitivement la possibilité d'un lien entre glyphosate et perturbation endocrinienne. Les travaux de Muñoz et al., 2020 parcourent la bibliographie disponible pour déterminer quelles caractéristiques clés des EDC sont réunies par le glyphosate. Ils concluent qu'au moins 8 de ces caractéristiques le sont (Muñoz et al., 2021).

Au regard de ces informations, l'EFSA a établi plusieurs NOAEL pour la reproduction des mammifères (351 mg/kg pc/jour pour la génération F0, 293 mg/kg pc/jour pour la descendance et 417 mg/kg pc/jour pour la une exposition parentale) (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023).

Tableau 1. Effets des GBH sur la reproduction des mammifères

	Modèle	Sexe	Dose	Effet	Référence
In vivo	Porcelet	♂	Orale ; 0, 10, 20, et 40 mg gly eq/kg	↗GnRH ↘FSH ↗T ↘E2	Fu et al., 2021
	Rat		Gavage ; 400 et 2000 mg gly eq/kg pc /jour	↗LH ↗E2 ↗Pg ↘T	Popoola et al., 2018
	Rat		Orale ; 3,6, 50,4, 248,4 mg gly eq/kg pc/jour	↘LH ↘FSH ↘T	Owagboriaye et al., 2017
	Rat		Lavage gastrique ; 5, 50, 500 mg/kg pc/jour	↘Masse vésicule séminale ↘Masse glande coagulante ↘spz	Dai et al., 2016
	Descendance rats		Gavage ; 50 mg gly eq/kg/jour	↗T ↗*LH* ↗LH ↗*FSH* ↗FSH ↘Poids vésicule séminale ↗Poids épididymes	Romano et al., 2012
	Souris		Orale ; 5, 50 mg/kg gly eq/day	↘spz ↘T	Pham et al., 2019
	Rat		Orale ; 0, 2, et 50 mg gly eq/kg pc/jour	Architecture testiculaire anormale ↘motilité spz ↗malformation spz	Liu et al., 2022
	Mouton	♀	2 mg gly eq/kg/jour	↘E2 ↘ERα et Pg dans l'uterus ↘Prolifération cellules utérines	Alarcón et al., 2020
	Souris gestantes		0,5%	↘Pg ↘Poids ovaires ↘HSD3β ↗Cyp17a1	Ren et al., 2018
In vitro	Cellules primaires de la granulosa de vache	♀	10 ng gly eq/mL	↗E2 ↘Pg	Wrobel et al., 2018
	Cellules primaires de la granulosa porcines		0, 5, 10, 100, 200, 360 µg gly eq/mL	↘Pg	Spinaci et al., 2020
	Cellules primaires de la granulosa bovines		10 et 300 µg gly eq/mL	↘Viabilité cellulaire ↘Pg ↘E2	Perego et al., 2017
	MCF-7 (cancer du sein humain)		–	Liaison à Erα	Mesnage et al., 2017
	Cellules primaires de la granulosa porcines		0,2, 4 et 16 µg gly pur/mL	↘Prolifération ↘Viabilité ↘E2 ↗Pg ↗ROS	Gigante et al., 2018
	MA-10 (Leydig)	♂	25 µg gly eq/mL	↗Pg ↘StAR ↘*HSD3β*	Walsh et al., 2000
	Semence humaine		0,36, 0,036, 0,0036 mg gly eq/mL	↘Motilité spz ↘Viabilité spz	Velásquez et al., 2021
	Semence humaine		0,36 mg gly eq/L	↘Motilité spz	Anifandis et al., 2018

Cyp17a1 : Cytochrome P450 family 17 subfamily A member; ERa : Estrogen Receptor a; E2 : Estradiol; FSH : Follicle Stimulating Hormone; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; HSD3β : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase; LH : Luteinizing Hormone; Pg : Progésterone; ROS : Reactive Oxygen Species; spz : spermatozoïdes; StAR : Steroidogenic Acute Regulatory; T : Téstosteronerone

iii. Sur le métabolisme des mammifères

Le glyphosate est désigné par l'EFSA comme toxique pour la vie aquatique (EFSA). De nombreuses études ont de fait porté sur l'impact des GBH sur le métabolisme des espèces aquatiques (Avigliano et al., 2014). En revanche, relativement peu d'études se sont focalisées sur l'effet des GBH sur le métabolisme des mammifères. Beaucoup des études à disposition de l'agence sanitaire européenne ont utilisé des modèles murins et canins (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023). Les effets les plus fréquemment détectés impliquent le tractus gastro-intestinal, une diminution de la prise alimentaire ainsi qu'une diminution du gain de poids corporel. Des modifications des niveaux plasmatiques d'alanine aminotransférase (ALT) et de phosphatase alcaline (ALP), indicateurs de potentielles altérations du métabolisme hépatique sont également mentionnées (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023). Par exemple, des dommages hépatiques reflétés par des augmentations de marqueurs biochimiques de stress tels que ALT, AST (Aspartate aminotransférase) et γ-GT (Gamma-glutamyltranspeptidase) ont été montrés chez la souris (Jasper et al., 2012). Des augmentations des taux plasmatiques de ALT, AST ainsi que de LDH (Lactate Déshydrogénase) ont également été observées chez des rats exposés à du glyphosate (injection IP ; 2,8 g/kg/jour pendant 15 jours). Chez les mêmes animaux, les taux plasmatiques de glucose étaient diminués (Hasković et al., 2016). Ces observations sont le reflet de changements métaboliques à la suite de l'exposition. En 2018, Panzacchi et ses collègues ont publié des résultats obtenus après une exposition chronique orale de 13 semaines à un GBH (1,75 mg/kg pc/jour) chez le rat (Panzacchi et al., 2018). Le poids corporel ainsi que la consommation d'eau et de nourriture n'ont pas été affectés par ce traitement. Pourtant, Ren et al., 2018 ont bien observé une diminution de la consommation d'eau et de la prise de poids corporel chez les souris gestantes oralement exposées à un GBH (Ren et al., 2018). De même, une diminution du poids corporel a été observée chez des rats exposés oralement à du glyphosate (500 mg/kg/jour pendant 21 jours) (Lakshmi Namratha et al., 2019). Il semble ici encore que des facteurs tels que le sexe, le stade de développement et l'état physiologique (gestant ou non) de l'animal peuvent moduler la réponse au GBH. La mitigation de cet effet par l'administration de vitamine C indique que l'effet est certainement médié par le stress oxydatif (Lakshmi Namratha et al., 2019). Une autre étude datant de 2022 montre que plus d'une centaine de lipides ont des niveaux plasmatiques anormaux dans une cohorte d'hommes exposés à des GBH du fait de

leurs professions (Zhang et al., 2023). Dans une étude similaire, les niveaux plasmatiques de 27 métabolites étaient altérés (Zhang et al., 2022). Ces métabolites étaient liés à des voies telles que celles du métabolisme des acides aminés et du métabolisme énergétique (glycolyse et cycle de Krebs).

Modèle	Dose	Effet	Reference
Rats	Injection IP ; 2.8 g/kg/jour pendant 15 jours	↗ALT ↗AST ↗LDH ↘Glucose	Hasković et al., 2016
Rats	Injection IP ; 269,9 mg gly eq/kg pc/2 jours	↗ALT ↗AST ↗ALP	El-Shenawy et al., 2009
Rats	Orale ; 500 mg/kg/jour pendant 21 jours	↘Poids corporel	Lakshmi Namratha et al., 2019
Rats	Exposition chronique orale de 13 semaines à un GBH (1,75 mg/kg pc/jour)	Pas d'effet sur le poids corporel, la consommation d'eau et de nourriture	Panzacchi et al., 2018
Souris gestantes	0,5% par voie orale, pendant 19 jours	↘ Consommation d'eau ↘prise de poids corporel	Ren et al., 2018
Souris	50, 250 et 500 mg/kg pc/jour pendant 30 jours	Dérèglement du cycle de Krebs, de la chaine de transfert d'électrons, du métabolisme du pyruvate et de la glycolyse/glycogenèse	Li et al., 2023
Cohorte d'hommes exposés professionnellement	–	Niveaux plasmatiques anormaux de plus d'une centaine de lipides	Zhang et al., 2023
Cohorte d'hommes exposés professionnellement	–	Altération des niveaux plasmatiques de 27 métabolites liés à des voies métaboliques spécifiques	Zhang et al., 2022
Rat	Lavage gastrique ; 5, 50, 500 mg/kg pc/jour pendant 5 semaines	↘Prise alimentaire	Dai et al., 2016

Tableau 2. Effets des GBH sur le métabolisme des mammifères

Enfin, de nombreux travaux montrent que les GBH peuvent entrainer des dysbioses intestinales, notamment parce que certaines bactéries intestinales expriment la voie Shikimate ciblée par le glyphosate (Mesnage et al., 2021b). Considérant la grande importance qu'a le microbiote intestinal dans le maintien de la santé de l'hôte, il est fort probable qu'une

exposition à long terme à un GBH puisse entrainer des effets néfastes induits par une dysbiose intestinale.

- De nombreuses études ont été conduites sur ce sujet. Je reviendrais sur ces études et leurs conclusions dans la section **Résultats et discussion - Impact du GBH sur le microbiote caecal chez l'adulte.**
- D'autres types d'effets sont attribués aux herbicides à base de glyphosate. Le plus fréquemment mentionné est l'induction du stress oxydatif, notamment plasmatiques (Wang et al., 2022). Beaucoup d'effets néfastes pourraient alors être des conséquences indirectes d'une exposition à un GBH, liées à ce stress oxydatif.

iv. Sur la reproduction et le métabolisme des oiseaux

Comme expliqué précédemment, peu d'études montrent des effets délétères directs des GBH sur la reproduction des oiseaux. Les effets rapportés sont le plus souvent indirects. Les GBH agiraient sur la disponibilité des habitats et de la nourriture des oiseaux (Gill et al., 2018). L'application de GBH est assez logiquement corrélée avec la diminution des couverts végétaux alentours. Cette diminution de densité de végétation est accompagnée par la diminution de la densité de plusieurs espèces aviaires (Lautenschlager, 1993). Il existe néanmoins quelques travaux faisant état d'effets directs des GBH sur la santé des oiseaux. Une étude datant de 1980 montre que lors d'une exposition alimentaire à 0, 60,8, 608, et 6080 ppm de glyphosate chez des poussins de poules durant les 21 premiers jours après éclosion, la croissance des animaux n'est affectée que par la plus forte dose administrée (Kubena et al., 1981). Notons cependant que du glyphosate pur est utilisé dans cette étude. Des effets différents pourraient être observés avec un GBH. Une étude plus récente réalisée chez la caille montre qu'une exposition alimentaire parentale à un GBH réduit le développement embryonnaire et entraine des dommages lipidiques dans le cerveau des embryons, probablement dus à une augmentation du stress oxydatif et à la peroxydation des lipides cérébraux (Ruuskanen et al., 2020b). Les auteurs ne sont néanmoins pas en mesure d'affirmer que ces effets sont plutôt dus à l'exposition du parent femelle ou du parent mâle, bien qu'ils dressent l'hypothèse qu'ils viendraient d'une diminution de la qualité spermatique ou d'un comportement reproducteur altéré chez le mâle. Ils indiquent aussi que la qualité des œufs n'étant pas altérée, l'hypothèse qu'il y ait des effets négatifs sur la folliculogenèse et le développement ovarien n'est pas privilégiée (Ruuskanen et al., 2020b). Dans une étude parallèle, Ruuskanen et al., 2020a ont également montré une diminution de l'activité de la catalase hépatique ainsi qu'une diminution des niveaux de testostérone chez les parents mâles (Ruuskanen et al., 2020a). Les auteurs ont également identifié de profond changement dans la composition des communités microbiennes du microbiote fécal. Cet effet est particulièrement marqué chez les jeunes femelles. La dysbiose est accompagnée d'une augmentation de l'abondance d'*Enterococcus cecorum*, un pathogène émergeant chez les espèces aviaires (Ruuskanen et al., 2020a). Une autre étude montre que l'utilisation de GBH augmente la résistance à certaines souches de Salmonelles chez la poule et chez le porc (Pöppe et al., 2019). *A contrario*, des bactéries bénéfiques du tractus digestif de la poule telles que *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*

faecium, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis* et *Lactobacillus* spp. sont négativement affectées par la présence de GBH (Shehata et al., 2013a). Ces travaux montrent donc que bien qu'il n'existe que peu de littérature récente traitant la question, il ne serait pas correct d'affirmer que les GBH n'ont aucun effet sur la santé des oiseaux. D'ailleurs, l'EFSA indique que la NOAEL chez les oiseaux est de 100 mg/kg de poids corporel/jour, c'est donc que l'instance européenne n'exclut pas qu'au-delà de cette dose le glyphosate aurait bien des effets néfastes chez eux (European Food Safety Authority (EFSA), 2018a).

Cette dose extrêmement élevée dépasse de loin les niveaux d'exposition, au moins alimentaires, auxquels les oiseaux sont susceptibles d'être chroniquement exposés.

En outre, l'EFSA notait en 2018 que les possibles effets du glyphosate sur le microbiome n'avaient pas été pris en compte dans son analyse (European Food Safety Authority (EFSA), 2018a). Plusieurs études ont analysé les effets des GBH sur le microbiote intestinal ainsi que les conséquences sanitaires de ces effets. En l'absence de directives standardisées encadrant l'évaluation des effets sur le microbiote intestinal, ces études n'ont pas permis de tirer de conclusions définitives quant aux effets des GBH sur ce dernier. L'EFSA considère néanmoins que la littérature disponible apporte suffisamment d'éléments en faveur de l'absence d'impact du glyphosate sur la santé lié au microbiote chez les humains, le bétail et les animaux de compagnie. L'EFSA maintient donc en 2023 ses conclusions précédentes quant aux effets du glyphosate sur le microbiote intestinal (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023).

3. Toxicocinétique du glyphosate

Pour éviter des effets néfastes sur sa santé, l'organisme peut prévenir l'exposition en mettant en place des stratégies d'évitement du produit, par exemple en modifiant son alimentation (Saaristo et al., 2018). C'est par exemple l'une des fonctions du goût amer des aliments, supposé avertir d'un danger lié à leur consommation (Maïbèche, 2020). Après avoir été introduit dans l'organisme, le glyphosate pourrait se propager à travers la circulation sanguine vers les organes, où il pourrait suivre diverses voies ou destinées. Il pourrait être séquestré (par exemple dans le tissu adipeux, les os ou les phanères) ou être acheminé vers le foie ou il pourrait être pris en charge par un certain nombre d'enzymes capables de modifier ses propriétés physico-chimiques pour permettre son inactivation et son élimination de l'organisme. L'ensemble de ces étapes est l'objet d'étude d'une branche de la toxicologie appelée toxicocinétique.

La toxicocinétique est une discipline visant à étudier le comportement des substances toxiques dans l'organisme. Cette branche de la toxicologie regroupe les méthodes analytiques permettant de caractériser les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination des substances toxiques dans l'organisme. Il existe des équations permettant de modéliser ces processus et d'en extraire des grandeurs permettant de rapidement estimer le comportement d'une substance dans l'organisme, et d'éventuellement le comparer avec celui d'autres substances. Un exemple classique de ce type de grandeur est la demi-vie. La demi-vie d'une substance est la grandeur estimant le temps nécessaire pour que la quantité d'une substance introduite dans un organisme soit réduite de moitié, notamment par des processus de biotransformation et d'excrétion.

> Cette grandeur est également évaluée pour des systèmes environnementaux, par exemple pour évaluer le temps de résidence d'un pesticide dans un écosystème. Comme expliqué précédemment, la stabilité et donc la demi-vie du glyphosate dépendent des caractéristiques physico-chimiques du sol. Par exemple, la demi-vie du glyphosate est d'environ 1 à 3 jours dans certains sols de France (Mamy et al., 2005), mais peut atteindre jusqu'à près de 200 jours dans certaines conditions environnementales (Bento et al., 2017).

i. Absorption

La première étape de la toxicocinétique est la phase d'absorption, grandement dépendante du mode d'administration et de la biodisponibilité de la substance. La biodisponibilité correspond à la fraction de la substance administrée qui pénètre effectivement dans l'organisme. Elle varie donc entre 0% et 100% (White, 2017). Le glyphosate peut être absorbé par 3 voies :

- Par ingestion
- Par absorption cutanée
- Par inhalation

Dans le cas des populations humaines, les absorptions cutanées et par inhalation concernent principalement des utilisateurs directs de GBH comme des agriculteurs qui porteraient peu ou pas d'équipement de protection individuelle (Kohsuwan et al., 2022). Autrement, la voie principale d'absorption du glyphosate pour la population est l'ingestion, notamment à travers les résidus présents dans l'alimentation et l'eau potable. En ce qui concerne la faune sauvage, en particulier les oiseaux, il est également important de considérer les situations où des espèces non-cibles entrent directement en contact avec le GBH, par exemple lors de l'épandage. Estimer les quantités de produit absorbées par chaque voie serait cependant beaucoup plus difficile. De plus, il est nécessaire de prendre en compte les interactions entre chaque voie d'absorption. C'est pourquoi de nombreuses études en laboratoire choisissent de se limiter à la voie d'absorption orale. Une étude récente montre que la biodisponibilité du glyphosate par voie orale (pour une dose administrée de 400 mg/kg pc) n'est que d'environ 20% chez le rat (Anadón et al., 2009). D'autres études mentionnent des résultats similaires. Par exemple, JMPR, 2004 indique que seulement 30% à 36% du glyphosate administré chez le rat est absorbé par le tractus gastrointestinal. Le glyphosate est donc très faiblement absorbé par le tractus gastrointestinal. Cette fraction du glyphosate administré, bien que minime, pénètre alors dans la circulation sanguine par l'épithélium intestinal.

ii. Distribution

La seconde étape de la toxicocinétique est la phase de distribution. La molécule se propage dans l'organisme via la circulation sanguine, d'où elle a la possibilité de diffuser vers les organes périphériques (White, 2017). Le volume de distribution à l'équilibre (Vss, pour l'anglais « Volume of Distribution at Steady-State ») donne une estimation (exprimée en L/kg) de la

distribution de la substance dans les tissus de l'organisme. Une valeur de Vss élevée suggère que la substance est largement distribuée dans les tissus, tandis qu'une faible valeur de Vss indique que la substance est confinée au plasma de l'organisme, et qu'elle n'est donc que faiblement distribuée (White, 2017). L'étude de Anadón et al., 2009 montre alors que chez le rat le glyphosate est effectivement distribué vers ces organes (Vss = 2.32 L/kg). Les auteurs n'excluent donc pas de potentiels effets néfastes considérant la demi-vie observée ($T_{1/2}$ = 14,38 heures), indiquant que la substance réside relativement longtemps dans l'organisme (Anadón et al., 2009). Comme indice supplémentaire de la forte accumulation du glyphosate dans l'organisme, Anadón et al., 2009 calculent une AUC de 93,26 h.mg/L. L'aire sous la courbe (AUC, pour l'anglais « Area Under the Curve ») donne une estimation de l'accumulation de la substance dans l'organisme au cours du temps, exprimée en h.µg/L. Elle est calculée en intégrant la courbe de concentration plasmatique au cours du temps. Il est également possible de calculer une AUCinf, c'est-à-dire une aire sous la courbe extrapolée à l'infini. Elle est calculée par intégration de la courbe de concentration plasmatique en extrapolant les valeurs de concentration au-delà de la dernière mesure réalisée. L'AUCinf est calculable à partir de données expérimentales en appliquant l'équation suivante (CERTARA, 2014) :

$$AUCinf = AUC + \frac{C_{last}}{k_{el}}$$

Avec :

- *AUC* l'aire sous la courbe obtenue à partir des données expérimentales
- C_{last} la dernière mesure de concentration plasmatique
- k_{el} la constante d'élimination de la substance calculée à partir de la pente (k_{el}/2,303) de la courbe de concentration plasmatique en fonction du temps en échelle log-linéaire (soit la quantité de substance éliminée par unité de temps (Hinderliter, 2014)).

D'autres paramètres permettent de caractériser la toxicocinétique d'une substance. Les paramètres présentés dans le **Tableau 3** ci-après sont classiquement étudiés dans ce type d'étude.

Paramètre	Description	Unité de mesure
Cmax	Concentration plasmatique maximale après administration	µg/L
CLt	Clearance totale, mesure de l'élimination de la substance	L/h/kg pc
Vss	Volume de distribution à l'équilibre (Vss)	L/kg pc
$T_{1/2}$	Demi-vie, temps nécessaire pour réduire la quantité de substance de moitié	h
AUCinf	Aire sous la courbe extrapolée à l'infini (AUCinf)	h.µg/L

Tableau 3. Paramètres toxicocinétiques couramment déterminés dans les études de toxicocinétique.

iii. Biotransformation

La biotransformation est un processus enzymatique qui permet la détoxication des xénobiotiques par la modification de la structure chimique des molécules. Par ce processus, des xénobiotiques lipophiles sont convertis en composés hydrophiles plus facilement excrétés par les urines ou la bile (Casarett et al., 2008).

Chez les vertébrés, le principal site de détoxication est le foie. Des enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont néanmoins également exprimées dans le tube digestif et dans les poumons, et la peau. Ces enzymes sont réparties dans 4 grands groupes, selon la nature de la réaction qu'elles catalysent (Casarett et al., 2008) :

- Hydrolyse (exemple : carboxylesterase)
- Réduction (exemple : carbonyl reductase)
- Oxydation (exemple : CYP P450)
- Conjugaison (exemple : UDP-glucuronosyltransferase)

Le processus de biotransformation est alors divisé en 3 phases. La première phase (ou phase I) est appelée phase de fonctionnalisation (Maïbèche, 2020). Elle englobe les réactions d'oxydoréductions et d'hydrolyses. Elle est grandement assurée par des enzymes cytochromes P450 (CYP P450). La seconde phase (Phase II) appelée phase de conjugaison est assurée par

des enzymes telles que les GST (Glutathion-S Transferase) et permet d'augmenter l'hydrosolubilité du xénobiotique pour faciliter son élimination dans les urines. La phase III est la phase d'expulsion du composé biotransformé de la cellule hépatique vers la circulation sanguine, par des transporteurs comme PgP (P-glycoproteins) ou MDR (Multi Drug Restistance). Ce paradigme d'une biotransformation en trois phases trouve néanmoins quelques limites, dans la mesure ou certains xénobiotiques sont conjugués (phase II) sans prise en charge par des enzymes de phase I (qui n'aura pas lieu). Il existe également des cas dans lesquels le xénobiotique est conjugué avant d'être pris en charge par les enzymes de phase I (Casarett et al., 2008). Aussi, bien que les produits des enzymes de phase I sont souvent moins toxiques que le substrat parent, il existe des cas où les métabolites obtenus à la suite de la biotransformation sont plus toxiques que leur composé parent (Casarett et al., 2008).

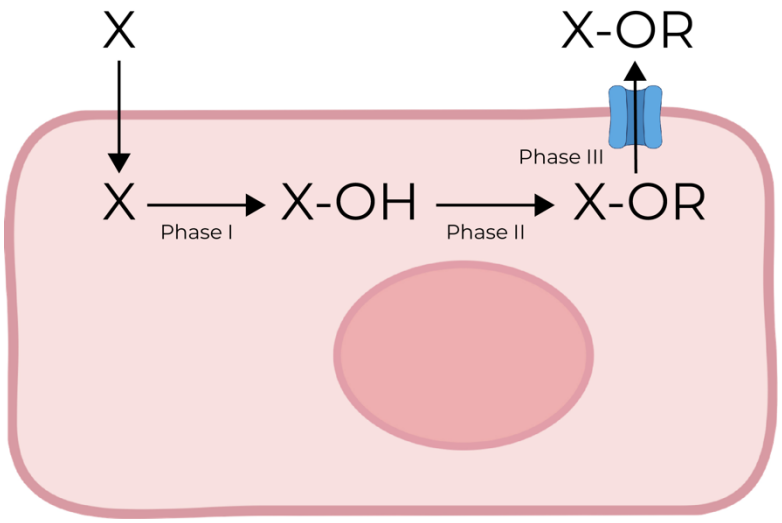


Figure 8. Schéma représentant l'entrée d'un xénobiotique (X) dans une cellule hépatique, sa biotransformation puis sa sortie de la cellule pour élimination (adapté de Maïbèche, 2020).

a. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 (ou CYP450) sont une grande famille d'enzymes à large spectre de substrats, exprimées dans tous les tissus avec une haute concentration dans les cellules hépatiques (Manikandan and Nagini, 2018). Ce sont des hémoprotéines, souvent microsomales capables de métaboliser une grande variété de xénobiotiques. Il est ainsi difficile de prédire si une CYP450 est capable de métaboliser une molécule donnée sur la base de sa séquence ou de son homologie avec d'autres cytochromes de fonction connue (Maïbèche,

2020). Aussi, plusieurs cytochromes peuvent avoir des substrats communs. Ils catalysent des réactions d'oxydations pouvant modifier la toxicité des xénobiotiques et permettre leur prise en charge par des enzymes de la phase II.

La nomenclature des cytochromes P450 n'est donc pas basée sur la réaction qu'ils catalysent (Casarett et al., 2008) mais sur leur famille, sous-famille et le moment de leur identification (Nebert et al., 1987). Par exemple, le cytochrome CYP1A1 appartient à la famille 1, sous famille A et est le premier cytochrome de cette sous-famille à avoir été identifié. Les familles 1, 2, 3 et 4 regroupent les cytochromes capables de métaboliser les xénobiotiques (Casarett et al., 2008; Manikandan and Nagini, 2018).

- Il existe d'autres familles de cytochromes impliquées dans d'autres fonctions. Par exemple, la CYP19A1 (aussi appelée aromatase et dont nous aurons l'occasion de reparler dans la suite de ce document) catalyse la conversion de la testostérone en œstradiol lors de la stéroïdogenèse.
- On parle de CYP450 car le pic d'absorbance de l'enzyme à l'état réduit est mesurable à une longueur d'onde de 450 nm.

L'expression des cytochromes P450 est induite par la fixation d'un ligand aux récepteurs nucléaires AhR, PXR, CAR et PPAR. L'expression d'enzymes de phase II et III comme les GST (Glutathion S-Transférases) ou les UGT (Glucuronosyltransférase) est également induite par l'activité de ces récepteurs nucléaires (Manikandan and Nagini, 2018).

b. Les Glutathion S-Transférases (GST)

Les GST catalysent la conjugaison du glutathion sur un substrat électrophile (souvent un carbone) dans le cytosol des cellules hépatiques, principalement. Elles agissent notamment sur des composés obtenus à la suite de l'activité d'enzyme de la phase I de la biotransformation (Strange et al., 2001).

Il en existe 8 familles, basées sur leur similarité de séquence et sur leur localisation cellulaire (Salinas and Wong, 1999; Strange et al., 2001) : Alpha, Mu, Theta, Pi, Zeta, Sigma, Kappa et Omega. La nomenclature des GST intègre également l'identification d'une sous-unité portée

par la protéine. Par exemple, la GSTA4 appartient à la famille Alpha (A) et porte la sous-unité 4.

c. Autres enzymes

Il existe de nombreuses autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques assurant la biotransformation d'une large palette de molécules (par exemple, les UDP-glucuronyl transférases (UGT), catalysant la glucuronoconjugaison des xénobiotiques). Ces enzymes sont exprimées dans différents compartiments cellulaires. Il en existe également qui sont spécifiquement exprimées par des bactéries du microbiote intestinal (Casarett et al., 2008).

d. Biotransformation, ce que l'on sait dans le cas du glyphosate

Il a été montré que 98% du glyphosate administré à des rats par voie orale est excrété sous forme inchangée dans les urines (Panzacchi et al., 2018). Cette observation semble indiquer que le glyphosate n'est pas (ou très peu) biotransformé chez le rat, car sa prise en charge par des enzymes de phase I et II l'aurait transformé en composé modifié ou conjugué. En outre, une évaluation des risques effectuée en 2000 indique que l'absorption par voie orale de glyphosate et d'AMPA conduit à une faible biotransformation chez les animaux (Williams et al., 2000). Se pose néanmoins la question de l'existence d'une éventuelle variabilité interspécifique. Peu de travaux ont étudié la biotransformation hépatique des GBH sur les espèces aviaires. Les travaux de Fathi et al., 2023 apportent néanmoins de premiers éléments de réponse. Les auteurs ont injecté des œufs de poule avec du glyphosate pure et avec un GBH (pour une concentration en glyphosate de 10 mg d'équivalent glyphosate/kg d'œuf). A la suite de ces injections, les auteurs ont observé une augmentation de l'expression des transcrits *CYP1A2* et *CYP1A4*, ainsi qu'une suppression du transcrit *CYP1C1*. À la suite d'un protocole similaire publié dans une étude datant de 2020, Fathi et al., 2020 avaient également observé des effets du glyphosate et d'un GBH sur l'expression de transcrits de plusieurs cytochromes P450 ainsi que sur les transcrits *MDR1* et *MRP2* (Multidrug resistance-associated protein 2), dans le foie et dans plusieurs compartiments intestinaux (Fathi et al., 2020).

iv. Élimination

La dernière étape de la toxicocinétique est l'excrétion de la substance. A la différence de la clairance, l'excrétion désigne l'élimination totale de la substance ainsi que de ces métabolites, là où la clairance peut être obtenue par dégradation ou métabolisation de la substance.

IV. Présentation du modèle d'étude : La poule

1. Un modèle d'étude toxicologique

L'utilisation de la poule comme modèle biologique remonterait à l'antiquité, avec la description de son embryon par Aristote. Elle est aujourd'hui un modèle courant en médecine et en biologie du développement notamment. C'est bien sûr également un modèle d'étude courant en agriculture et en génétique (Burt, 2007). La poule est également un modèle intéressant pour les études de toxicologie et d'écotoxicologie. L'embryon de la poule est par exemple un modèle de choix pour tester la tératogénicité de substances toxiques (Stark and Ross, 2019). La poule est régulièrement utilisée comme modèle aviaire pour déterminer l'impact des pollutions industrielles et agricoles. Elle présente en effet une grande similarité physiologique avec la plupart des espèces d'oiseaux, et son utilisation est facilitée par la simplicité de ses méthodes d'élevage, qui sont maitrisées depuis de nombreuses années (la domestication remontant à plus de 8000 ans avant notre ère (Burt, 2007), et étant régulièrement optimisée à mesure que des travaux portant sur ce modèle sont réalisés). L'utilisation de la poule comme modèle aviaire permet également d'éviter l'utilisation direct d'espèces menacées, dans le cas d'études écologiques et/ou écotoxicologiques.

2. Le système reproducteur

i. L'ovaire de poule

Contrairement aux mammifères, les oiseaux (dont les poules) n'ont qu'un ovaire fonctionnel. Deux ovaires sont initialement présents, mais seuls l'ovaire gauche et son oviducte se développent. Cette différentiation se fait dès le 3ème jour du développement embryonnaire (Nys and Guyot, 2011; Mellouk et al., 2018). L'ovaire de la poule est localisé dans la partie médio-ventrale de son abdomen, sous la veine cave supérieure. Le drainage veineux de l'ovaire est assuré par deux veines ovariennes qui se connectent à la veine cave (Nys and Guyot, 2011). L'ovaire est constitué de quatre à six follicules préovulatoires remplis de vitellus, disposés selon une hiérarchie identifiable par leur taille et fixés à l'ovaire par des tiges folliculaires (Bahr, 1991). On distingue ainsi les follicules F1 (les plus gros) des follicule F2 à F6. L'ovaire renferme également de nombreux petits follicules jaunes (de 4 à 10 mm de diamètre), de grands follicules blancs (de 2 à 4 mm de diamètre) et de petits follicules blancs (moins de 2 mm de diamètre) qui émergent du stroma ovarien, ainsi que de nombreux petits follicules (de quelques millimètres de diamètre) encastrés dans le cortex de l'ovaire (Bahr, 1991). Cette organisation confère à l'ovaire une apparence similaire à celle d'une grappe de raisin, d'où son appellation de grappe ovarienne.

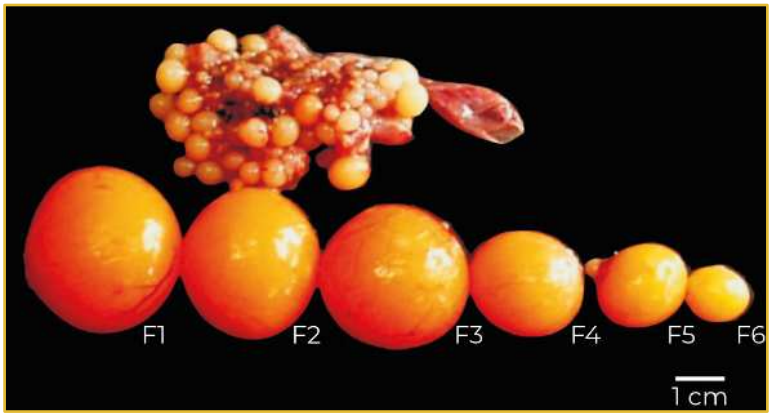


Figure 9. Photo de la hiérarchie folliculaire (adapté de Briere et al., 2011).

La stimulation par des gonadotrophines, des facteurs de croissance et des hormones stéroïdiennes déclenche le cycle ovulatoire et l'ovulation du follicule mature toutes les 26 à 28 heures (Mellouk et al., 2018). Un nouveau follicule rejoint alors la hiérarchie, et les follicules suivants croissent pour atteindre la taille du follicule F1 et ovuler à leur tour (Bahr, 1991). Le

follicule mature contient environ 98% de vitellus (jaune d'œuf) lipidique, qui servira de réserve nutritive pour le développement de l'embryon.

Le follicule est entouré par une enveloppe dont la couche interne est constituée de cellules de la granulosa. Elles jouent un rôle de soutien nutritionnel pour l'ovocyte. Elles sont également en charge de la production d'hormones stéroïdiennes, notamment la progestérone (Bahr, 1991). La couche externe de l'ovocyte est constituée des cellules de la thèque, elle-même entourée par la membrane périvitelline interne (MPVI). Ces cellules ont également la charge de produire des hormones stéroïdiennes. A la différence des cellules de la granulosa, les cellules de la thèque expriment l'aromatase et produisent donc de la testostérone. Le matériel génétique est localisé à la surface de l'ovocyte, dans le disque germinal.

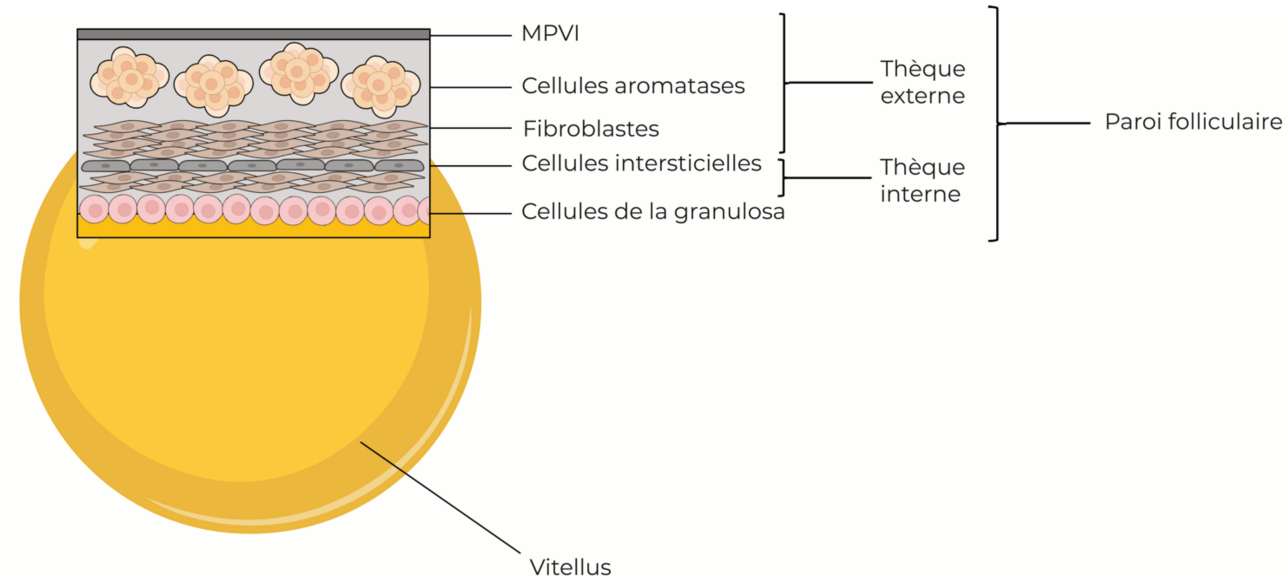


Figure 10. Schéma du follicule ovarien de la poule (adapté de Bahr, 1991).

Le fait que les cellules de la granulosa n'expriment pas l'aromatase est une spécificité des espèces aviaires. Chez les mammifères, les cellules de la granulosa expriment bien l'aromatase.

ii. Le contrôle endocrinien de la reproduction

Le système reproducteur de la poule (comme celui des autres vertébrés) est finement régulé par le système endocrinien de l'animal. Le système endocrinien est l'ensemble des glandes et des cellules capables de sécréter des hormones dans la circulation sanguine. Une hormone est un médiateur chimique. Elle agit par fixation sur un récepteur exprimé par une cellule distante de la cellule émettrice, entrainant une cascade de signalisation aboutissant à une modification de l'activité de la cellule cible. La communication endocrine (hormonale) diffère en cela des communications autocrine (d'une cellule à elle-même et à ses voisines de même type), paracrine (entre cellules voisines de types différents) et neurocrine (entre neurones par le biais d'une synapse). Pour être efficace, la communication endocrine requiert que la cellule cible exprime le bon récepteur alors que la cellule émettrice secrète l'hormone présente à la bonne concentration dans la circulation sanguine. Il existe des hormones protéiques, peptidiques, monoamines et stéroïdiennes. Elles peuvent être actives à des concentrations extrêmement faibles, de l'ordre du nM (Limon et al., 2018).

Le système endocrinien de la poule, comme celui des autres vertébrés, permet la régulation de nombreuses fonctions physiologiques dont la croissance, la reproduction et le métabolisme. Il est classiquement décrit comme le réseau formé par l'hypothalamus, l'hypophyse, la thyroïde, la glande parathyroïde, les glandes surrénales, le pancréas et les gonades (testicules ou ovaires). Des fonctions endocrines ont récemment été identifiées dans d'autres organes comme le tissu adipeux (Bernardi et al., 2021). Les organes du système endocrinien communiquent via la sécrétion d'hormones dans la circulation.

Ici, nous examinerons de manière approfondie un organe spécifique du système endocrinien, à savoir l'ovaire, ainsi que la manière dont la fonction de reproduction est sous contrôle endocrinien. L'ovaire est l'un des membres de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG), l'associant à l'hypothalamus et l'hypophyse chez la femelle (testicule chez le mâle). L'hypothalamus libère une hormone appelée hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) à travers la veine porte pour atteindre les cellules gonadotropes de l'hypophyse, libérant à leur tour la luteinizing hormone (LH) et la follicle-stimulating hormone (FSH), dont les récepteurs sont exprimés par les cellules ovariennes (Leska and Dusza, n.d.). Chez la femelle, la FSH entraine la maturation de l'ovaire, ainsi que la sélection des follicules qui entreront dans la hiérarchie folliculaire. Des pics de LH stimulent la maturation du follicules

dans ses stades plus tardifs et contrôlent la production d'estrogènes et d'androgènes par les follicules matures (Kanda, 2019; Leska and Dusza, n.d.). Les follicules ont également la charge de produire des stéroïdes ovariens, notamment la progestérone (Pg) responsable de l'ovulation, en réponse au pic de LH, et l'estradiol (E2).

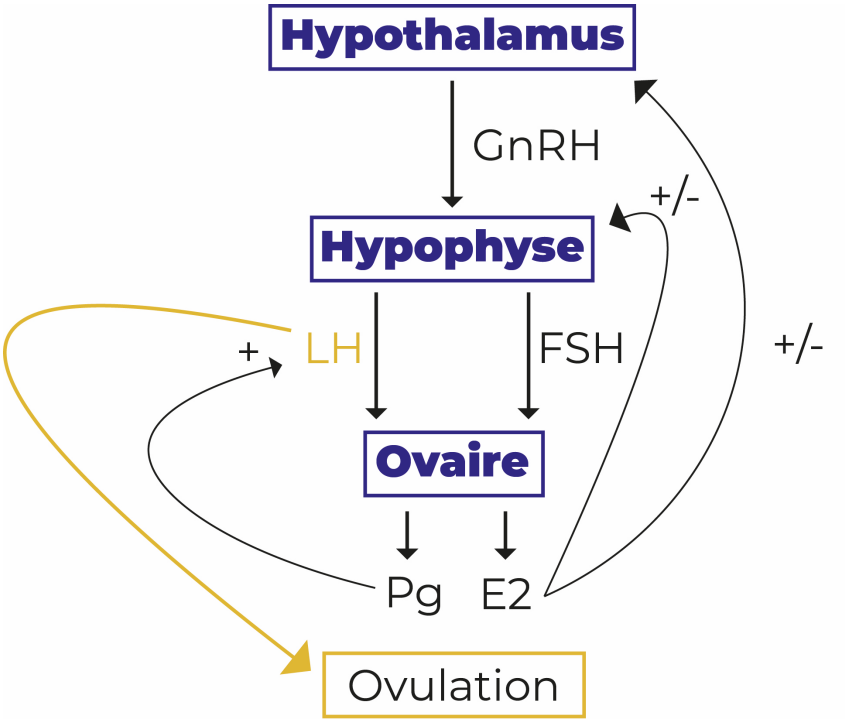


Figure 11. Axe HPG chez la poule.

Les stéroïdes ovariens sont des hormones contrôlant la croissance et l'activité du tractus reproducteur. Ils induisent la synthèse de vitellus par le foie et la mobilisation de calcium pour la construction de la coquille de l'œuf. Ils exercent également un rétro-control (positif et négatif) sur la sécrétion de gonadotrophine et donc, par extension, sur leur propre sécrétion (Bahr, 1991). Ce rétrocontrôle, lorsqu'il est négatif, prévient la maturation excessive des follicules (Kanda, 2019). Les petits follicules et le follicule F1 assurent une grande partie de la production des stéroïdes ovariens (les follicules intermédiaires allouant l'essentiel de leur énergie à leur croissance). Les cellules de la granulosa sécrètent la progestérone et les cellules de la thèque sécrètent quant à elles les androgènes et estrogènes tels que la testostérone et l'estradiol (Bahr, 1991). Lorsque le follicule le plus haut de la hiérarchie devient mature, la forte concentration plasmatique de progestérone induit une augmentation de sécrétion de la LH, ce

qui déclenche l'ovulation. Chez les mammifères, cette augmentation de la sécrétion de LH est provoquée par les hauts niveaux plasmatiques d'estrogènes (Kanda, 2019).

Les réactions enzymatiques de la stéroïdogenèse sont représentées en **Figure 12** ci-dessous.

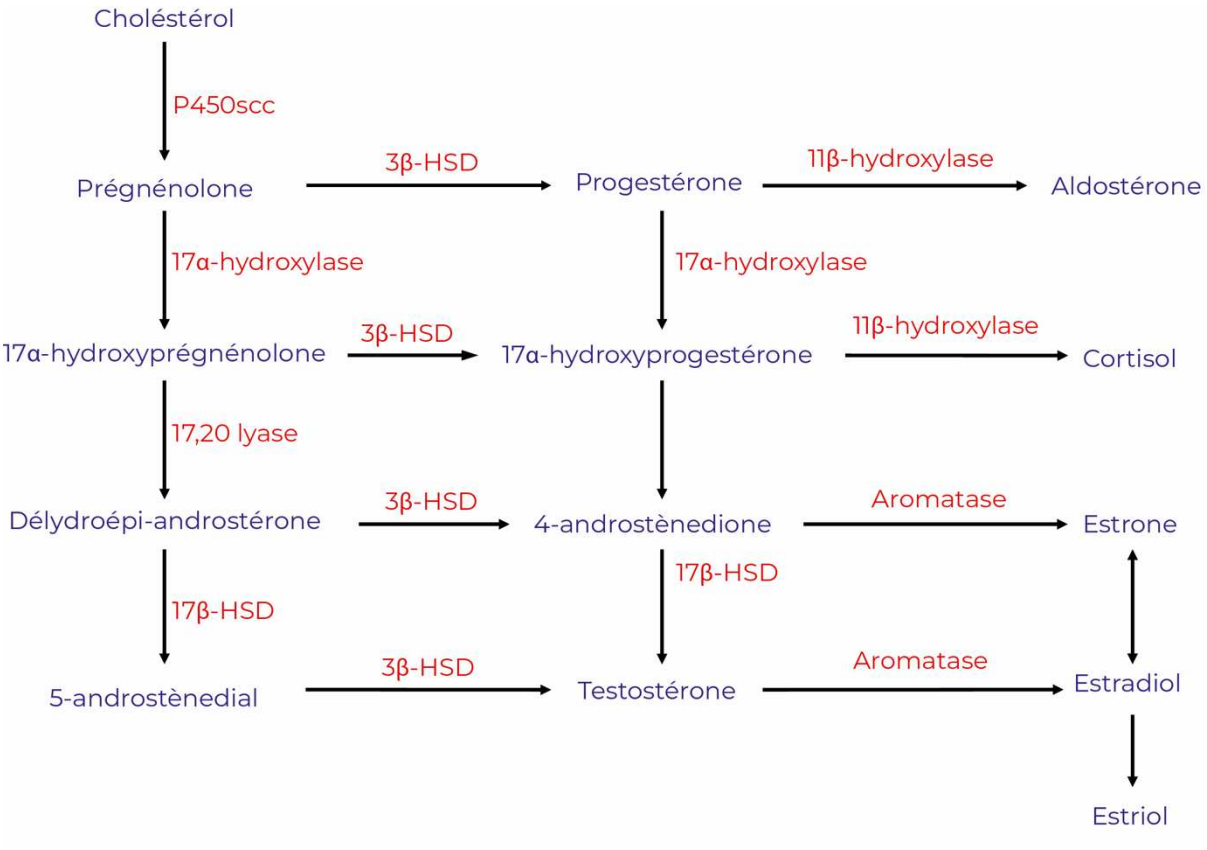


Figure 12. Représentation schématique des étapes enzymatiques de la stéroïdogenèse (adapté de Fontaine, 2014).

iii. L'ovulation

La veille de l'ovulation, la sécrétion de progestérone s'intensifie dans le follicule F1. Cette sécrétion accrue de progestérone déclenche un rétrocontrôle positif de la sécrétion de LH par l'hypophyse, puis un pic de LH. Ce pic de LH induit l'ovulation du follicule mature, 6h plus tard, permise par la digestion de la membrane périvitelline (Nys and Guyot, 2011). L'oocyte est alors transféré vers l'oviducte.

iv. L'oviducte et la formation de l'œuf

Le reste du tractus reproducteur est appelé oviducte. Il s'étend entre l'**ovaire (1)** et le **cloaque (7)**. La descente du follicule ovarien le long de l'oviducte permet la formation progressive de l'œuf. L'oviducte commence dans sa partie proximale avec l'**infundibulum (2)**, qui s'ouvre largement sur l'ovaire pour accueillir l'oocyte libéré par le follicule pré-ovulatoire (Nys and Guyot, 2011). La muqueuse interne de l'infundibulum contient plusieurs types de cellules. Des cellules sécrétrices participent à la synthèse de la membrane vitelline externe, tandis que d'autres forment des glandes servant au stockage des spermatozoïdes. L'infundibulum est donc le site de la fécondation et de la formation de la membrane périvitelline externe (MPVE) (Nys and Guyot, 2011).

Vient ensuite le **magnum (3)** qui est la plus grande région de l'oviducte. Des muscles lisses aident à la décente de l'oocyte tandis que des cellules sécrétrices œuvrent à la formation de l'albumen.

L'**isthme (4**), qui est le lieu de formation des membranes coquillères débouche sur l'**utérus (5)**, qui est le lieu de formation de la coquille. Il participe également à l'hydratation de l'œuf (Nys and Guyot, 2011). Le tractus reproducteur débouche finalement sur le **vagin (6)** et le cloaque. La jonction utéro-vaginal contient également un site de stockage des spermatozoïdes.

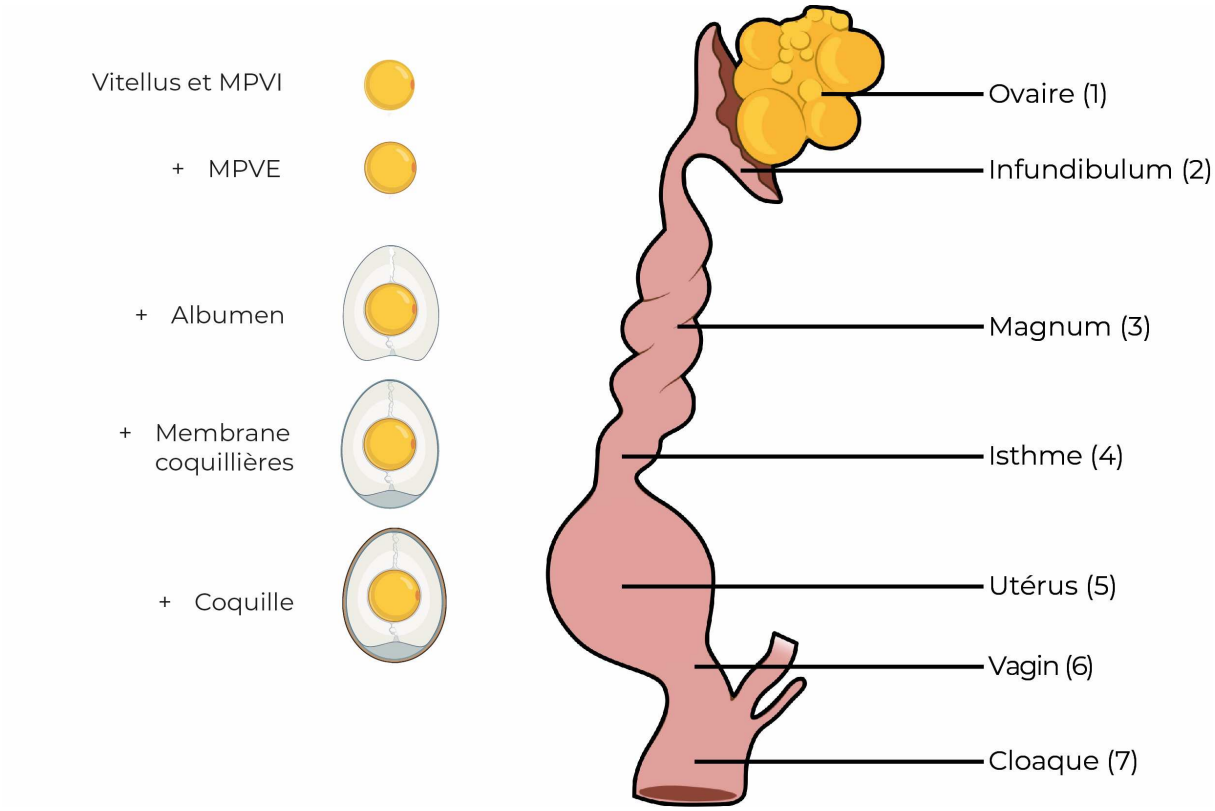


Figure 13. Schéma représentant les compartiments du tractus reproducteur de la poule (adapté de Nys and Guyot, 2011).

L'oviposition (c'est-à-dire la ponte) a lieu 24 à 25 heures après l'ovulation (Nys and Guyot, 2011). L'œuf final est donc composé du vitellus, de l'albumen, des membranes périvitellines internes (MPVI) et externes (MPVE), de la coquille et des membranes coquillières.

Le **vitellus** représente 30% du poids de l'œuf. Cent grammes de vitellus contiennent 16 g de protéines et plus de 30 g de lipides (Nys and Guyot, 2011). Tous les lipides contenus dans l'œuf se trouvent dans le vitellus exclusivement, sous forme de lipoprotéines. Les triglycérides représentent la majorité des lipides de l'œuf (environ 65 %), tandis que les phospholipides et le cholestérol sont présents à des niveaux moindres (environ 31 % et 4%, respectivement) (Nys and Guyot, 2011). Ces lipoprotéines sont originaires du foie. Elles sont transférées vers l'ovaire sous forme de précurseurs (vitellogénine et lipoprotéines de très basse densité (VLDL)). Ces précurseurs sont internalisés par endocytose après s'être liés à des récepteurs spécifiques des ovocytes. Le vitellus contient également d'autres nutriments tels que des sucres, des minéraux, des vitamines et des caroténoïdes, responsables de sa couleur (Nys and Guyot, 2011). Le vitellus représente donc une importante réserve de macro et micronutriments pour l'embryon.

L'albumen (1) est une structure aqueuse contenant protéines, minéraux, éléments traces et vitamines. Les protéines comptent pour 90% de la matière sèche de l'albumen. On en dénombre plus d'une centaine (Nys and Guyot, 2011). Beaucoup de ces protéines ont un important pouvoir antimicrobiens ce qui confère à l'albumen un double rôle nutritif et immunitaire (Nys and Guyot, 2011; Réhault-Godbert et al., 2019). Il contient également sucres, minéraux et vitamines. L'albumen est en réalité divisé en 4 compartiments distincts : les **blancs liquides** (**interne (3)** et **externe (4)**), le **blanc épais (5)** et les **chalazes (6)** permettant le maintien spatial de ces structures ainsi que du vitellus.

La **MPVI (7)** est composée de glycoprotéines permettant l'interaction avec les spermatozoïdes au niveau du disque germinal lors de la fécondation, et la **MPVE (9)** est constituée de peptides antimicrobiens.

Enfin, la coquille est une structure poreuse composée de carbonates de calcium principalement. Elle fournit le calcium nécessaire au développement des os de l'embryon et permet les échanges gazeux entre celui-ci et l'environnement extérieur. Elle contient également des protéines, dont le collagène bien qu'il ne soit pas prédominant (Nys and Guyot, 2011).

En dessous se trouvent les **membranes coquillières internes (10)** et **externes (11)**, ainsi que la **chambre à air (12)**.

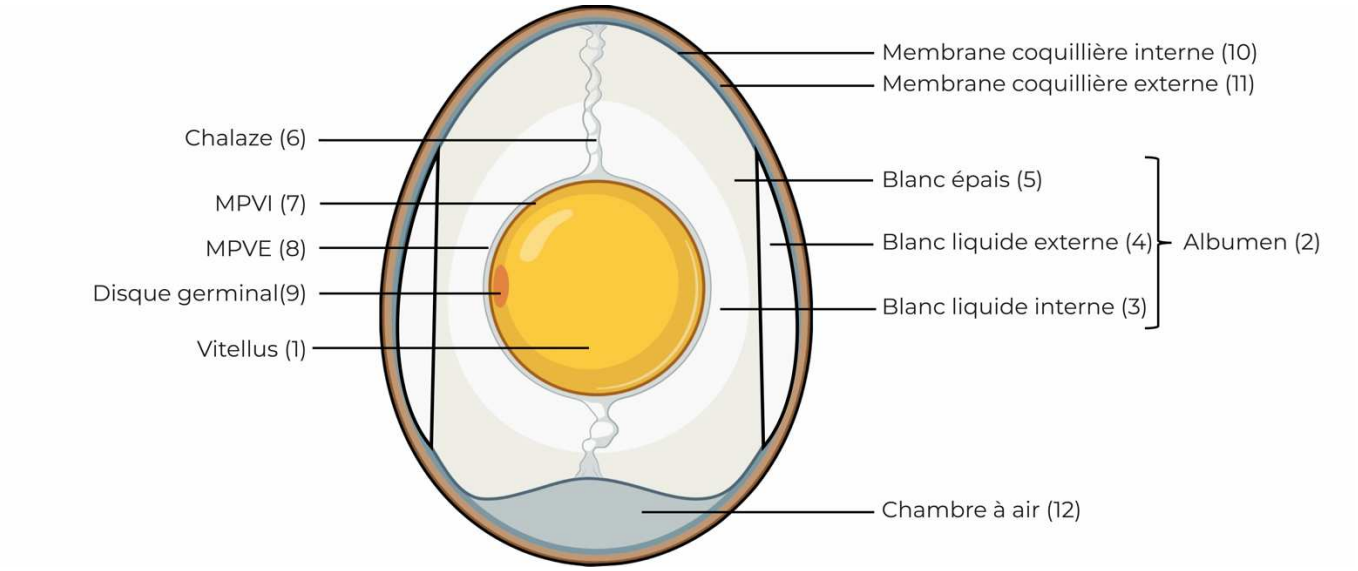


Figure 14. Schéma représentant les compartiments du tractus reproducteur de la poule (adapté de Guérin et al., 2010).

v. Le cycle de ponte

Chez la poule comme pour d'autres espèces aviaires, la ponte est déclenchée par l'association de facteurs hormonaux (hormones neurohypophyses et prostaglandines ovariennes et utérines) et l'intégration de la photopériode au niveau central (Nys and Guyot, 2011; Leska and Dusza, n.d.). La ponte a généralement lieu pendant les premières heures de la photophase (Nys and Guyot, 2011).

La poule pond de manière continue durant son cycle de ponte, à raison d'un œuf toutes les 24 à 26h, et ce à partir d'un âge compris entre 18 et 26 semaines selon la souche de poule (Bernardi, 2023). Le pic de ponte est atteint environ 4 semaines plus tard et s'étend sur 3 mois au-delà desquels la fréquence de ponte diminue progressivement. Tous les 8 jours environ, la ponte est mise en pause pour une durée avoisinant les 24h (Bernardi, 2023).

vi. Le développement embryonnaire

Le développement embryonnaire commence dans l'utérus. Il est donc initié avant l'oviposition. L'embryon subit une succession de clivages jusqu'à la ponte de l'œuf. Deux couches de milliers de cellules sont observables en bordure de vitellus. Les axes corporels s'établissent dans les 24h suivantes (Davey and Tickle, 2007). Le système circulatoire s'établit au cours du jour suivant. Les principaux membres et organes de l'embryon deviennent reconnaissables entre ED3 (c'est-à-dire du 3ème jour du développement embryonnaire) et ED12. Le développement embryonnaire s'accélère dans les jours précédant l'éclosion (Davey and Tickle, 2007).

> Une description détaillée et imagée des stades successifs du développement embryonnaire a été réalisée par Bellairs et Osmond en 2005 (Bellairs and Osmond, 2005).

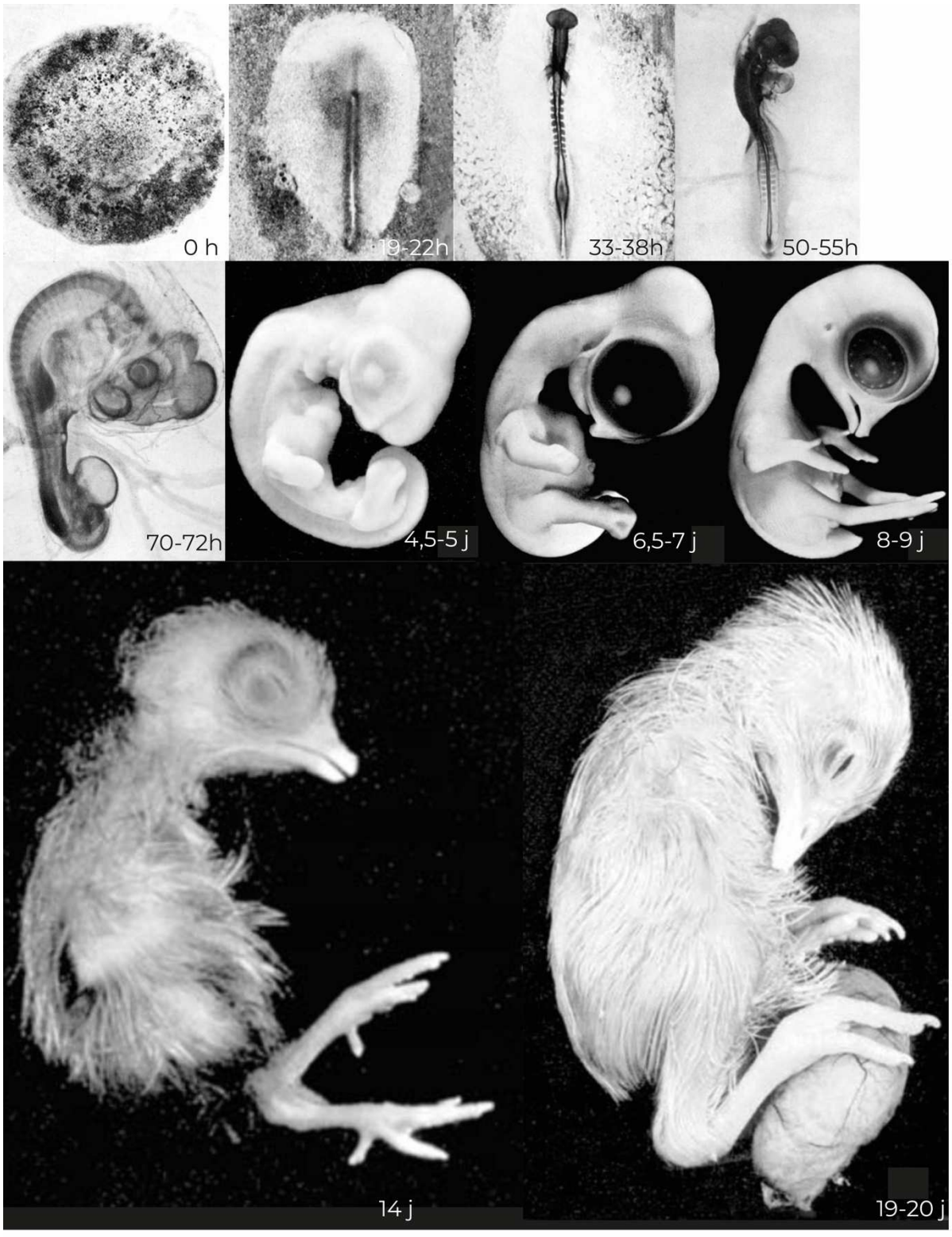


Figure 15. Photo de l'embryon de poule à différents stades de développement (adapté de Bellairs and Osmond, 2005).

La présence de structures appelées annexes embryonnaires permet de soutenir le développement de l'embryon tout au long du développement embryonnaire. La première annexe embryonnaire est le **sac vitellin**, contenant le vitellus ainsi que de petites quantités d'albumen (Givisiez et al., 2020). Cette structure très vascularisée entoure le vitellus et le relie à l'embryon. A partir d'ED3, la vascularisation du sac vitellin s'intensifie, permettant à l'embryon de puiser dans les réserves de vitellus (Estienne et al., 2022). A partir d'ED12, l'albumen est transféré dans le sac amniotique et l'embryon puise alors dans les réserves protéiques de l'albumen (Sugimoto et al., 1989). Le sac vitellin est internalisé par l'embryon à ED19. A l'éclosion, il est la seule source de nutriment pour l'embryon en attendant le premier apport exogène de nourriture (Givisiez et al., 2020). Il joue aussi un rôle immunitaire en permettant le transport des anticorps maternels vers l'embryon (Givisiez et al., 2020).

La deuxième annexe embryonnaire est le **sac amniotique**. L'embryon se développe à l'intérieur du sac amniotique qui amortie les chocs thermiques et mécaniques et prévient la déshydratation (Givisiez et al., 2020). A ED17, l'embryon absorbe le fluide amniotique ainsi que les nutriments qu'il contient. Cette absorption permet également la préparation des muqueuses intestinales en vue de l'éclosion (Givisiez et al., 2020).

Le **sac allantoïque** est un compartiment servant au stockage des excrétions de l'embryon. Enfin, le **chorion** (ou membrane vitelline) permet les échanges gazeux avec l'environnement extérieur. Il entoure l'embryon ainsi que toutes les autres annexes embryonnaires (Givisiez et al., 2020). Entre ED5 et ED7, la **membrane chorioallantoïque** (CAM, de l'anglais chorioallantoique membrane) est formée par la fusion du chorion et du sac allantoïque. Cette dernière structure est un important site de vascularisation pendant le développement embryonnaire. Cette propriété en fait un objet d'étude de choix, notamment pour des études de toxicologie. À l'approche de l'éclosion, la fusion entre la CAM la coquille permet le transport du calcium de la coquille d'œuf vers l'embryon. La coquille de l'œuf s'en trouve ramollie pour faciliter l'éclosion (Givisiez et al., 2020).

3. Le système digestif

i. Description

Comme chez les mammifères, le système digestif de la poule prend la forme d'un tube ou tractus digestif à deux extrémités. Les aliments l'atteignent après avoir été ingérés par le bec et le quittent après digestion, par le cloaque.

> Chez les oiseaux, le système reproducteur et le système digestif trouvent leur fin en l'orifice commun qu'est le cloaque, contrairement aux mammifères qui sont équipés d'organes dédiés.

Le voyage du bol alimentaire commence donc par le bec, la langue et la cavité orale qui permettent la capture, le broyage (superficiel), la lubrification puis l'ingestion de celui-ci (Turk, 1982; Klasing, 1999).

Le bol alimentaire descend alors le long de l'œsophage, accompagné par des contractions péristaltiques et facilité par une lubrification par des glandes muqueuses (Turk, 1982; Klasing, 1999) pour atteindre le **jabot (1)** puis le **proventricule (2)**. Le jabot est un organe principalement dédié au stockage des aliments. Les aliments n'y sont que faiblement digérés, par des amylases et par fermentation bactérienne (Turk, 1982). C'est dans le proventricule que commence vraiment la digestion. L'épithélium du proventricule contient des glandes à mucus et des glandes gastriques sécrétant de l'acide chloridrique (HCl) et des pepsines (Klasing, 1999).

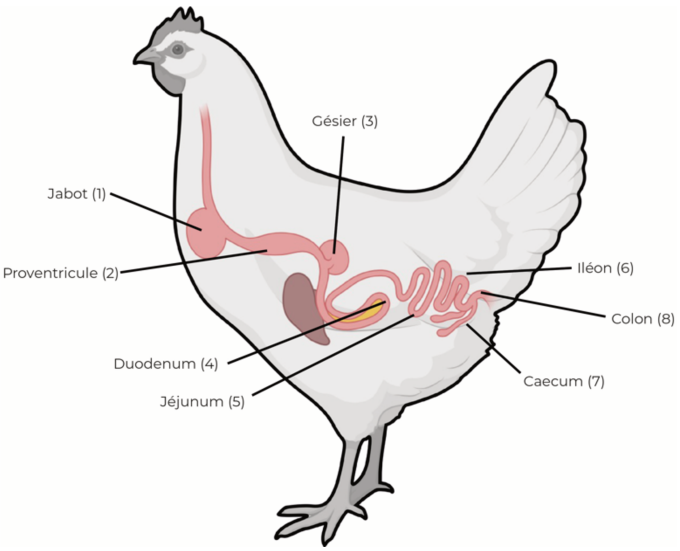


Figure 16. Les compartiments du tractus digestif de la poule.

Vient ensuite le **gésier (3)**, dont l'association avec le proventricule forme l'estomac de l'animal. Le gésier a deux fonctions principales. Premièrement la digestion mécanique du bol alimentaire, grâce à ses puissants muscles lisses répartis de façon asymétrique (Klasing, 1999). Ces muscles se contractent environ 3 fois par minute (Turk, 1982). Deuxièmement la digestion

enzymatique grâce aux enzymes et à l'acide chloridrique en provenance du proventricule. La lumière du gésier est donc tapissée d'une épaisse cuticule afin d'en protéger la muqueuse, ainsi que de structures protéiques rigides facilitant le broyage des aliments (Klasing, 1999).

A la suite du gésier se trouvent les différents compartiments de l'intestin. Le **duodénum (4)** ou boucle duodénale entoure le pancréas et en reçoit les sécrétions ainsi que celles du foie par deux canaux pancréatiques et deux canaux biliaires (Turk, 1982). La bile en provenance des hépatocytes est nécessaire à l'émulsion des lipides alimentaires (propriété amphiphile). Les sécrétions pancréatiques contiennent un arsenal d'enzymes permettant l'hydrolyse des protéines, des glucides et des lipides, ainsi que d'autres éléments présents dans l'alimentation (Turk, 1982).

S'en suivent le **jéjunum (5)** et l'**iléon (6)** (Klasing, 1999). L'épithélium de l'intestin contient des cryptes et des microvillosités, permettant une considérable augmentation de sa surface d'absorption. Une forte vascularisation permet alors de transférer les nutriments dans la circulation, puis vers le foie.

Le **caecum (7)** (deux structures tubulaires repliées vers la partie caudale de l'iléon (Turk, 1982)) et le **colon (8)** participent également à l'absorption des nutriments et de l'eau. Leur structure est similaire à celle de l'intestin, bien que le colon contient nettement moins de microvillosités et de cellules à mucus (Turk, 1982; Klasing, 1999). En plus de son rôle dans la digestion et l'absorption des nutriments, le caecum est un important site d'accueil de microorganismes désignés sous le nom de microbiote (intestinal, ou caecal dans le cas présent) et dont les interactions avec l'hôte sont cruciales dans le maintien de sa santé. Le tractus digestif prend fin en débouchant depuis le colon vers le cloaque, qui reçoit également l'uretère et la sortie du tractus reproducteur (Turk, 1982).

ii. Le microbiote

Le tractus digestif de la poule est colonisé par une grande diversité de microorganismes. Bien qu'elle n'ait pas été aussi étudiée que celle des rongeurs, de nombreux travaux ont caractérisé sa composition ainsi que les mécanismes derrière plusieurs de ses fonctions (Dunkley et al., 2007). On y trouve bactéries, archées, champignons et virus (Yeoman et al., 2012) qui interagissent en permanence entre eux et avec leur hôte. Ces organismes sont désignés sous le nom de microbiote (Berg et al., 2020), tandis que l'association de ces microorganismes, des

gènes qu'ils expriment et de leur hôte est désignée sous le nom de microbiome intestinal (Oakley et al., 2014; Berg et al., 2020). Cette association a une influence si grande sur l'hôte (qu'il soit humain, aviaire ou autre) qu'il est autorisé de considérer qu'il forme un « supra-organisme », en interaction permanente avec son microbiote (Oakley et al., 2014). La distribution de ces microorganismes et notamment des bactéries n'est pas constante ; ni dans l'espace, entre les compartiments du tractus digestif ; ni dans le temps, au cours des stades de développement de l'animal. Il existe également une forte variabilité taxonomique interindividuelle. Cependant, bien que les taxons représentés varient d'un individu à l'autre, les fonctions assurées par les communautés sont conservées entre les individus (Oakley et al., 2014).

a. La variabilité temporelle

La colonisation du tractus digestif par les bactéries est amorcée dès les premières heures suivant l'éclosion. *Streptococci* et *Enterobacteria* sont les premiers taxons détectables, dans le caecum d'abord puis dans le reste du tractus (Rehman et al., 2007). Le microbiote prendra alors environ deux semaines à se développer dans l'ensemble du tractus, bien qu'il lui faudra plus de temps pour se développer dans le caecum. Il évoluera de manière progressive durant toute la vie de l'animal (Rehman et al., 2007).

b. La variabilité spatiale

Il existe une grande variabilité spatiale dans la composition des communautés bactériennes du microbiote intestinal. La composition du microbiote dans les principaux compartiments de l'intestin est donnée en **Figure 17**.

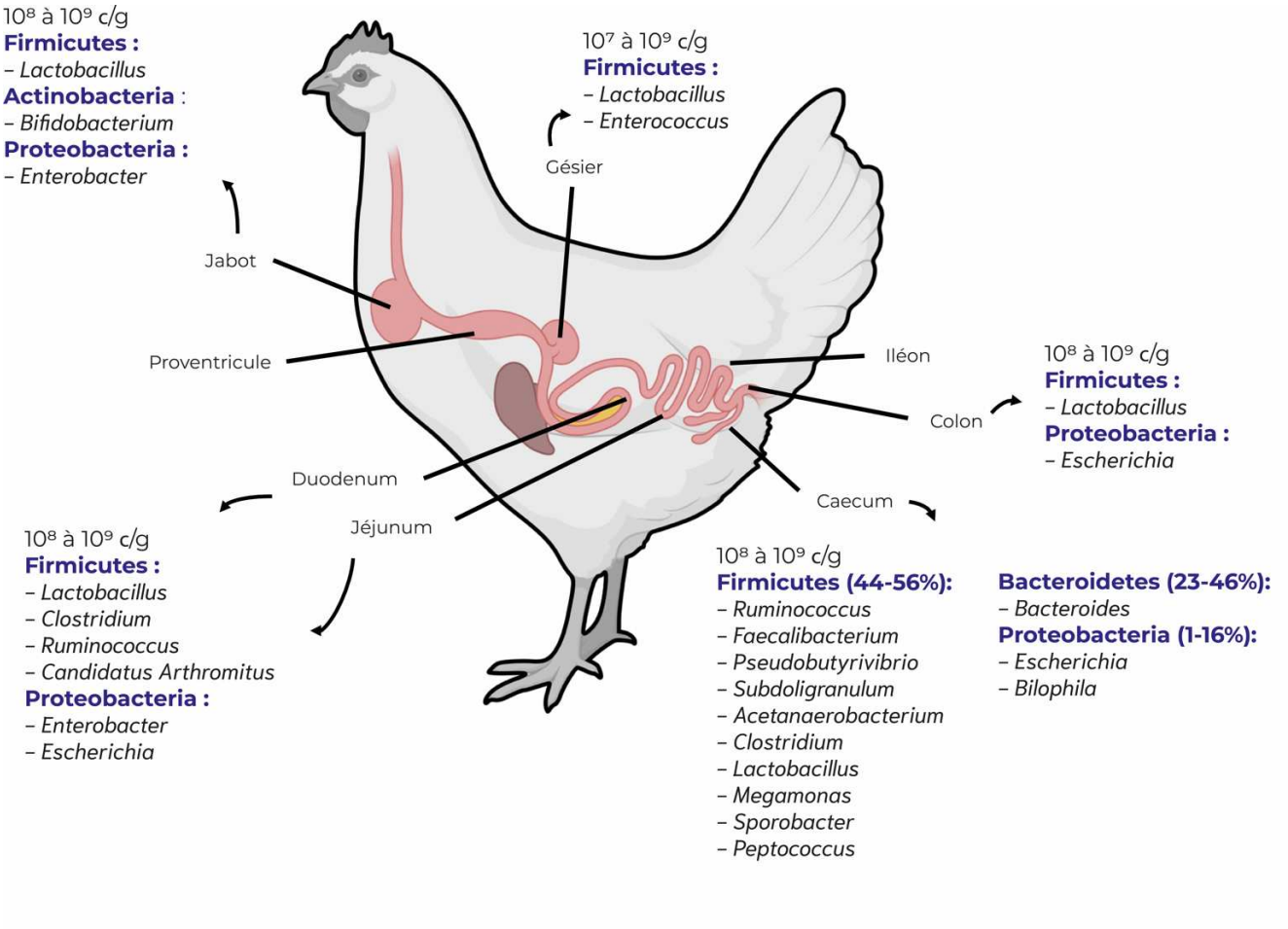


Figure 17. Composition du microbiote dans le tractus digestif de la poule (adapté de Yeoman et al., 2012).

c. Le microbiote caecal

De tous les compartiments de l'intestin de la poule, le caecum revêt un intérêt particulier pour l'étude du microbiote, car les densités cellulaires y sont les plus grandes (jusqu'à 10^{11} cellules par gramme de tissus) et la durée de séjour du digestat y est la plus longue (12 à 20 heures), permettant une plus grande fermentation bactérienne (Rehman et al., 2007; Oakley et al., 2014). Historiquement, l'étude du microbiote de ce compartiment a longtemps été difficile, car seules 10 à 60% des bactéries qui le composent sont cultivables. L'avènement et la généralisation encore relativement récentes des techniques de séquençage haut débit a donc permis de combler une partie des lacunes en la matière. Chez la poule adulte, le microbiote caecal est colonisé par des bactéries très majoritairement anaérobies strictes, ce qui rend leur culture d'autant plus compliquée (Rehman et al., 2007). Les *Firmicutes*, les *Bacteroides* et les *Proteobacteria* sont les phylums les plus courants dans le caecum de la poule, les *Actinobacteria* représentant l'essentiel du reste des communautés bactériennes (Oakley et al.,

2014). Le phylum majoritaire est *Firmicutes*. Il compte pour 50 à 90% des taxons identifiés dans le caecum (Oakley et al., 2014). La famille majoritairement représentée est *Clostridiales*, qui est une importante contributrice au métabolisme de molécules appelées acides gras à chaines courtes (Oakley et al., 2014). Leur importance dans le maintien de la santé de l'hôte est présentée dans la section suivante de ce travail.

d. Les fonctions du microbiote

Nutrition

Acides gras à chaines courtes (SCFA)

Le microbiote intestinal produit des enzymes capables de métaboliser certains polysaccharides complexes issus de l'alimentation, qui ne seraient pas digérés autrement (Beckmann et al., 2006). Il produit entre autres la glycoside hydrolase (GH), la polysaccharide lyase (PL), et la carbohydrate estérase (CE), dont les cellules du tractus digestif de la poule sont dépourvues (Conway Morris, 2003). Les polysaccharides atteignant le caecum sont alors fermentés et dégradés en monosaccharides par hydrolyse microbienne puis convertis en phosphoénolpyruvate (PEP) par glycolyse. Cet intermédiaire peut dès lors être pris en charge par des enzymes spécifiques pour aboutir à la formation de SFCA (acides gras à chaine courte, de l'anglais short chain fatty acids) (Blaak et al., 2020). La nature des SCFA ainsi produits dépend grandement de la composition microbienne, qui est elle-même sensible à l'alimentation de l'animal (Topping and Clifton, 2001), mais aussi du taux de fermentation, du temps de transit, de facteurs bactériens ou bien de l'hôte lui-même (Rehman et al., 2007). Les principaux SCFA produits sont l'acétate, le propionate et le butyrate (Topping and Clifton, 2001; Dunkley et al., 2007). D'autres SCFA (le valérate, l'isobutyrate, et l'isovalérate) sont également produits dans des proportions moindres (Dunkley et al., 2007).

SCFA	Principales Bactéries Impliquées
Acétate	Nombreuses bactéries anaérobies
Propionate	*Bacteroidetes*, *Negativicutes*, *Ruminococcus* et autres *Lachnospiraceae*
Butyrate	*Firmicutes* (*Eubacterium rectale/ Roseburia spp.* et *Faecalibacterium prausnitzii*)

Tableau 4. Principales bactéries productrices de SCFA (adapté de Blaak et al., 2020)

Ce tableau recense les principales bactéries impliquées dans la production de SCFA présentées dans les travaux de Blaak et al., 2020. Le lien entre ces bactéries et les SCFA a été identifié dans le microbiote colique de l'homme. A ma connaissance, la transposabilité de ces informations n'a pas été vérifiée dans le microbiote caecal de la poule.

Dans le tractus digestif, les SCFA peuvent moduler la perméabilité intestinale, la production de mucus ainsi que le transit (Blaak et al., 2020). Ils ont également des propriétés antibactériennes, et peuvent moduler la sécrétion de bile et d'enzymes pancréatiques (Rehman et al., 2007). De plus, leur oxydation constitue la principale source d'énergie des colonocytes, dont ils régulent également l'afflux sanguin et l'absorption d'électrolytes (Topping and Clifton, 2001; Barnett et al., 2022). Les SCFA sont également impliqués dans la synthèse de nombreuses hormones comme l'insuline ou GLP-1 (incretin glucagon-like peptide), suggérant une vraisemblable action du microbiote intestinal sur les fonctions métaboliques de l'hôte (Brubaker, 2018). Il a de surcroit été montré que les SCFA stimulent la synthèse de GLP-1 et de PYY par les cellules intestinales, qui à leur tour inhibent les neurones NPY/AgRP et stimulent les neurones POMC au niveau central, résultant en une réduction de l'appétit (Alhabeeb et al., 2021). Chez les rongeurs, les SCFA sont distribués dans l'organisme via la veine porte puis le foie (Topping and Clifton, 2001).

Métabolisme de l'azote

Des gènes impliqués dans le métabolisme des protéines, acides aminés et de l'azote ont été identifiés dans le microbiote caecal de la poule. Les acides aminés ainsi produits sont utilisés par la poule pour ses propres besoins, sa croissance et pour la production d'œufs (Yeoman et al., 2012). Cependant, des bactéries protéolytiques telles que *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp. et *Bacteroides* spp. produisent également de l'ammoniac et des amines biogènes toxiques (Rehman et al., 2007).

Métabolisme lipidique

Des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides ont été identifiés (Yeoman et al., 2012), et de récentes études montrent que de nombreux lipides (tels que le cholestérol ou l'acide linoléique) sont biotransformés et synthétisés *de novo* par le microbiote du tractus (Brown et al., 2023). Ces lipides peuvent alors avoir de nombreuses fonctions chez l'hôte, tels que le contrôle de l'inflammation, l'homéostasie du glucose ou encore la limitation du stress oxydatif (Brown et al., 2023).

Immunité

Le microbiote caecal exerce une influence sur l'immunité et l'inflammation des muqueuses, particulièrement par le biais des SCFA, en régulant la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, ainsi que le TNF-α (Inan et al., 2000; Schwab et al., 2007). Il constitue également une barrière essentielle contre les infections. Il a par exemple été montré que *Lactobacilli* et *Bifidobacteria* inhibent la colonisation par des pathogènes (Gibson and Roberfroid, 1995). Un microbiote sain limite donc la colonisation du tractus digestif par des bactéries pathogènes. Toute perturbation de l'écologie du microbiote peut favoriser la prolifération de bactéries pathogènes. Par exemple, *Salmonella* est une bactérie du microbiote capable de causer des infections pathogènes chez la poule, dont il a été démontré que des cultures anaérobies du microbiote caecal sont capable de limiter l'invasion (Ziprin et al., 1993; Nisbet, n.d.). De plus, des SCFA (propionate et acétate principalement (Dunkley et al., 2007)) produits par le microbiote caecal ont un effet bactériostatique sur cette même bactérie, sans pour autant inhiber des bactéries bénéfiques comme *Lactobacillus* ((Van Der Wielen et al., 2000)).

Objectifs de la thèse

De nombreuses espèces d'oiseaux sont en déclin voire menacées d'extinction. Ce phénomène est particulièrement prononcé pour les espèces évoluant aux abords de zones agricoles. L'intensification des pratiques agricoles soumet en effet ces espèces à de nombreuses pressions. Parmi elles, l'introduction de pesticides serait une cause majeure du déclin des oiseaux dans ces régions. Les herbicides les plus couramment utilisés en agriculture sont les herbicides à base de glyphosate. Leur toxicité a été étudiée à mainte reprises chez de nombreuses espèces des mammifères, pour lesquelles des atteintes sur le métabolisme et la reproduction ont été identifiées. Cependant, la toxicité des herbicides à base de glyphosate pour les espèces aviaires n'a été que peu explorée. Les rares études disponibles sur la question présentent des conclusions contradictoires. Alors que certaines études indiquent que les herbicides à base de glyphosate ne sont pas directement nocifs pour les oiseaux mais plutôt pour les invertébrés dont ils se nourrissent et pour leurs habitats, d'autres études rapportent des effets délétères directes sur leur métabolisme et sur leur reproduction.

La présente thèse a donc pour objectif de caractériser les effets d'un herbicide à base de glyphosate sur le métabolisme et la reproduction des espèces aviaires, plus particulièrement de la poule. Sont également évalués l'effet du GBH sur le microbiote caecal des animaux, ainsi que sa capacité à satisfaire certaines des caractéristiques clés des perturbateurs endocriniens. Le modèle d'étude retenu est la poule à trois différents stades de développement ; la poule adulte, la poule en croissance et l'embryon. En examinant ces données, les scientifiques pourront ainsi mieux évaluer les risques environnementaux liés à l'utilisation des herbicides à base de glyphosate, et guider des actions de conservation plus informées visant à préserver la biodiversité aviaire et les équilibres écologiques.

Matériel et méthodes

I. Considérations éthiques

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux Directives Nationales Françaises pour les soins et l'utilisation des animaux à des fins de recherche. Le certificat d'autorisation d'expérimenter sur des animaux vivants numéro APAFIS 21549–2019071809504554v3 (date d'approbation : 6 novembre 2021, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, et un avis du comité d'éthique du Val de Loire n°19) a été délivré.

II. Herbicide à base de glyphosate utilisé

Le Gallup® Super 360 est le GBH utilisé dans toutes les expériences de ce travail. Il a été obtenu auprès de la société Axéréal (Monnaie, France). Le produit se présente sous la forme d'une solution aqueuse et contient 360 g/L de Glyphosate (485,8 g/L de sel d'isopropylamine). Le détail des autres ingrédients de la formulation ne nous est pas fourni.

Le produit a été utilisé soit directement sous sa forme aqueuse diluée dans des milieux de culture cellulaires et tampons PBS, soit mélangé à la nourriture des animaux dont les ingrédients sont donnés en **Tableau 5**. Les mélanges ont été préparés par des animaliers titulaires de la certification « Certiphyto », comme recommandé par la loi française.

Ingrédient	Composition (%)
Maïs	39,64
Blé	23,86
Tourteau de soja	29,3
Son de blé	0
Huile de soja	2,2
Huile de tournesol	1
Bicarbonate de sodium	0,18
Carbonate de calcium	0,86
Phosphate	2,06
Sel	0,3
Méthionine DL	0,1
Lysine	0
Prémix minéral	0,5
Soja	0

Tableau 5. Composition de la nourriture des animaux adultes.

III. Techniques de laboratoire

1. Dosage du glyphosate et de l'AMPA plasmatiques

Le glyphosate et l'AMPA ont été mesurés dans le plasma sanguin des animaux après une réaction de dérivation utilisant le FMOC-Cl (chloroformate de 9-fluorénylméthyl), en collaboration avec le Dr S. El Balkhi (Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Limoges, France). Le protocole permettant la réalisation du dosage est détaillé dans Serra et al., 2021a.

2. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay dans le plasma sanguin

Le stress oxydatif plasmatique a été estimé en mesurant la quantité de MDA (malondialdéhyde) qui réagit avec l'acide 2-thiobarbiturique. Cette manipulation permet en réalité de mesurer la peroxydation lipidique, que nous utilisons comme indicateur de stress oxydatif. Les valeurs TBARS du plasma traité à l'EDTA ont été mesurées en utilisant la méthode modifiée de (Grotto et al., 2007). Une courbe étalon du 1,1,3,3-tétraméthoxypropane a été utilisée et la concentration a été exprimée en nmol de MDA/mL de solution.

3. Dosages des lipides et de l'acide urique dans le plasma sanguin

Les concentrations plasmatiques en triglycérides, en acide urique, en phospholipides et en cholestérol ont été déterminées par dosage enzymatique à l'aide de kits spécifiques de Biolabo SAS (Maizy, France) : triglycérides (référence : LP80519), acide urique (référence : 80,351), phospholipides (référence : 99,105) et cholestérol (référence : 80,106, Biolabo SAS, Maizy, France). Les mesures ont été effectuées selon le protocole du fabricant. Pour tous ces dosages, les variations inter- et intra-analyse étaient inférieures à 15%.

4. Mesure des niveaux d'expressions de transcrits (qPCR)

i. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux issus de tissus ou de cellules ont été extraits par broyage (ou par grattage des plaques dans le cas des cellules) et homogénéisation dans 1 ml de réactif TRIzol®. Un appareil Ultra-Turrax a été utilisé pour le broyage des tissus, conformément aux recommandations du fabricant (Invitrogen par Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Deux cents microlitres de chloroforme ont été ajoutés et les échantillons ont été agités fortement puis centrifugés pendant 15 minutes (4°C, 1500 g). Le surnageant a été prélevé et 500 µl d'isopropanol ont été ajouté. Les échantillons ont été vortexés et sont restés sur glace pendant au moins 10 minutes. Les échantillons ont alors été centrifugés à nouveau pendant 10 minutes (4°C, 1500 g) et le surnageant a été éliminé. Un lavage du culot contenant les ARN a été effectué en ajoutant 1 ml d'éthanol 70%. Après agitation les échantillons ont été centrifugés pendant 5 minutes (4°C, 7500 g) et le surnageant d'éthanol a été éliminé. Les résidus d'éthanol ont été éliminés par évaporation (bouchon ouvert) pendant 10 minutes puis les ARN ont été dissouts dans de l'eau déminéralisée stérile. La concentration en ARN total de chaque échantillon a été mesurée avec un spectrophotomètre Nanodrop (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) par mesure de l'absorbance à 260 nm, et la pureté de ces ARN a été estimée par un calcul du ratio des absorbances à 260 et 280 nm.

ii. Rétrotranscription

Des échantillons d'ADNc ont été obtenus par rétrotranscription (RT) des ARN totaux obtenus. Dans une plaque 96 puit, 1 µg d'ARN total a été ajouté à mix contenant 0,5 mM de chaque désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP et dCTP), 2 M de tampon RT-Buffer, 15 µg/µL d'oligodT, 0,125 U d'inhibiteur de ribonucléases et 0,05 U de RT-MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). La plaque contenant les mix a été placée dans un thermocycleur PE9700 (Perkin Elmer) pendant 1h à 37 °C.

iii. Quantitative Polymerisation Chain Reaction (qPCR)

Dans une plaque 384 puits, 250 nM d'amorces spécifiques sens et antisens (Invitrogen ™ de Life Technologies ™, Villebon sur Yvette, France) ont été mélangés au réactif SYBR Green 1X

(Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) et à 3 µL d'ADNc précédemment obtenus dilués au 10ème. La plaque a ensuite été placée dans un appareil appareil MyiQ Cycle (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) afin de soumettre les échantillons aux cycles de PCR. La procédure suivante a été appliquée : incubation (2 min à 50°C), dénaturation (10 min à 95°C) et 40 cycles de PCR (30 s à 95°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C). L'expression des gènes a été rapportée à la moyenne géométrique (geom) de l'expression de trois gènes de référence (*GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), *ACTB* (Beta Actin) et *EEF1α* (facteur d'élongation eucaryotique 1 alpha)). Pour chaque gène cible, l'expression a été calculée en fonction de l'efficacité des amorces (E) et du cycle de quantification (Cq), selon la formule : $Ct = E^{-Cq}$. L'expression relative du gène cible par rapport aux trois gènes de référence a alors été calculée, en appliquant la formule suivante :

$$Expression\ relative = \frac{2^{geom}}{2^{Ct}} \text{ x } 100$$

Les séquences des amorces utilisées dans ce travail sont données dans le **Tableau 6** ci-après.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
GAPDH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGATCTCGC
EEF1α	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TCACATGAGACAGACGGTTGC
β-actin	ACGGAACCACAGTTTATCATC	GTCCCAGTCTTCAACTATACC
Adipolin	CCTATCCAACAGCGAGGAGC	CATCTGGGCGGTGGACAAAG
AdipoQ	ACAGGTGCAGAAGGACCGAG	AAGACAGAGCCGCTTGCTTG
AdipoR1	GAATACACACCGAGACGGGC	GCCCAAGACGCAGACAATGG
AdipoR2	GAGACTGGCAACATCTGGAC	TGCGATGCCCAGGACACAAA
Apelin	CTGGAGCTGCCCTGTGG	TGACAGACACGGTGACCAG
APJ	CTCGGGCAGCTTCTCCTC	GCGGAAGAGCGTCTCCTG
APOA4	GTACTTCACTGAGCTGGGCA	CTCCTCGGCGTATGAGTTCG
ASTL	CCAGGGATGGGATTGTTCGT	AGTCACGTTCTGTCTTGCGT
BSEP	TGCAAAGCAAAGGAGACT	GCAATGGATAATGGAGGG
Catalase	ACTGCAAGGCGAAAGTGTTT	GGCTATGGATGAAGGATGGA
CCRL2	CACGCAGTGTTTGCTTTAAAAGC	CAACAGCCCACGTGACAATG
Ces1	TGACCATTCAATATCGCC	ACACTTTCTCCTCCCGCT
Chemerin	CGCGTGGTGAAGGATGTG	CGACTGCTCCCTAAAGAGGAACT
CMKLR1	CGGTCAACGCCATTTGGT	GGGTAGGAAGATGTTGAAGGAA
COLEC12	GCGCCAAGATGAAAGACGAT	GCCACCTGTCACATTGTCCA
COX-2	TGTCCTTTCACTGCTTTCCAT	TTCCATTGCTGTGTTTGAGGT
CYP11A1	TGAATATCATCAGCCCCCGC	GTAGGGCTTGTTGCGGTAGT
CYP19A1	TGTTCCATCACGCTATTT	GATTCTTGTTTGGGCTTC
CYP1A1	AATGCTCGTTTCAGTGCCTTC	CCTCCCCTGTCCTTTTCTCC
CYP1A2	AACCCAGAGCGTTTCCTCAA	CTCCCACTTGCCTATGTTTTCC
CYP1A4	CDCAGGACGGAGGCTGACDCAAGG	GCDCAGGATGGTGGTGAGGAAGA
CYP1A5	CTCTGCTCTGTTCDCAAAGCGTCTC	GCTCGCCTGCDCACCDCATCDCACT
CYP2A6	CTGCAGAGAATGGCATGAAG	CCTGCAAGACTGCAAGGAA
CYP2C	CAAAATGGAACAGGAGAAAGAGAAC	CCCGCAAGGAACAAGTCAA
CYP2H1	TCATCCACGAAATCCAAAG	GATGGGAGACAGCAAAGG
CYP2H2	GGCCCGGATGGAGCTATT	TTGCCGCCGAGGTGACTA
CYP3A	CCAAGCTATGCTCTTCACCG	TCAGGCTCCACTTACGGTCT
CYP3A37	AAATCAGACAGCAATGGGAGC	GGTAAGCCAGGTAACCAAGTGT
EPHX1	GAAGATGTCAGGCGGATGTT	CAGGAGAGTCATTCAAACCACA
FABP4	GCACCTGGAAGCTCCTTTCT	ATTAGGCTTGGCCACACCAG
FXR	AAAGCCGTTCTGTGCGTT	GGATTGGTGGGGTTCCTG
GPR1	ACCTGCCTGAGGAAGAAGAA	AAAGGCCAGTGGAAGCCCAT
GPX1	AACCAAATTCGGGCACCAG	CCGTTCACCTCGACTTCTC
GSTA3	AGACCAGAGCCATCCTCAAC	TGCCAGTCCTTCCACATACA
GSTA4	GCTACATCGCAGGGAAATACA	TGGAGAGAAAGGAAACACCAA
HMGCR	ATGTCAGGAGTGCGACAACT	CGTCCTTCACGACTCTCTCG
HSD3β	TACTGCTGGAAGAAGATGAG	CAAGGTGTCAATGATGGAAG
Hsp27	ACACGAGGAGAAACAGGATGAG	ACTGGATGGCTGGCTTGG
Hsp40	GGGCATTCAACAGCATAGA	TTCACATCCCCAAGTTTAGG
Hsp60	AGCCAAAGGGCAGAAATG	TACAGCAACAACCTGAAGACC
Hsp70	CGGGCAAGTTTGACCTAA	TTGGCTCCCACCCTATCTCT
Hsp90	TCCTGTCCTGGCTTTAGTTT	AGGTGGCATCTCCTCGGT
IFNα	CAACGACACCATCCTGGACA	GGGCTGCTGAGGATTTTGAA
IFNα	CAACGACACCATCCTGGACA	GGGCTGCTGAGGATTTTGAA

IFNβ	TCCTGCAACCATCTTCGTCA	CACGTCTTGTTGTGGGCAAG
IgA	GTCACCGTCACCTGGACTACA	ACCGATGGTCTCCTTCACATC
IL-1β	AGGCTCAACATTGCGCTGTA	CTTGTAGCCCTTGATGCCCA
IL-22	TGTTGTTGCTGTTTCCCTCTTC	CACCCCTGTCCCTTTTGGA
IL-6	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA
IL-8	CTGCGGTGCCAGTGCATTAG	AGCACACCTCTCTTCCATCC
iNOS	CCTGGAGGTCCTGGAAGAGT	CCTGGGTTTCAGAAGTGGC
NF-κB	TCAACGCAGGACCTAAAGACAT	GCAGATAGCCAAGTTCAGGATG
PGA5	TCCGTCTACCTGAGCAAGGAT	AAGCAGGCGACGTACTTGTT
PGC	ATCGGGATTGAGGACTTCGC	TGAAGACCTGGTTGGGAACG
PLIN1	GCCAAGGAGAACGTGCT	TCACTCCCTGCTCATAGACC
PTGES	GTTCCTGTCATTCGCCTTCTAC	CGCATCCTCTGGGTTAGCA
RARRES2	CGCGTGGTGAAGGATGTG	CGACTGCTCCCTAAAGAGGAACT
SLCO1B3	CAGGACTCTCGCTGGGTGG	TGGCTTTCAGGGGCTTTTT
SOD1	CCTCCCTTTGCAGTCACATT	ATTACCGGCTTGTCTGATGG
StAR	TGCCATCTCCTACCAACA	CATCTCCATCTCGCTGAAG
THRSP	GTTCTGACCGACCTCACCAA	GTGGGACTTGGCACAGGAAT
TNF-α	GCCCTTCCTGTAACCAGATG	ACACGACAGCCAAGTCAACG
Visfatin	CAGATCCGGAGTGTTACTGG	CCTATGCCAGCAGTCTCTTG

Tableau 6. Séquences des amorces qPCR.

5. Mesure des niveaux d'expressions protéiques (Western Blot)

Les protéines totales issues de tissus ou de cellules ont été extraites par broyage (ou par grattage des plaques dans le cas des cellules) et homogénéisation dans 1 ml du tampon d'extraction suivant : (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 % Igepal) contenant des inhibiteurs de protéases (2 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin) et de phosphatases (100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate). Un appareil Ultra-Turax a été utilisé pour le broyage des tissus, conformément aux recommandations du fabricant (Invitrogen par Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Les lysats ont été centrifugés pendant 20 minutes à 16 000 × g et 4 °C, et les protéines contenues dans les surnageants ont été collectées et conservées sur glace. Les concentrations protéiques ont été mesurées en utilisant le dosage des protéines à l'acide bicinchoninique (BCA) (Interchim, Montluçon, France). Les lysats (80 µg) ont été mélangés avec un tampon Laemmli 5X, et les protéines ont été dénaturées pendant 5 minutes à 95 °C. Les protéines ont alors été chargées dans un gel d'électrophorèse en polyacrylamide-sulfate de sodium (12% ou 15%) et soumises à une électrophorèse pendant 1 heure à 70 V puis 2 heures à 90 V dans un tampon de migration (**Tableau 7**) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 1h30 à 80 V dans un tampon de transfert (**Tableau 7**). Les membranes ont été bloquées avec un tampon Tris-Buffered Saline Tween contenant 0,05% de Tween 20 et 5% de lait écrémé pendant 30 minutes à température ambiante. Les membranes ont alors été incubées à 4 °C pendant la nuit, avec les anticorps primaires appropriés (**Tableau 8**) dilués 1000 fois dans du lait. Le jour suivant, les membranes ont été lavées dans la solution de TBS Tween puis incubées avec l'anticorps secondaire approprié (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-coquette, France) dilué 5000 fois, couplé à la peroxydase HRP (Horse Radish Peroxidase) pendant 90 minutes à température ambiante. Les protéines d'intérêt ont été détectées par chemiluminescence améliorée (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) en utilisant la G-box SynGene (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) et le logiciel GeneSnap (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Les protéines ont finalement été quantifiées avec le logiciel GeneTools (version 4.01.02; Syngene). Les résultats ont été exprimés en intensité de signal des protéines d'intérêt en unités arbitraires après normalisation par l'intensité du signal de la vinculine.

Tampon	Formulation	Concentration finale
Tampon Laemmli 5X	Glycérol	50%
	SDS	350 mM
	Hepes pH 7,6	20 % à 1 mM
	2β-mercaptoéthanol	25%
	Bleu de Bromophénol	1 mg
Tampon de migration	Tris Base (ultra pure)	50 mM
	Glycine	400 mM
	EDTA	2 % à 0,1 M
	SDS 10 %	1%
Tampon de transfert	Tris Base (ultra pure)	20 mM
	Glycine	200 mM
	Méthanol	20%
	SDS 10 %	0,10%
Tampon TBS Tween	Tris HCL pH 7,6	2 mM
	NaCl	15 mM
	Tween 20	0,10%
Rouge Ponceau 10X	Acide sulfosalycilique	1,2 M
	Ponceau S	0,3 M
	Acide trichloroacétique	1,8 M

Tableau 7. Composition des tampons utilisés pour les analyses Western-Blot.

		Dilution	Espèce hôte	Poids moléculaire (kDa)	Fournisseur
Anticorps primaires	Chémérine	1/1000	Souris	18	Agrobio
	Adiponectine	1/1000	Lapin	25-28	Agrobio
	Visfatine	1/1000	Lapin	52	Agrovio
	Apeline	1/1000	Lapin	16	Novus Biological
	Adipoline	1/1000	Lapin	25-32	Novus Biological
Anticorps secondaire	Lapin	1/50 000	Chèvre		Biorad
	Souris	1/50 000	Chèvre		Interchim

Tableau 8. Anticorps utilisés pour les analyses Western blot

6. Mesure de la viabilité cellulaire *in vitro*

Les mesures de viabilité cellulaire *in vitro* ont été réalisées avec un kit commercial Cell Counting Kit-8 (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) selon les recommandations du fabricant. Les absorbances ont été mesurées à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

7. Mesure de la prolifération cellulaire *in vitro*

Les mesures de prolifération cellulaire *in vitro* ont été réalisées avec un kit commercial BRDU ELISA assay commercial kit (Roche, REF 11647229001), selon les recommandations du fabricant. Les absorbances ont été mesurées à 405 (maximum d'absorbance du produit) et 492 nm (référence dont la valeur d'absorbance est soustraite aux valeurs d'absorbance mesurées à 405 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre.

8. Dosage de la progestérone

La progestérone présente dans le milieu de culture des cellules de la granulosa a été dosée au sein du laboratoire de dosage de l'UMR PRC (dosage ELISA ; sensibilité : 0,4 ng/mL ;

coefficients de variations intra et inter-essais <10 % et <4,3 %, respectivement (Canépa et al., 2008)).

9. Dosage de la chémérine plasmatique

La chémérine plasmatique a été dosée dans le plasma des animaux par la méthode ELISA. Le kit ELISA chémérine (MBS738819 ; sensibilité de 0.1 ng/mL, coefficient de variation intra-test <15%,187, MyBioSource, San Diego, USA) a été utilisé selon les recommandations du fabriquant.

IV. Protocole Toxicocinétique - Détermination de paramètres toxicocinétiques chez la poule adulte à la suite d'une exposition alimentaire aigue

Le premier protocole a été réalisé sur des poules adultes âgées de 36 semaines (n = 20). Ces animaux ont été exposés de manière aiguë au GBH par leur alimentation. Dix poules de chair ROSS 308 ont été exposées au GBH par leur alimentation, à une dose équivalente à 40 mg de glyphosate/kg de poids corporel (soit 40% de la NOAEL déterminée par l'EFSA (European Food Safety Authority (EFSA), 2018a)). En parallèle, dix autres poules ont reçu une alimentation normale, c'est-à-dire sans ajout de GBH (**Tableau 5**). Les animaux ont eu un accès libre à la nourriture, contaminée pour les uns et non contaminée pour les autres, pendant 30 minutes. La totalité de la nourriture était consommée par l'ensemble des animaux à l'issu de ces 30 minutes. Des échantillons de sang ont été prélevés par le sinus veineux occipital des animaux avant l'accès à la nourriture (0 min), après 30 min, 3, 6, 12, 24, 30 et 48h. Le plasma sanguin a été obtenu après centrifugation (10 minutes, 4500 g). Le glyphosate et l'AMPA ont alors été dosés selon la méthode présentée en section **Techniques de laboratoire - Dosage du glyphosate et de l'AMPA plasmatiques**. Ces données ont été utilisées pour construire un modèle mathématique à partir duquel les paramètres toxicocinétiques ont été déterminés, en collaboration avec Jérôme Henri (Laboratoire de Fougères, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), 10B rue Claude Bourgelat, Fougères 35306, France).

V. Protocole Adulte - Étude de l'impact d'un herbicide à base de glyphosate chez la poule de chair adulte

1. Métabolisme et microbiote caecal

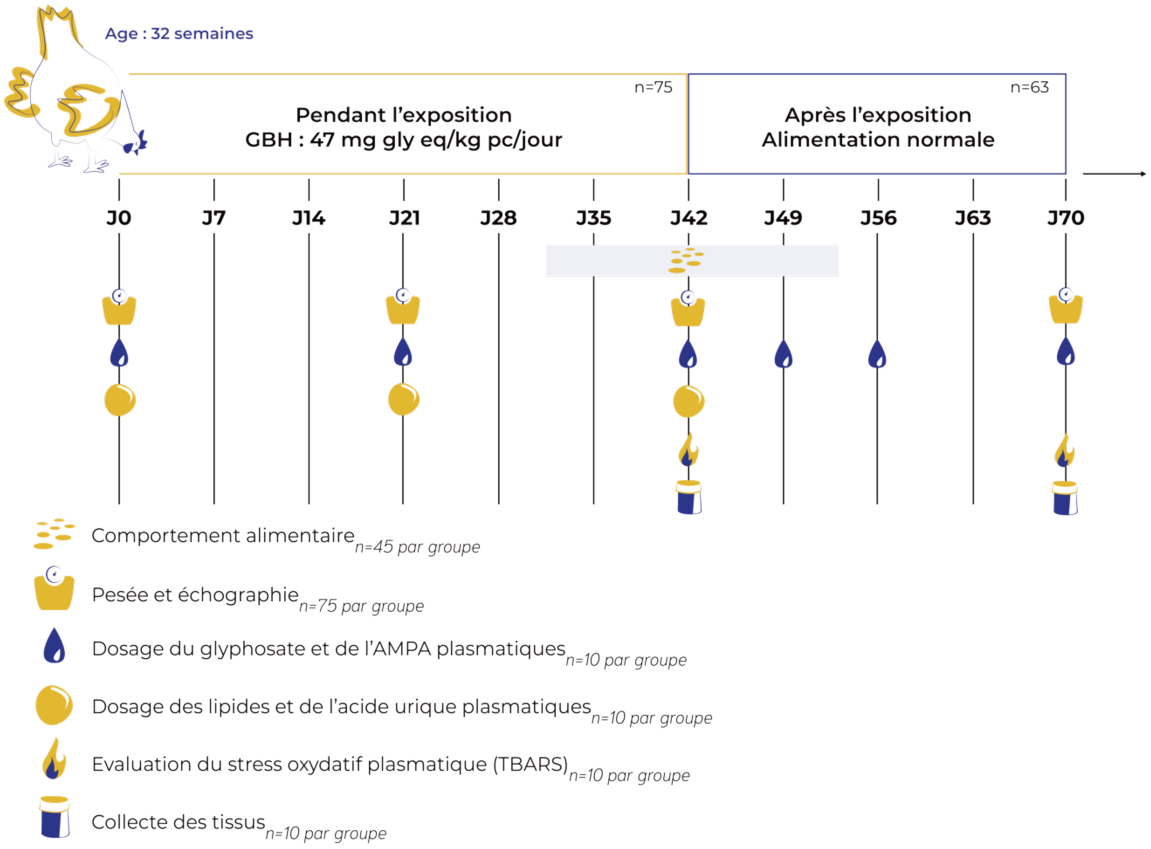


Figure 18. Protocole Adulte (adapté de Fréville et al., 2022).

La seconde partie de ce travail vise à évaluer l'impact d'une exposition alimentaire chronique à un GBH sur plusieurs paramètres métaboliques, ainsi que leur possible réversibilité chez la poule de chair. Le protocole expérimental est présenté sous forme de schéma en **Figure 18** ci-dessus.

Cent cinquante poules âgées de 32 semaines (pic de ponte) ont été utilisées. Elles ont été réparties en groupes de cinq oiseaux dans 30 parquets de 3 m^2 chacun. Soixante-quinze poules (réparties dans 15 parquets) ont été exposées pendant 42 jours au GBH via leur alimentation (poules GBH, pour une dose de GBH équivalente à 47 mg de glyphosate/kg de poids corporel/jour), et 75 poules (également réparties dans 15 parquets) ont été nourries avec une alimentation contrôle, sans GBH (animaux témoins, CT) (du jour 0 au jour 42 du protocole).

Après 42 jours d'exposition (soit à partir de J43), les animaux du groupe GBH ont basculé vers une alimentation contrôle, sans GBH (poules Ex-GBH et Ex-CT).

Le comportement alimentaire des animaux a été évalué par un comptage des coups de becs donnés à la mangeoire au cours des distributions quotidiennes de nourriture. Trois poules de chaque parquet ont été surveillées pendant 8 secondes, au cours desquelles les coups de becs étaient dénombrés. Cette surveillance a été réalisée à J31, J32, J35, J36 (pendant l'exposition au GBH) et J49, J50, J51 et J52 (après exposition).

Tous les animaux ont également été pesés individuellement à J0, J21, J42 et J70 (J0 à J42 ; CT (n=75), GBH (n =75) - J42 à J70 ; Ex-CT (n=66), Ex-GBH (n=66)). Les valeurs de poids des animaux ont permis de calculer leur prise de poids entre chaque date, selon la formule suivante :

$$Gain\ de\ poids\ \left(\frac{g}{jour}\right) = \frac{poids\ corporel\ final\ (g) - \ poids\ corporel\ initial(g)}{Nombre\ de\ jours\ entre\ les\ mesures}$$

L'épaisseur de la couche de gras abdominal a été mesurée par échographie aux mêmes dates sur les mêmes animaux.

Des échantillons de sang ont été régulièrement prélevés sur des poules (n=10) pour doser le glyphosate et l'AMPA dans leur plasma sanguin, selon le protocole présenté en section **Techniques de laboratoire - Dosage du glyphosate et de l'AMPA plasmatiques**. Ces prélèvements ont également permis de mesurer le stress oxydatif plasmatique et les niveaux de lipides circulants, selon le protocole détaillé en section **Techniques de laboratoire - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay dans le plasma sanguin et - Dosages des lipides et de l'acide urique dans le plasma sanguin**. Neuf poules CT et neuf poules GBH ont été abattues à J42, et 12 poules Ex-CT et 12 poules Ex-GBH ont été abattues à J70 pour récupérer des échantillons biologiques. Tous les animaux ont été tués par électronarcose et saignés selon les recommandations du comité d'éthique.

Les organes suivants ont été prélevés et des mesures des niveaux de différents transcrits ont été réalisés par qPCR, selon le protocole détaillé en section **Techniques de laboratoire - Quantitative Polymerisation Chain Reaction (qPCR)** :

- Foie, afin de quantifier l'expression de transcrits liés à la biotransformation.
- Gésier, afin de quantifier l'expression de transcrits liés au stress et à l'immunité.
- Proventricule, afin de quantifier l'expression de transcrits liés à la digestion.
- Rate, afin de quantifier l'expression de transcrits liés à l'immunité.
- Caecum, afin de quantifier l'expression de transcrits liés à l'immunité.

La collecte des caeca des animaux a également permis le séquençage et l'identification des taxons bactériens qui les colonisaient, aux niveaux ordre, famille et genre (CT (n =5), GBH(n=9), Ex-GBH(n=10), Ex-CT(n=5)). Ce travail a été réalisé par la plateforme GeT-PLaGe platform (Toulouse, France)(Fréville et al., 2022). Les contenus caecaux ont été collectés (35 mg) pour réaliser un dosage des SCFA caecaux (CT (n =8), GBH(n=8), Ex-GBH(n=12), Ex-CT(n=1)). Les échantillons ont été conservés à -80°C, puis la concentration en SCFA de chaque échantillon a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse en collaboration avec Élise Maximin (Université Paris- Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France).

2. Reproduction et descendance

En parallèle des prélèvements et des analyses réalisées durant le **Protocole Adulte**, des inséminations artificielles ont été réalisées sur les animaux afin d'évaluer l'impact de l'alimentation enrichie en GBH sur la reproduction des animaux, ainsi que sur le développement et le comportement de leur descendance (**Figure 19**).

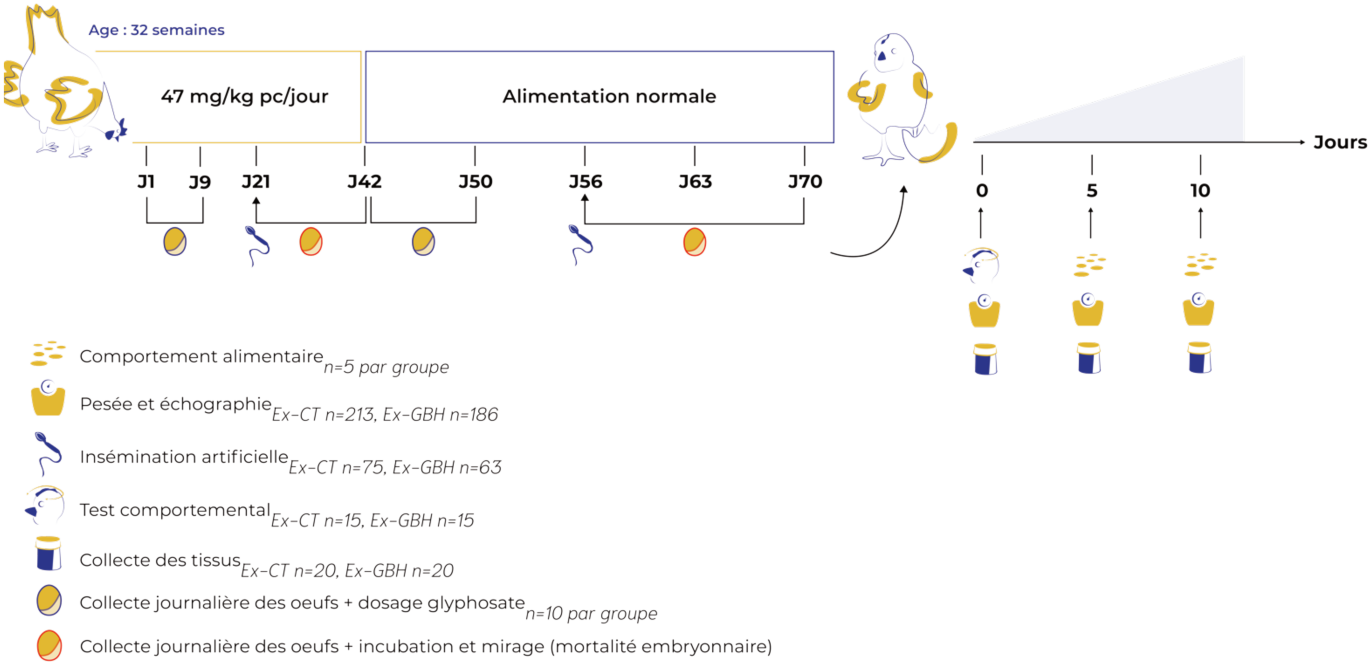


Figure 19. Schéma de la procédure permettant d'évaluer la reproduction des animaux pendant le protocole adulte (adapté de Estienne et al., 2023).

Dix œufs ont été collectés chaque jour et pendant 8 jours à partir de J1 et de J42. Le glyphosate et l'AMPA contenus dans ces œufs (vitellus et albumen) ont été dosés selon le protocole présenté en section **Techniques de laboratoire - Dosage du glyphosate et de l'AMPA plasmatiques.**

À J28 les poules ont été artificiellement inséminées avec du sperme ($2x10^8$ spermatozoïdes par poule) provenant de coqs témoins qui ont été nourris avec une alimentation normale (sans GBH). Le jour suivant et pendant les 3 semaines qui ont suivi, les œufs ont été collectés. Les œufs fécondés ont été placés en incubation après chaque semaine de collecte, pour une durée de 21 jours. Des œufs ont été disséqués à ED15 et ED21, et différents organes des embryons ont été pesés afin d'identifier d'éventuels retards de développement (œuf, embryon, vésicule vitelline, foie, cerveau, tractus digestif, cœur). Nous avons également pu mesurer le volume des organes et annexes embryonnaires à ED15 (CT, n=15 ; GBH, n=15) et ED21 (CT, n=5 ; GBH, n=5) par IRM, en utilisant un scanner IRM de 3 Teslas (T) (Siemens Magnetom® Verio, Erlangen, Allemagne) avec un diamètre interne de 70 cm et une intensité de gradient de champ de 45 mT/m, et par CT scan en utilisant une machine de tomodensitométrie clinique (Somatom Définition AS128, Siemens, Allemagne).

Les mortalités embryonnaires tardives et précoces ont été évaluées par mirage, à ED6 et ED15 respectivement (CT (n=478), GBH (n=477)). Une source lumineuse a été placée sous la chambre à air de l'œuf afin de faire rendre les vaisseaux sanguins dans l'œuf visibles par transparence. Un œuf dont les vaisseaux ne sont pas visibles est considéré comme mort (les vaisseaux sont très rapidement dégradés à la mort de l'embryon).

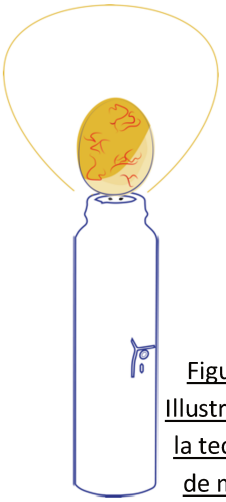


Figure 20. Illustration de la technique de mirage.

À J63, les poules ont été à nouveau artificiellement inséminées avec du sperme ($2x10^8$ spermatozoïdes par poule) provenant de coqs témoins. Le jour suivant et pendant les 3 semaines qui ont suivies, les œufs ont été collectés. Les œufs fécondés ont à nouveau été placés en incubation après chaque semaine de collecte, pour une durée de 21 jours. Les mortalités embryonnaires tardives et précoces ont été évaluées par mirage, à ED6 et ED15 respectivement (Ex-CT (n=369), Ex-GBH (n=367)). Les poussins issus de ces œufs ont été pesés le jour de l'éclosion, et 5 et 10 jours après l'éclosion (Ex-CT (n=213), Ex-GBH (n=186)). A ces mêmes dates, des poussins ont été euthanasiés et leurs tissus adipeux abdominaux et sous-cutanés ont été prélevés et pesés (Éclosion + 0 ; CT (n=20), Ex-GBH (n=20). Éclosion + 5 ; CT (n=10), Ex-GBH (n=10). Éclosion + 10 ; CT (n=20), Ex-GBH (n=20). Le foie de ces animaux a également été prélevé 5 jours après éclosion (CT (n=10), Ex-GBH (n=10)). Des mesures de niveaux de transcrits de gènes liés au métabolisme des lipides ont été réalisées sur les foies

des animaux, selon le protocole présenté en section **Techniques de laboratoire - Quantitative Polymerisation Chain Reaction (qPCR)**. Une analyse lipidomique a été réalisée sur les tissus adipeux abdominaux prélevés sur les animaux 5 jours après éclosion (CT (n=5), Ex-GBH (n=5)). Ce travail a été réalisé par la plateforme I2MC - MetaToul - Plateau Lipidomique, Toulouse, France. Il a permis d'identifier les lipides dont l'abondance diffère entre les groupes, ainsi que les voies de synthèse associées. Les variations des niveaux de transcrits de ces voies de synthèse ont été vérifiées selon le protocole présenté en section **Techniques de laboratoire - Quantitative Polymerisation Chain Reaction (qPCR)**.

Le jour de l'éclosion, un test comportemental a été réalisé (test de réactivité dans un nouvel environnement, dit Open field test). Les poussins (CT (n=15), Ex-GBH (n=15)) ont été placés individuellement dans une arène carrée (80 x 80 x 29 cm, 35°C) en bois blanc avec un sol en plastique jaune imperméable, dans des conditions de lumière tamisée et dispersée. Ils ont pu explorer cette arène librement pendant 6 minutes. Cette exploration a été capturée à l'aide d'une caméra placée au-dessus de l'arène (5 Hz). Les images ont été transmises à un PC et l'activité locomotrice (distance totale parcourue) et la vitesse ont été déterminées à l'aide du système de suivi Ethovision (v XT8.0, Noldus Technology, Wageningen, Pays-Bas). Le nombre total de sauts et de fèces a également été relevé manuellement.

VI. Protocole Poules en Croissance - Étude de l'impact d'un herbicide à base de glyphosate chez la poule de chair en croissance

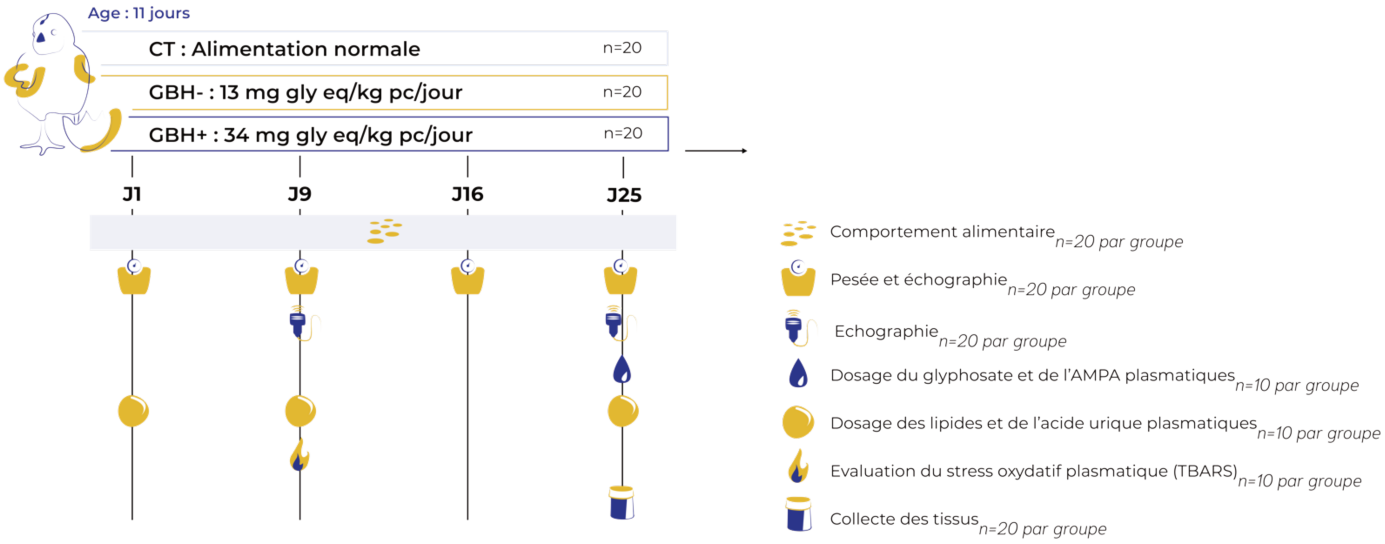


Figure 21. Protocole Poules en Croissance (adapté de Fréville et al., 2024).

Ce protocole a été mis en place dans l'objectif de déterminer l'impact d'une exposition alimentaire chronique au GBH sur la croissance et le développement de jeunes poules de chair. Le protocole expérimental est présenté sous forme de schéma en **Figure 21**. Soixante poules âgées de 11 jours ont été réparties en 3 groupes de 20 animaux :

- CT (n = 20). Ils ont reçu une alimentation normale, sans GBH.
- GBH- (n = 20). Ils ont reçu une alimentation contaminée avec une dose dite « faible » de GBH (13 mg/kg de poids corporel/jour).
- GBH+ (n = 20). Ils ont reçu une alimentation contaminée avec une dose dite « forte » de GBH (34 mg/kg de poids corporel/jour).

L'exposition a duré 25 jours. La quantité de nourriture consommée par les animaux a été mesurée quotidiennement et des pesées ont été réalisées pour déterminer le poids corporel des animaux à J1, J9, J16 et J25. Des échantillons de sang ont été régulièrement prélevés par le sinus occipital dans des tubes d'héparine pour quantifier le glyphosate, l'AMPA, les niveaux de lipides circulants et le stress oxydatif dans le plasma sanguin, selon le protocole détaillé en section **Techniques de laboratoire - Dosage du glyphosate et de l'AMPA plasmatiques, -**

Dosages des lipides et de l'acide urique dans le plasma sanguin, et **- Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay dans le plasma sanguin** (CT (n = 10), GBH- (n = 10) et GBH+(n = 10)). Les échantillons de sang ont été centrifugés (5000× g pendant 10 min à 4 °C) et conservés à -20 °C avant utilisation pour les dosages. Des échantillons des tissus suivant ont été prélevés après abattage des animaux (CT (n = 20), GBH- (n = 20) et GBH+(n = 20)) :

- Ovaires, afin de réaliser des analyses hormonales (stéroidogénèse).
- Tissu adipeux abdominal, jabot, proventricule, gésier, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon afin de réaliser des analyses hormonales (adipokines impliquées dans la régulation de l'appétit, des effets sur la prise alimentaire étant été observé pendant le protocole).
- Foie, afin de quantifier l'expression de transcrits liés à la biotransformation.
- Rate, pour une pesée.

Les ovaires, le tissu adipeux abdominal et la rate ont été pesés et les ratios de poids ont été calculés selon la formule :

$$Ratio = \frac{Poids\ de\ l'organe\ (g)}{Poids\ corporel\ (g)}$$

Puis ces échantillons à l'exception des échantillons d'hypothalamus ont été congelés à -20°C jusqu'à analyse.

Des échantillons d'ovaires de 5 animaux issus de chaque groupe ont été utilisés pour une analyse RNAseq. Les ARN totaux ovariens ont été extraits grâce à un kit commercial RNeasy Midi kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France), et purifiés en utilisant le DNAfree kit (Invitrogen by Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. La qualité de ces ARNm a été contrôlée grâce à un test sur puce RNA 6000 pico kit et un appareil Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) selon les recommandations du fabriquant. Le séquençage des ARN a été réalisé en collaboration avec la plateforme ImaGif (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) – CNRS, 1 Av. de la Terrasse Bâtiment 21, 91190 Gif-sur-Yvette). Les analyses bio-informatiques permettant d'identifier les transcrits différentiellement exprimés dans chaque groupe ont été réalisées par la plateforme ISLANDe (UMR PRC). Ont suivis des mesures des

niveaux de transcrits différentiels liés à la stéroïdogenèse (StAR, CYP11A1, HSD3B et CYP19A1) par qPCR (CT (n = 8), GBH- (n = 8) et GBH+(n = 8)) et des niveaux des protéines associées par Western Blot (CT (n = 6), GBH- (n = 6) et GBH+(n = 6)), dont le détail des protocoles est donné en section **Techniques de laboratoire - Mesure des niveaux d'expressions de transcrits (qPCR) et - Mesure des niveaux d'expressions protéiques (Western Blot).**

Des échantillons de foie ont été utilisés pour mesurer les niveaux de transcrits liés à la biotransformation des xénobiotiques (CT (n=11), GBH- (n=13), GBH+ (n=16)).

Les protéines et ARN totaux des jabots, proventricules, gésiers, duodénums, jéjunums, iléons, caecums, et colons ont par la suite été extraits pour dosage de protéines (CT (n = 8), GBH- (n = 8) et GBH+(n = 8)) et d'ARNm (CT (n = 8), GBH- (n = 8) et GBH+(n = 8)) codant pour des adipokines et leurs récepteurs (Chémérine, CMKLR1, GPR1, CCRL2, AdipoQ, AdipoR1, AdipoR2, Visfatine, Apéline, Adipoline, APJ), selon les protocoles présentés en section **Techniques de laboratoire - Mesure des niveaux d'expressions de transcrits (qPCR)** et **- Mesure des niveaux d'expressions protéiques (Western Blot).**

Les échantillons d'hypothalamus ont été congelés par immersion dans de l'isopentane refroidi à l'azote (-55°C) et ont ensuite été inclus dans du Tissue-Tek® O.C.T (VWR, France) et stockés à -80°C jusqu'à la découpe. Le marquage et la quantification par immunohistochimie de la chémérine et de CMKLR1 dans le noyau antéromédian, le septum latéral, le noyau paraventriculaire et l'éminence médiane des hypothalamus de 3 animaux de chaque groupe ont été réalisés en collaboration avec l'équipe Intégration Neuroendocrine de la Reproduction et des Comportements (INERC), PRC, Centre INRAe Val de Loire, selon le protocole détaillé dans Fréville et al., 2024b (en soumission).

VII. Étude de l'impact *in ovo* du GBH

L'impact du GBH sur le développement embryonnaire a été évalué à la suite d'une exposition *in ovo*. Nous avions précédemment étudié cet impact après une exposition parentale. Nous avons mis en place deux approches pour exposer les œufs au GBH. Nous avons tout d'abord réalisé des injections *in ovo* dans l'albumen des œufs, puis nous avons réalisé une procédure appelée CAM assay (pour Chorioallantoic Membrane Assay) permettant d'évaluer l'impact du GBH sur la néovascularisation de la membrane chorioallentoïque de l'œuf, détaillée ci-après.

1. Injections *in ovo*

Soixante-dix œufs de la souche Leghorn ont été obtenus à E13 et répartis aléatoirement dans 6 groupes :

- Un groupe d'œufs non injectés (n=12)
- Un groupe d'œufs injectés avec du PBS (10 µL, n=12)
- Un groupe d'œufs injectés avec une solution de GBH diluée dans du PBS (10 µL, **0,03 ng gly eq/œuf**, n=12)
- Un groupe d'œufs injectés avec une solution de GBH diluée dans du PBS (10 µL, **0,3 ng gly eq/œuf**, n=12)
- Un groupe d'œufs injectés avec une solution de GBH diluée dans du PBS (10 µL, **3 ng gly eq/œuf**, n=12)
- Un groupe d'œufs injectés avec une solution de GBH diluée dans du PBS (10 µL, **30 ng gly eq/œuf**, n=12)

Il a été choisi de réaliser ces injections à E13, qui est le stade embryonnaire à partir duquel l'embryon puise activement dans les reverses protéiques de l'albumen (Sugimoto et al., 1989). Ces doses ont été choisies pour couvrir les doses mesurées dans les œufs de poules lors du **Protocole Adulte** (jusqu'à 1 ng/mL d'albumen soit environ 30 ng/œuf).

Après 72h d'incubation, les œufs ont été collectés, pesés et disséqués. Ont alors été pesés les embryons, leurs cœurs, foies, rates et tissus adipeux sous-cutanés. Le poids des différents organes pesés a été normalisé par le poids vif corporel des embryons (aucun effet significatif du GBH n'est observé pour ce paramètre qui est donc homogène entre les groupes).

Des cellules cardiaques issues d'embryon à E9 ont été dispersées dans un milieu de culture F12 avec 0,3 % de collagénase A (Roche) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules individualisées ont été collectées par centrifugation (300 g) et suspendues dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM), contenant 100 U/ml de pénicilline, 100 mg d'équivalent glycémique de streptomycine/L et 10 % de FBS. Les cellules ont ensuite été réparties dans des plaques P96. Le jour suivant, le GBH a été dilué dans du DMEM contenant 100 U/ml de pénicilline, 100 mg de streptomycine et 10 % de SVF, pour obtenir plusieurs dilutions de GBH : 0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 et 10^5 x1,8 ng d'équivalent glyphosate/L (N=4, n=4 pour chaque concentration). Nous avons alors remplacé le milieu de culture des cellules par 100 µL de ces dilutions.

Après 24 h d'exposition, la viabilité cellulaire et la prolifération cellulaire ont été mesurées selon les protocoles détaillés en section **Techniques de laboratoire - Mesure de la viabilité cellulaire *in vitro*, et - Mesure de la prolifération cellulaire *in vitro*.**

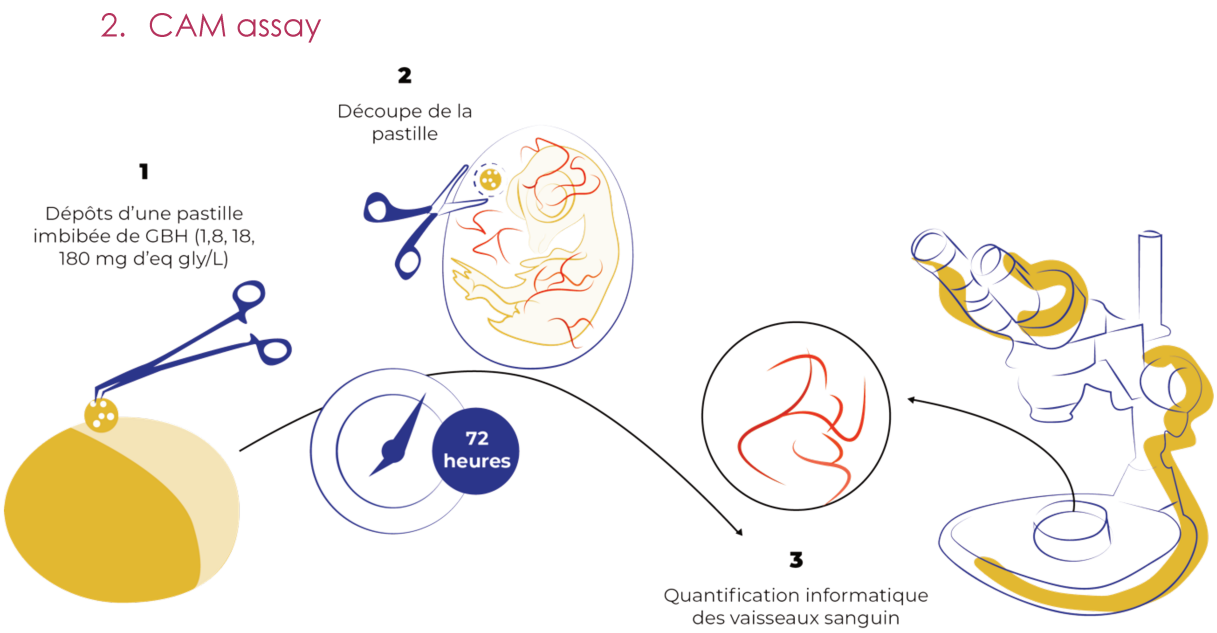


Figure 22. Protocole CAM assay.

Cette procédure permet d'évaluer comment le GBH affecte la croissance des vaisseaux sanguins sur la membrane chorioallantoïque (CAM) des œufs de poule. Cent-dix œufs de la souche Leghorn ont été obtenus à E13. Chaque œuf est perforé deux fois : d'abord, un trou

est fait à travers la coquille juste au-dessus de la chambre à air, puis un autre trou est délicatement réalisé au niveau de la ligne médiane de l'œuf. Ce deuxième trou ne traverse que la coquille pour éviter d'endommager la CAM, qui est directement sous la coquille. Ensuite, nous utilisons une poire de chimie pour aspirer l'air de la chambre à air, ce qui provoque le repli de la CAM dans la chambre à air et crée une nouvelle chambre à air sous le deuxième trou. Nous ouvrons alors une fenêtre d'un centimètre carré dans la coquille au-dessus de cette nouvelle chambre et plaçons les œufs dans une étuve à 38°C pour évaporer l'excès de liquide sur la CAM via la fenêtre. Ensuite, une pastille ronde de papier canson de 0,5 cm de diamètre est imbibée, soit de PBS, soit d'une solution diluée de GBH dans du PBS, et déposée sur la CAM en évitant les zones vascularisées. Les œufs sont répartis en 5 groupes, recevant des pastilles imbibées de concentrations croissantes de GBH (0, 1,8, 18 et 180 mg/L, ou de VEGF à 30 ng/µL en tant que contrôle positif). La fenêtre est refermée avec du ruban adhésif stérile, et les œufs sont incubés à 38°C pendant 72 heures. Les fenêtres sont ouvertes au moins deux fois par jour pour éliminer les œufs morts (reconnaissables par la couleur jaune de l'albumen et l'absence de vaisseaux sanguins sur la CAM).

Après l'incubation, les œufs sont placés à 4°C pendant 30 minutes, puis fixés en ajoutant 2 mL d’une solution de paraformaldéhyde 4% à l'œuf pendant 30 minutes à 4°C, à travers la fenêtre précédemment ouverte. La CAM attachée à la pastille dans chaque œuf est ensuite découpée avec des ciseaux de dissection et conservée dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Une photo de la CAM est prise à l'aide d'un appareil photo et d'une loupe binoculaire, puis la quantité de vaisseaux sanguins développés sur la CAM est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

VIII. Étude de l'impact du GBH sur des cultures primaires de cellules de la granulosa

Des effets sur la stéroïdogenèse ovarienne ont été observés lors du **Protocole Poules en Croissance**. Ce type d'effet a également été observé dans d'autres études *in vivo* et *in vitro* (Serra et al., 2021b). Nous avons donc souhaité évaluer l'impact de l'ajout de doses croissantes de GBH dans le milieu de culture de cellules primaires de la granulosa issues de poules adultes. Après 24 h d'exposition, nous avons réalisé des mesures de leur viabilité, de leur prolifération, ainsi que des niveaux de progestérone sécrétée dans le milieu de culture. Le détail des protocoles de ces manipulations est donné en section **Techniques de laboratoire - Mesure de la viabilité cellulaire *in vitro*, - Mesure de la prolifération cellulaire *in vitro*, et - Dosage de la progestérone.**

Nous avons finalement mesuré les niveaux de transcrits codant pour des enzymes et transporteurs de la stéroïdogenèse exprimés par les cellules, selon le protocole détaillé en section **Techniques de laboratoire - Mesure des niveaux d'expressions de transcrits (qPCR).**

Des follicules F1, F3 et F4 ont été collectés à partir de poules âgées de 16 semaines. Les follicules F3 et F4 ont été regroupés en un seul groupe, appelé groupe F3/4 ci-après. Tous les follicules ont été ouverts dans des boites de pétries remplies de PBS en faisant une incision d'environ 4 cm avec des ciseaux de dissection, et la couche de cellules granulosa a ensuite été collectée en raclant doucement l'intérieur des follicules jusqu'à ce qu'un voile blanc de cellules de la granulosa se détache de l'intérieur du follicule. Toutes les cellules de la granulosa des follicules F1 ont été regroupées, et toutes les cellules de la granulosa des follicules F3/4 ont été regroupées, dans une solution de PBS (contenant 100 U/ml de pénicilline et 100 mg de streptomycine). Les cellules granulosa ont été dispersées dans un milieu de culture F12 avec 0,3 % de collagénase A (Roche) et 10 % de sérum de veau fœtal (FBS). Les cellules individualisées ont été collectées par centrifugation (300 g) et suspendues dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM), contenant 100 U/ml de pénicilline, 100 mg d'équivalent glycémique de streptomycine/L et 10 % de FBS. Les cellules de la granulosa ont ensuite été réparties dans des plaques appropriées. Le jour suivant, le GBH a été dilué dans du DMEM contenant 100 U/ml de pénicilline, 100 mg de streptomycine et 10 % de FBS, pour obtenir plusieurs dilutions de GBH : 0,036 ; 0,36 ; 1,8 ; 3,6 ; 36 et 360 mg d'équivalent glyphosate/L

(mg gly eq/L). Nous avons alors remplacé le milieu de culture des cellules par le volume adéquat de ces dilutions (N=4, n=4).

Après 24 h d'exposition, la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire, les concentrations de progestérone dans les milieux ainsi que les niveaux d'expressions de transcrits ont été mesurés selon les protocoles détaillés en section **Techniques de laboratoire - Mesure de la viabilité cellulaire *in vitro*, - Mesure de la prolifération cellulaire *in vitro***, et - **Dosage de la progestérone**.

IX. Étude de l'effet du GBH sur la sensibilité de deux modèles cellulaires aux infections par la salmonelle

La capacité de la bactérie *Salmonella Enteritidis* LA5 à infecter des cellules de lignée LMH (issues de carcinomes hépatocellulaires et de morphologie épithéliale) et HD11 (macrophages) en présence de concentrations croissantes de GBH a été évaluée. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Sébastien Holbert et Émilie Barilleau de l'équipe SPVB de l'unité Infectiologie et Santé Publique (UMR ISP, Centre INRAE Val de Loire).

L'expérience a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, nous avons évalué la croissance bactérienne de *Salmonella* en présence du GBH, puis nous avons mesuré l'effet du GBH sur la viabilité et la prolifération des lignées LMH et HD11. Ces manipulations nous ont permis de sélectionner la plage de concentration à utiliser pour les tests bactériologiques d'adhésion, d'invasion et de multiplication de la bactérie dans les cellules. Les cellules LMH ont été cultivées dans du milieu Williams (10% SVF) et les cellules HD11 ont été cultivées dans du milieu DMEM (10% SVF). Pour les cellules LMH, chaque plaque/flasque de culture a été préalablement coatée avec du PBS + gélatine 0,5%. La plage initiale de concentrations testées est donnée dans le **Tableau 9** ci-dessous.

Concentration	Concentration (g/L)
CT	0
D1	36
D2	3,6
D3	0,36
D4	0,036
D5	0,0036
D6	0,00036
D7	0,000036
D8	0,0000036
D9	0,00000036

Tableau 9. Concentrations de GBH utilisées pour les tests bactériologiques.

1. Mesure de la croissance de Salmonella en présence de GBH

La bactérie *Salmonella Enteritidis* a été mise en préculture à partir d'un congelât à -80°C. Une portion d'environ 0,5 cm de diamètre de congelât a été ensemencée dans 10 mL de milieu TSB (BD Tryptic Soy Broth, BA-257107.03) et incubée pendant une nuit avec agitation. Deux cents microlitres de cette préculture ont été dilués dans 10 mL de milieu TSB et 100 µL de la culture résultante ont été distribués dans une plaque P96. Cents microlitres de GBH dilués dans du milieu TSB ont ensuite été distribué dans une plaque P96 afin d'obtenir les concentrations finales indiquées en **Tableau 9** (n=3 par concentration). La croissance bactérienne dans chaque puits a alors été mesurée pendant 24h par lecture de la DO à 600 nm avec un spectrophotomètre TECAN.

2. Mesure de la viabilité et de la prolifération cellulaire

La viabilité et la prolifération cellulaire des lignées LMH et HD11 en présence des concentrations de GBH données en **Tableau 9** ont été mesurées selon le protocole détaillé en section **Techniques de laboratoire - Mesure de la viabilité cellulaire in vitro et Mesure de la prolifération cellulaire *in vitro*.**

3. Tests bactériologiques

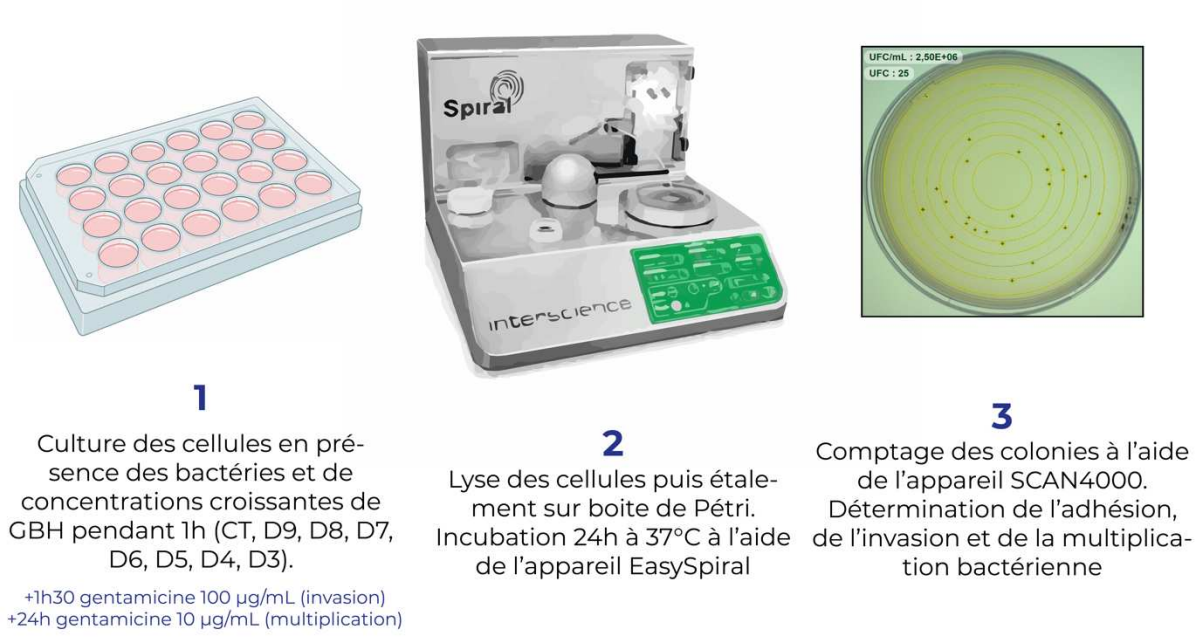


Figure 23. Protocole des tests bactériologiques.

Pour chacune des deux lignées, trois plaques P24 ont été ensemencées avec $200x10^5$ cellules par puits le vendredi de la semaine précédant les tests. Le lundi suivant, le milieu de culture a été aspiré et remplacé par du milieu contenant les concentrations D3 à D9 de GBH, indiquées dans le **Tableau 9**. Le même jour, *Salmonella* Enteritidis a été mise en préculture à partir d'un congelât à -80°C. Une portion d'environ 0,5 cm de diamètre de congelât a été ensemencée dans 10 mL de milieu TSB et incubée pendant une nuit avec agitation.

Le lendemain (mardi), un inoculum bactérien d'une concentration de $1,5x10^7$ bactéries a été préparé dans le milieu de culture adapté (Williams ou DMEM) à l'aide d'un spectrophotomètre à lumière visible (type Equinoxe 7200, Bioblock, une DO de 0,1 équivaut à 10^8 bactéries/mL). Le milieu de culture contenu dans les plaques P24 a été éliminé et les cellules ont été infectées avec 150 µl d'inoculum et 150 µL de milieu sans SVF deux fois concentrés en GBH (**Tableau 9**) puis incubées 1 heure à 37°C.

i. Adhésion

Une des trois plaques a été choisie au hasard pour le test d'adhésion. Les deux plaques restantes étaient dédiées aux tests d'invasion et de multiplication, respectivement. Les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS, puis 1 mL d'eau ultra pure a été ajouté dans les puits. La plaque a été conservée à 4°C pendant 30 minutes, puis les cellules ont été grattées au fond des puits et diluées au 100ème et au $10\ 000^{ème}$ avec du PBS, dans des tubes Eppendorf 1,5 mL. Elles ont ensuite été étalées sur des boites de Pétri contenant de la gélose à l'aide d'un appareil Easy Spiral. Les boites de pétries ont finalement été placées dans un incubateur à 37°C pendant la nuit.

ii. Invasion

La plaque dédiée au test d'invasion a été lavée une fois avec du PBS puis 300 µL de gentamicine 100 µg/mL (diluée dans du milieu 10% SVF) ont été ajoutés dans les puits. La plaque a ensuite été placée 1h30 à 37°C. Puis, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS, et 1 mL d'eau ultra pure a été ajouté dans les puits. La plaque a été conservée à 4°C pendant 30 minutes, à la suite desquelles les cellules ont été grattées au fond des puits et diluées au 100ème et au $10\ 000^{ème}$ avec du PBS, dans des tubes Eppendorf 1,5 mL. Elles ont ensuite été étalées sur des boites de

Pétri contenant de la gélose à l'aide d'un appareil Easy Spiral. Les boites de Pétri ont finalement été placées dans un incubateur à 37°C pendant la nuit.

iii. Multiplication

La plaque dédiée au test d'invasion a été lavée une fois avec du PBS puis 300 µL de gentamicine 10 µg/mL (diluée dans du milieu 10% SVF) ont été ajoutés dans les puits. La plaque a ensuite été placée 24h à 37°C. Puis, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS, et 1 mL d'eau ultra pure a été ajouté dans les puits. La plaque a été conservée à 4°C pendant 30 minutes, puis les cellules ont été grattées au fond des puits et diluées au 100ème et au 10 000ème avec du PBS, dans des tubes Eppendorf 1,5 mL. Elles ont ensuite été étalées sur des boites de Pétri contenant de la gélose à l'aide d'un appareil Easy Spiral. Les boites de Pétri ont finalement été placées dans un incubateur à 37°C pendant la nuit.

iv. Inoculum

L'inoculum bactérien auxquelles les cellules ont été exposées a été dilué au 100ème et au 10 000ème avec du PBS, dans des tubes Eppendorf 1,5 mL. Il a ensuite été étalé sur des boites de pétries contenant de la gélose à l'aide d'un appareil Easy Spiral. Les boites de pétries ont finalement été placées dans un incubateur à 37°C pendant la nuit.

v. Comptage des colonies bactériennes

Le lendemain de chaque test, les colonies qui se sont développées dans les boites de Pétri ont été comptées grâce à un appareil SCAN4000. Le nombre de bactéries comptées pour chaque test est normalisé par le nombre de bactéries comptées dans l'inoculum. Le comptage des bactéries en multiplication est normalisé par le nombre de bactéries en invasion pour chaque dilution. Les résultats obtenus pour chaque dilution de GBH sont exprimés en % du CT.

4. Marquage à l'huile rouge des cellules LMH

Une plaque 6 puits a été ensemencée avec $200x10^5$ cellules LMH par puits. Le lendemain, les milieux ont été changés par des dilutions de GBH (CT, D3, D4 et D8, n=6 pour chaque concentration).

Après 24h d'incubation, les cellules ont été fixées pendant 30 minutes avec une solution de PAF 4%. Un lavage de 10 minutes avec de l'eau déminéralisée a été réalisé puis les cellules ont été rincées avec une solution d'isopranol 60% (diluée dans de l'eau déminéralisée) très brièvement. L'isopropanol a été éliminé et 500 µL d'une solution d'huile rouge ont été ajoutés dans chaque puits pendant 15 minutes. Un rinçage avec une solution d'isopranol 60% (dilué dans de l'eau déminéralisée) a été réalisé afin d'éliminer l'excès d'huile rouge, et 100 µL de PBS ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont alors été observées et photographiées au microscope. Les cellules contenues dans chaque puits ont finalement été grattées et les solutions résultantes ont été transférées dans une plaque P96. L'absorbance à 492 nm, proportionnelle à la quantité de lipides contenue dans chaque puit, a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

X. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Rstudio (Version 2023.09.1+494) et du logiciel GraphPad Prism (version 10). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± SEM. L'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Bartlett et la normalité des résidus a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Des test T de Student ont été réalisés pour comparer les moyennes de chaque groupe, lorsqu'il y avait deux groupes dans la comparaison. Des ANOVA suivis de tests post-hocs de Tukey HSD ont été réalisés pour comparer les moyennes de chaque groupe, lorsqu'il y avait 3 groupes ou plus dans la comparaison. L'erreur α a été fixée à 0,05. Il a donc été jugé que des groupes avaient des moyennes significativement différentes lorsque p.value $\leq$ 0,05. Le logiciel GraphPad Prism (version 10) a été utilisé pour réaliser les représentations graphiques.

Résultats et discussion

I. Cinétique du glyphosate et de l'AMPA

1. Détermination des paramètres toxicocinétiques du glyphosate et de l'AMPA à la suite d'une exposition alimentaire aiguë au GBH (Fréville et al., 2023)

La détermination des paramètres toxicocinétiques du glyphosate et de l'AMPA chez la poule permet d'estimer le comportement de ces substances dans cet organisme. Cinq paramètres couramment décrits dans les études toxicologiques ont été déterminés à la suite d'une exposition alimentaire aiguë chez des poules adultes. Des prises de sang ont été effectuées régulièrement pendant les 48 heures suivant l'exposition alimentaire afin de doser le glyphosate et l'AMPA plasmatiques des animaux. Les paramètres toxicocinétiques ont pu être déterminés sur la base de modèles informatiques réalisés en partenariat avec Jérôme Henri du laboratoire ANSES de Fougère (35306, France).

i. Résultats

Les concentrations de glyphosate et d'AMPA dans le plasma des poules durant les 48 heures suivant l'administration par voie alimentaire de GBH (40 mg glyphosate/kg pc ; n=4) sont représentées en **Figure 24**.

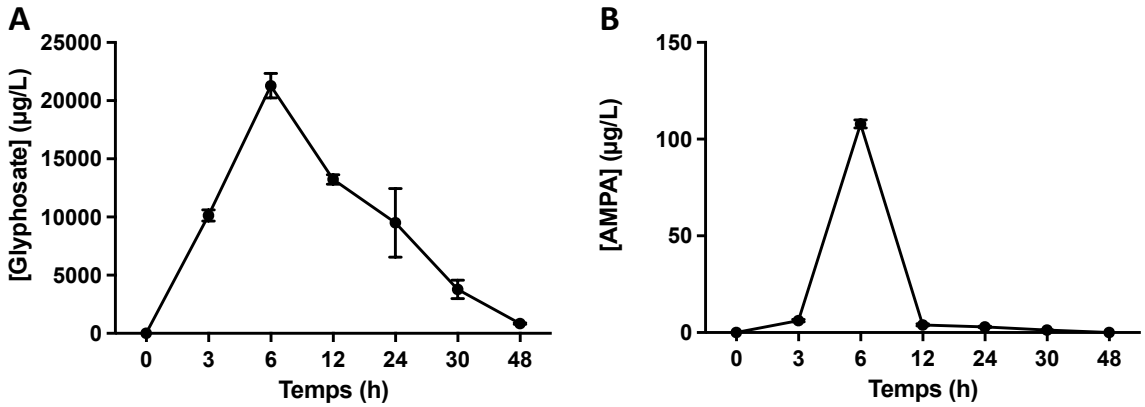


Figure 24. Concentration plasmatique de glyphosate (A) et d'AMPA (B) chez les poules après une exposition alimentaire aiguë au GBH (40 mg de glyphosate/kg pc ; n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM.

Les concentrations plasmatiques de glyphosate et d'AMPA croissent rapidement après administration, pour atteindre un pic 6 heures après l'administration de GBH. Les concentrations de glyphosate chutent rapidement entre la 6ème et la 24ème heure du protocole, à partir de laquelle elles retournent à quasi-zéro (**Figure 24-A**). Les concentrations d'AMPA atteignent leur pic 6 heures après l'administration et retournent immédiatement à quasi-zéro, à partir de la 12ème heure et jusqu'à la fin du protocole (**Figure 24-B**). Cette dynamique est semblable à celle observée chez le rat (Anadón et al., 2009). Cependant, la concentration maximale de glyphosate (Cmax) observée chez les poules est de 21 290 µg/L, soit quatre à cinq fois la Cmax mesurée chez le rat par Anadón et al., 2009 (4,62 µg/mL), alors que la dose orale que nous leur avons administrée est dix fois plus faible. Nous pouvons avancer l'hypothèse que les surfactants présents dans la formulation de GBH que nous avons utilisée influent sur les paramètres toxicocinétiques du glyphosate. Anadón et al., 2009 avaient travaillé avec une solution de glyphosate pure. Cette variation pourrait également être expliquée par des différences interspécifiques.

Les données obtenues ont permis d'établir un modèle non compartimental pour décrire l'évolution des concentrations au cours des 48 heures du protocole. Les paramètres toxicocinétiques déterminés à partir de ce modèle sont donnés dans le **Tableau 10**.

Molécule	Paramètre	Unit	Poule A	Poule B	Poule C	Poule D	Poule E	Poule F	Poule G	Poule H	Poule I	Poule J	Moyenne (CV in %)
Glyphosate	Poids corporel	kg	4.115	4.810	4.270	3.660	2.825	3.795	3.855	3.210	4.350	3.915	3.880 (14.7 %)
	Cmax	µg/L	25432	15954	23456	22341	19745	16578	18764	22546	24576	23456	21285 (15.6 %)
	AUCinf	h.µg/L	453726	423031	329965	313185	320841	358321	383898	353551	345160	385921	366760 (12.3 %)
	CLt apparente (CLt/F%)	L/h/kg bw	0.00035	0.0004	0.00051	0.00047	0.00054	0.00042	0.0004	0.00036	0.0005	0.00041	0.000436 (14.9 %)
	Vss apparente (Vss/F%)	L/kg bw	0.0052	0.0039	0.0064	0.0052	0.0079	0.0053	0.0051	0.0062	0.0062	0.0048	0.00562 (19.5 %)
	$T_{1/2}$	h	10.19	6.71	8.66	7.67	10.09	8.72	8.77	11.93	8.52	8.22	8.94 (16.3 %)
AMPA	Cmax	µg/L	118	106	103	109	110	98	100	105	118	109	108 (4.4 %)
	AUCinf	h.µg/L	630	566	568	557	595	547	595	566	617	577	582 (4.6%)
	% d'AMPA (sur l'AUCinf)	%	0.21	0.20	0.26	0.27	0.28	0.23	0.23	0.24	0.27	0.22	0.24 (10.9 %)
	$T_{1/2}$	h	10.32	16.17	5.25	4.58	5.12	5.46	2.96	4.21	11.29	3.97	6.93 (61.1 %)

Tableau 10. Analyse non compartimentale des concentrations plasmatiques de glyphosate et d'AMPA après une exposition alimentaire aiguë au GBH (40 mg/kg pc) chez 10 poules pondeuses.

Des travaux précédents ont montré que le glyphosate est peu biodisponible (30-36% d'après JMPR, 2004). En outre, le taux d'absorption oral du glyphosate est faible, il se pourrait donc que la vitesse d'élimination soit plus rapide que l'absorption. Ce fait placerait donc le taux d'absorption comme le facteur limitant dans la cinétique et, par conséquent, influerait sur la demi-vie de la molécule (Kuan et al., 2023). Ce phénomène est bien décrit et est connu sous le nom de "flip-flop" en pharmacocinétique (Toutain and Bousquet-Melou, 2004). La CLt et la Vss sont donc présentées sous forme de Vss et CLt apparentes, dépendantes de la biodisponibilité F%.

Bien que la concentration en glyphosate et en AMPA plasmatique décroit très rapidement après le pic de concentration, la faible Vss/F% calculée (Vss/F% = 0.00562 L/kg) laisse penser que le glyphosate est faiblement distribué dans les tissus. Cette donnée est cohérente avec la valeur négative de log(Kow) attribuée au glyphosate (log(Kow) = -3,40 ; PubChem) indiquant une faible liposolubilité et donc une faible capacité à traverser la membrane plasmique des

cellules. Pour autant, la présence de surfactant dans la formulation pourrait faciliter le passage du glyphosate à travers la membrane plasmique.

Les demi-vies ($T_{1/2}$) du glyphosate et de l'AMPA sont également plus faibles chez la poule ($T_{1/2\ glyphosate}$ = 8,94 h et $T_{1/2\ AMPA}$ = 6,93 h) que chez le rat ($T_{1/2\ glyphosate}$ = 14,38 h) (Anadón et al., 2009). Pourtant, la clearance totale du glyphosate est aussi plus faible chez la poule (0.000436 L/h/kg pc) que chez le rat (0,995 L/h/kg pc) (Anadón et al., 2009). Les mécanismes détaillés d'élimination du glyphosate chez les vertébrés étant peu connus, il est difficile d'interpréter des différences interspécifiques pour ce paramètre. Selon nos observations, étant donné que le glyphosate présente une faible élimination et une faible excrétion, il est plausible que le glyphosate administré ait subi une dégradation, vraisemblablement en AMPA. Cependant, l'AMPA reste très minoritaire dans le plasma des poules comparé au glyphosate (0,24%). De plus, la dégradation du glyphosate en AMPA n'a à ma connaissance pas été décrite chez les vertébrés mais seulement chez certaines bactéries du sol et protéobactéries du microbiote intestinal humain (Mamy et al., 2005; Mesnage and Antoniou, 2020). L'hypothèse d'une excrétion du glyphosate sous forme inchangée comme décrits par Williams et al., 2000 reste donc à privilégier. La grande hydrosolubilité du glyphosate laisse également penser que la clairance rénale est la voie majeure d'élimination du glyphosate.

ii. Conclusion

Les données recueillies à la suite d'une exposition alimentaire aiguë à un GBH montrent que le glyphosate et l'AMPA sont rapidement absorbés. Leurs concentrations plasmatiques tendent vers zéro 48h après l'exposition. Il semble également que le glyphosate et l'AMPA soient faiblement distribués dans les tissus périphériques. Ces constats sont faits à la suite d'une exposition alimentaire aigue. Ils sont à confronter avec des résultats qui seront obtenus à la suite d'une exposition alimentaire - chronique cette fois, c'est-à-dire durant une exposition alimentaire de longue durée au GBH.

2. Accumulation plasmatique et tissulaire du glyphosate et de l'AMPA

i. Poules adulte S*(Fréville et al., 2022)*

Les concentrations de glyphosate et d'AMPA ont été mesurées dans le plasma des animaux adulte (**Protocole Adulte - Étude de l'impact d'un herbicide à base de glyphosate chez la poule de chair adulte**) avant et après exposition (**Tableau 11**). Ces concentrations croissent très rapidement dès les premiers jours du protocole, pour atteindre un pic à J21 avant de lentement décroitre.

	Temps (Jour)	[Glyphosate] (ng/ml)	[AMPA] (ng/ml)
Pendant l'exposition	J0	5.37^{a}	0^{a}
	J21	1549^{d}	20^{d}
	J42	910^{c}	10.2^{c}
Après l'exposition	J49	297^{b}	6.24^{b}
	J56	160^{ab}	4.45^{ab}
	J70	67^{ab}	1.59^{a}

Tableau 11. Concentrations de glyphosate et d'AMPA dans le plasma des poules pendant (n=10) et après (n=10) la période d'exposition alimentaire au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Le pic de concentration observé ne correspond pas nécessairement au pic réel de concentration. Des concentrations supérieures pourraient avoir été atteintes entre les mesures. Il se pourrait d'ailleurs que la courbe réelle ait plus une allure de col que de pic.

Les concentrations de glyphosate et d'AMPA à la fin de l'exposition (J42) sont ainsi environ 50% plus faibles que celles atteintes au pic de concentration enregistré. Elles continuent assez logiquement de décroitre après l'exposition. Il est intéressant de constater que la chute des concentrations de glyphosate et d'AMPA commence à J21, ce alors que les animaux sont toujours exposés et qu'aucune différence de consommation alimentaire n'a été relevée. Nous

pouvons suspecter une augmentation de la clairance rénale, que nous suspections déjà d'être la voie majeure d'élimination du fait de sa grande hydrosolubilité.

> Nous nous intéresserons également à la biotransformation hépatique comme voie possible d'élimination du glyphosate dans la section **Résultats et discussion - Biotransformation hépatique du GBH**.

Nous avons vu dans la partie précédente qu'après une exposition alimentaire aiguë, les concentrations plasmatiques de glyphosate et d'AMPA retournent à quasi-zéro après seulement 48h. Dans le cas présent, le retour à des concentrations négligeables est beaucoup plus long, puisqu'après plusieurs jours d'arrêt d'exposition les molécules sont toujours détectables dans le plasma. La présence du glyphosate et de l'AMPA dans le plasma sanguin des animaux s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif dans ce dernier **(Figure 25)**. L'induction du stress oxydatif est un effet bien documenté des GBH, dont il est probable qu'il soit lié à d'autres effets sur la santé de l'animal (Wang et al., 2022).

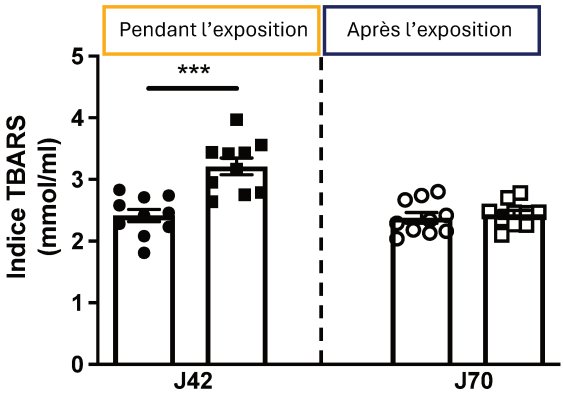


Figure 25. Stress oxydatif plasmatique évalué par la méthode TBARS dans le plasma sanguin des poules adultes pendant (J42, n=10)) et après (J70, n=10) l'exposition au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

Les deux molécules sont également détectées dans différents tissus, à J42 (**Figure 26**). Le premier site d'accumulation pendant l'exposition est le foie ([glyphosate] = 8,10 mg/kg et [AMPA] = 2,40 mg/kg). Viennent ensuite le tissu adipeux abdominal ([glyphosate] = 2,00 mg/kg et [AMPA] = 0,13 mg/kg) et le muscle de la patte ([glyphosate] = 0,86 mg/kg et [AMPA] = 0,09 mg/kg). Après l'exposition (à J70), le glyphosate et l'AMPA sont toujours détectées, bien qu'ils le soient dans des quantités inférieures ; D'abord dans le foie ([glyphosate] = 3,11 mg/kg et

[AMPA] = 0,74 mg/kg), puis dans le tissu adipeux abdominal ([glyphosate] = 0,80 mg/kg et [AMPA] = 0,04 mg/kg) et dans le muscle de la patte ([glyphosate] = 0,09 mg/kg et [AMPA] = 0,07 mg/kg). Il se pourrait donc que la présence du glyphosate et de l'AMPA dans le plasma plusieurs jours après l'arrêt de l'exposition soit due à une restitution progressive des molécules accumulées dans ces compartiments.

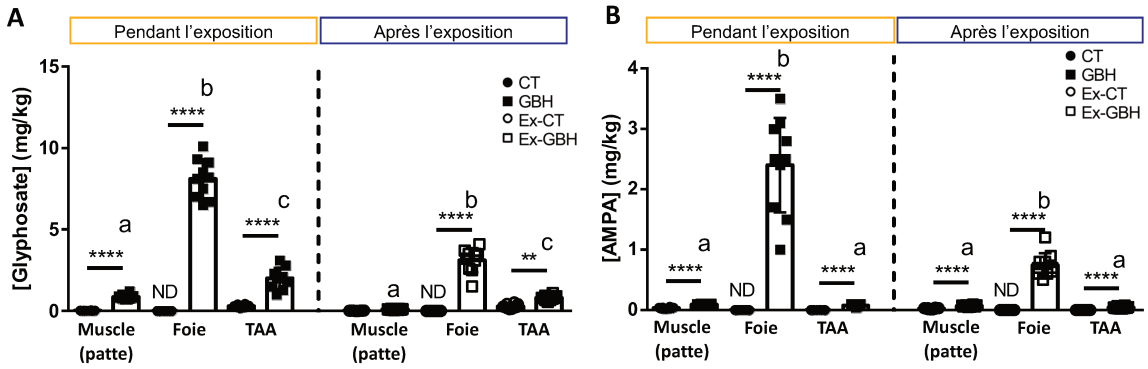


Figure 26. Concentrations de glyphosate (A) et d'AMPA (B) dans les muscles des pattes, le foie et le tissu adipeux abdominal (TAA) des poules pendant (J42, n=10) et après (J70, n=10) l'exposition au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

L'accumulation des molécules se fait majoritairement dans le foie et le tissu adipeux. Ce résultat est cependant en contradiction avec la faible Vss/F mesurée précédemment, lors de l'exposition aiguë. On peut raisonnablement penser que les surfactants présents dans la formulation aident à transférer les molécules vers ces compartiments, malgré leur hydrosolubilité. Il est de plus probable qu'une part du glyphosate présent dans le tissu adipeux ait d'abord été captée par le foie avant d'y être transféré, puisque certains lipides des tissus adipeux sont synthétisés par le foie (Estienne et al., 2023). Du fait de sa localisation (à l'interface entre le tractus digestif et le reste du corps) et de son rôle dans la détoxication, le foie est un site d'accumulation privilégié des xénobiotiques. Nombreux sont les dysfonctionnements qui peuvent être entrainés par les dommages hépatiques.

Pour autant, la forte concentration du glyphosate dans un tissu n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour y décrire sa toxicité, et le site d'accumulation majoritaire n'est pas nécessairement le site le plus sensible. Par exemple, le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) n'est pas toxique pour les tissus adipeux où il s'accumule fortement, alors qu'il est toxique pour d'autres organes où son accumulation est plus faible (Casarett et al., 2008).

Les concentrations mesurées sont bien plus faibles dans les muscles. Les muscles sont des compartiments où le pH est généralement plus faible que dans d'autres compartiments, du fait de la production d'acide lactique. Les molécules de glyphosate pourraient donc s'y trouver sous une forme moins ionisée/plus protonée (Vidal et al., 2015; Zereini et al., 2016). Le franchissement des membranes plasmiques pourrait donc être facilité par ce phénomène (Casarett et al., 2008). Cependant, il est attendu qu'en présence de surfactants le transfert du glyphosate soit plus faible dans ces organes moins adipeux. Il est également possible que le glyphosate passe à travers la membrane plasmique via un transporteur ou par les aquaporines. Ce dernier processus est cependant lent et inefficace, dans le cas du glyphosate (Casarett et al., 2008).

ii. Poule en croissance *(Fréville et al., 2024a)*

Chez les poules en croissance exposées de manière chronique par l'alimentation, le glyphosate et l'AMPA ont été dosés dans le plasma à J25. Nous pouvons assez logiquement constater que ces concentrations croissent avec la dose administrée (**Figure 27**).

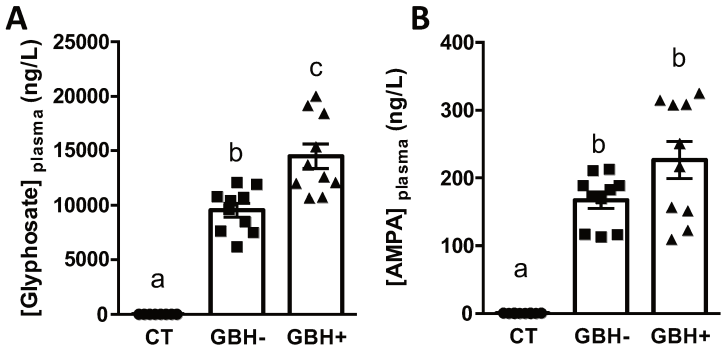


Figure 27. Concentrations plasmatiques de glyphosate et d'AMPA chez les poules en croissances CT (n = 10), GBH- (n = 10) et GBH+ (n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Une fois encore, l'augmentation des concentrations plasmatiques s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif plasmatique.

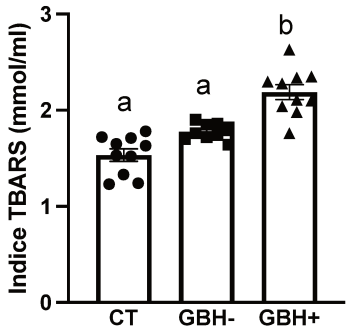


Figure 28. Stress oxydatif dans le plasma sanguin chez des poules en croissances CT (n = 10), GBH- (n = 10) et GBH+ (n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

iii. Conclusion

Le glyphosate et l'AMPA s'accumulent dans le plasma et dans les tissus des animaux pendant une exposition chronique au GBH. Les niveaux plasmatiques de glyphosate et d'AMPA sont dépendant de la dose administrée. L'accumulation des deux molécules est réversible puisque les concentrations diminuent grandement durant les semaines qui suivent l'arrêt de l'exposition.

3. Biotransformation hépatique du GBH

L'induction de la biotransformation hépatique a été évaluée chez les animaux adultes (**Protocole Adulte**) et en croissance (**Protocole Poules en Croissance**). Des échantillons de foie ont été collectés sur des animaux issus de ces deux expériences. Après extractions d'ARN et rétrotranscription, l'expression de transcrits codant pour des enzymes de la biotransformation hépatique a été mesurée par qPCR.

i. Poules adultes (Fréville et al., 2022)

Nous avons donc mesuré l'expression de plusieurs transcrits codant pour des enzymes impliquées dans la biotransformation hépatique dans le foie des animaux CT, Ex-CT, GBH et Ex-GBH. Ces mesures ont été réalisées par RT-qPCR. Le résultat de ces mesures est donné dans le **Tableau 12**.

Transcrit	J42			J70		
	CT	GBH	P.value	Ex-CT	Ex-GBH	P.value
CYP1A2	10.47	8.74	0.578	16.42	12.31	0.210
CYP1A4	0.110	0.130	0.598	0.170	0.190	0.835
CYP2A6	20.0	18.4	0.696	15.1	16.28	0.741
CYP2C	11.4	9.86	0.498	12.4	11.40	0.793
CYP3A37	6.87	6.78	0.956	5.11	5.16	0.966
CYP3A4	0.300	0.35	0.401	0.35	0.310	0.425
CYP3A80	0.460	0.42	0.681	1.98	0.740*	0.027
CYP2H1	22.8	22.0	0.854	16.7	18.4	0.661
CYP2H2	13.0	13.44	0.905	10.2	12.4	0.432
GSTA3	3.10	2.92	0.700	5.65	3.86	0.200
GSTA4	4.71	3.50	0.054	4.43	4.32	0.861

Tableau 12. Expression relative de l'ARNm de différents gènes dans les organes des poules à la fin de l'exposition alimentaire au GBH (J42, CT, n = 9 et GBH, n = 9) et après exposition alimentaire au GBH (J70, Ex-CT, n = 12 et Ex-GBH, n = 12 poules). $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Aucun effet significatif n'est détecté sur les transcrits analysés, qu'ils codent pour des enzymes de la phase I (cytochromes) ou de la phase II (GST) de la biotransformation hépatique, à l'exception de *CYP3A80*, dont l'expression est significativement plus faible chez les animaux Ex-GBH comparés aux animaux Ex-CT. Ces résultats semblent indiquer que chez la poule adulte le GBH ne provoque pas ou peu d'induction de la transcription d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques, comme cela a été montré chez d'autres modèles (Williams et al., 2000; Panzacchi et al., 2018). Les travaux de Fathi et al., 2020 indiquent néanmoins que la transcription de certaines enzymes pourrait être induite par l'injection glyphosate et de GBH dans l'œuf de poule (Fathi et al., 2020). Il se pourrait donc que la réponse hépatique soit fonction du stade de développement de l'animal. Il est alors d'autant plus intéressant de mesurer ces expressions chez la poule en croissance.

ii. Poules en croissance *(Fréville et al., 2024)*

Des résultats plus contrastés sont observés chez les poules en croissance. Plusieurs transcrits codant pour des CYP P450 ont des niveaux d'expression modifiés chez les animaux GBH- et GBH+ (**Tableau 13**).

	CT	GBH-	GBH+	p.value
CYP1A1	0.40 ± 0.11	0.61 ± 0.11	0.54 ± 0.04	0.2656
CYP1A4	0.07 ± 0.01^{a}	0.14 ± 0.02^{a}	0.33 ± 0.06^{b}	0.0003
CYP1A5	2.89 ± 0.70	5.40 ± 0.95	5.08 ± 0.77	0.1185
CYP2A2	0.03 ± 0.01^{a}	0.06 ± 0.01^{a}	0.18 ± 0.04^{b}	0.0023
CYP2A6	31.16 ± 6.10^{a}	18.41 ± 3.29^{ab}	10.97 ± 1.60^{b}	0.0015
CYP2C	17.86 ± 4.66^{a}	12.58 ± 2.76^{ab}	7.13 ± 0.71^{b}	0.0294
CYP2H2	60.25 ± 11.63^{a}	35.71 ± 7.94^{ab}	21.29 ± 3.08^{b}	0.0031
CYP3A37	9.78 ± 1.13	17.54 ± 3.98	19.82 ± 2.71	0.0838
CYP3A4	0.99 ± 0.08^{a}	0.67 ± 0.13^{ab}	0.65 ± 0.05^{b}	0.0194
CYP3A80	0.53 ± 0.06	0.46 ± 0.10	0.45 ± 0.05	0.7329
EPHX1	0.68 ± 0.05^{a}	0.72 ± 0.05^{ab}	0.86 ± 0.04^{b}	0.0195
GSTA3	9.56 ± 1.20	10.85 ± 1.15	10.58 ± 0.74	0.6668
GSTA4	4.21 ± 0.41	4.08 ± 0.47	3.65 ± 0.36	0.5856

Tableau 13. Expression relative de transcrits codant pour des enzymes de la biotransformation hépatique dans les foies de poules en croissance (CT, n = 11, GBH-, n = 13, GBH+, n = 16). Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

iii. Conclusion

L'exposition alimentaire chronique au GBH ne semble pas induire l'expression de transcrit d'enzymes de la biotransformation hépatique chez les poules adultes. Cette observation est en accord avec les observations faites dans des travaux passés, notamment chez le rat (Williams et al., 2000; Panzacchi et al., 2018). Rappelons que si le glyphosate seul n'est pas censé induire l'expression de ces enzymes, nous aurions pu nous attendre à ce que d'autres composants de la formulation le fassent. Néanmoins, les travaux de Fathi et al., 2020 indiquent que la transcription de certaines enzymes pourrait être induite par des injection *in ovo* de glyphosate et de GBH chez la poule (Fathi et al., 2020). L'induction de l'expression des

transcrits d'enzyme de la biotransformation hépatique par le GBH pourraient donc être fonction du stade de développement de l'animal. C'est également ce que semble montrer nos observations, puisque chez la poule en croissance les niveaux de transcrits de plusieurs de ces enzymes sont modifiés par l'exposition. Nous observons également que l'induction de ces enzymes est, pour certaines, également dose dépendante. Cependant, l'ensemble de ces mesures a été réalisé par qPCR. Bien que cette technique offre une grande précision, elle permet d'évaluer les niveaux de transcrits seulement. Il se pourrait donc que la dynamique des enzymes elles-mêmes ne soit pas reflétée par celle de leurs transcrits. Il serait alors judicieux dans de futurs travaux de réaliser des mesures de niveaux protéiques et d'activité enzymatiques afin de compléter nos résultats et de pouvoir conclure définitivement sur l'existence d'une biotransformation du GBH. Il existe des tests d'activité pour plusieurs des enzymes que nous avons testées et dont les niveaux de transcrits sont modifiés par l'exposition (Walsky and Obach, 2004). Par exemple, le test EROD permet de mesurer l'activité de la CYP1A1, pour laquelle nous ne détectons ici aucun effet significatif de l'exposition au GBH.

II. Impact du GBH sur le métabolisme des poules

Comme nous l'avons rapidement évoqué en introduction, des effets des GBH sur le métabolisme ont été recherchés chez plusieurs modèles mammifères. Chez le rat, le poids corporel ainsi que la consommation d'eau et de nourriture ne sont pas affectés par une exposition orale chronique de 13 semaines à un GBH (1,75 mg/kg pc/jour) (Panzacchi et al., 2018). Une diminution de l'appétence de l'aliment contaminé aurait pu être reconnue comme un mécanisme d'évitement de la part de l'animal. Nous avons souhaité évaluer ces paramètres chez les animaux issus de nos deux protocoles d'exposition chronique. La comparaison des résultats obtenus à la suite de ces deux protocoles permet d'obtenir des informations à la fois sur l'existence d'une variabilité dépendante du stade de développement, mais aussi sur la possible réversibilité des effets.

1. Poules adultes (Fréville et al., 2022)

Le comportement alimentaire des animaux a été estimé par un comptage des coups de bec donnés à la mangeoire pendant et après l'exposition alimentaire au GBH. Le résultat de cette expérience est donné en **Figure 29**.

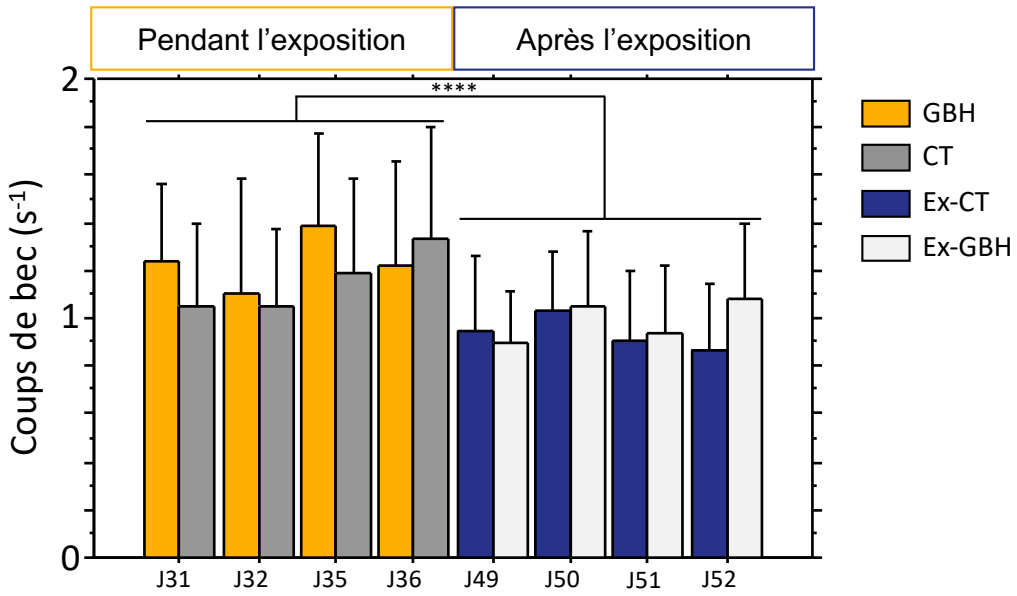


Figure 29. Fréquence des coups de becs donnés à la mangeoire par les poules contrôles (CT, n = 45) et celles exposées au GBH (GBH, n = 45) pendant et après (Ex-CT, n = 45 ; Ex-GBH, n = 45) l'exposition au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

Nous pouvons constater qu'aucune différence significative de nombre de coups de bec donnés n'est détectée, ni entre les groupes CT et GBH, ni entre les groupes Ex-CT et Ex-GBH. En revanche, il est surprenant de constater que les animaux ont donné significativement moins de coups de becs durant la période post-exposition, et ce, peu importe le groupe auquel ils appartenaient (CT ou GBH/Ex-CT ou Ex-GBH). Nous pouvons suspecter qu'une légère variation de température atmosphérique dans l'élevage pourrait être à l'origine de cette observation, bien que la température dans l'élevage ait été finement contrôlée pendant l'expérience (le protocole ayant eu lieu en pleine canicule). L'exposition au GBH de l'aliment ne semble donc pas provoquer de réaction d'évitement de l'aliment par les poules adultes.

La prise de poids des animaux est donc assez logiquement non impactée par l'exposition au GBH, que ce soit pendant ou après l'exposition, comme nous pouvons l'observer sur **la Figure 30-A**. Il en est de même pour l'épaisseur de la couche de gras abdominal des animaux (**la Figure 30-B**).

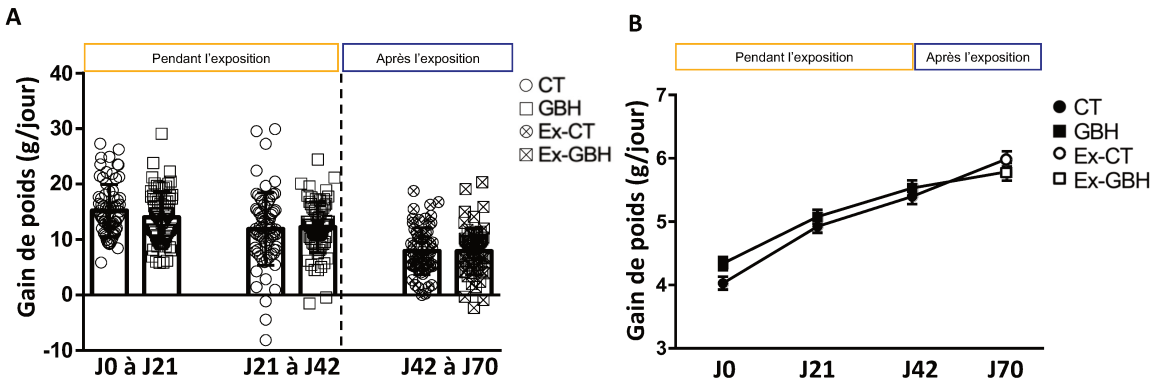


Figure 30. Gain de poids corporel (A) et épaisseur de la couche de gras abdominal (B) pendant l'exposition alimentaire au GBH (J0 à J42 ; CT, n = 75 ; GBH, n = 75) et après (J42 à J70 ; Ex-CT, n = 66 ; Ex-GBH, n = 66) l'exposition alimentaire au GBH. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

Des résultats similaires avaient été obtenus chez le rat par Panzacchi et al., 2018. Dans ce travail, les auteurs avaient exposé les rats à une dose de 1,75 mg/kg pc/jour de glyphosate ou d'équivalent glyphosate contenu dans un GBH par voie orale, sans observer d'effet significatif, ni sur leur poids corporel, ni sur leur consommation d'eau et de nourriture.

Les taux de lipides circulants ne sont également pas impactés, comme nous pouvons l'observer sur la **Figure 31-A, B, C, et D**, qui représente les niveaux plasmatiques de triglycérides, cholestérol, et de phospholipides pendant l'exposition.

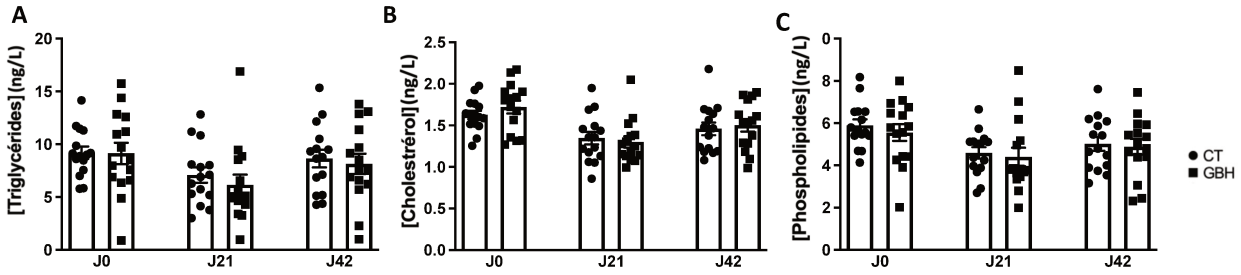


Figure 31. Concentration en triglycérides (A), cholestérol (B) et phospholipides (C) dans le plasma des poules adultes pendant l'exposition (à J0, J21 et J42). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

2. Poules en croissance (Fréville et al., 2024)

La quantité de nourriture ingérée par les animaux a été surveillée pendant toute la durée du protocole. Le pourcentage de nourriture consommée chaque jour par les animaux par rapport à la nourriture qui leur était donnée est représenté en **Figure 32**.

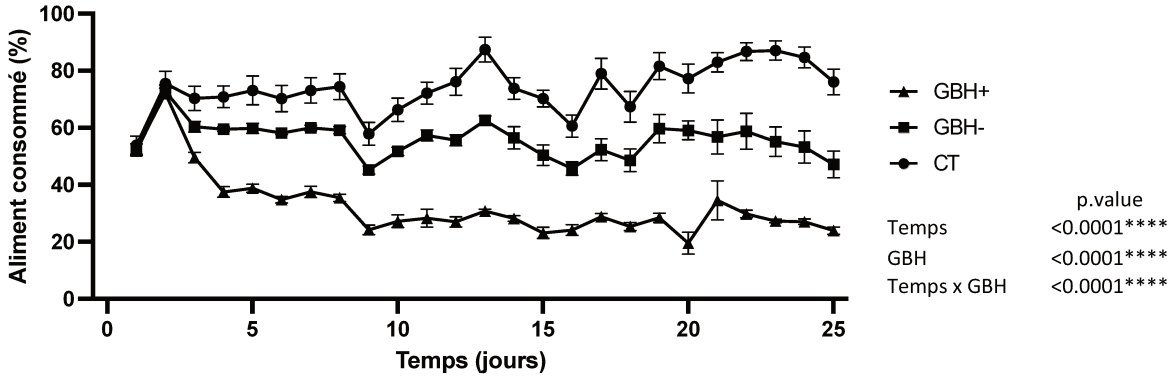


Figure 32. Pourcentage d'aliment consommé par les animaux des groupes CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

Nous constatons que les poules issues des groupes GBH- et GBH+ consomment une part moins importante de leur nourriture que les poules du groupe CT. Cette observation est difficilement explicable, bien qu'elle ait déjà été constatée dans de précédentes études (Evans and Batty, 1986). Une étude menée sur de jeunes coqs fait par exemple état d'une réduction de la consommation alimentaire ainsi que du poids corporel après administration de 50, 75, 100 et

125 mg/kg/jour de glyphosate pendant 15, 30 et 45 jours (Hussain, 2019). On pourrait suspecter que l'apport de GBH modifie le goût de l'aliment et en diminue l'appétence.

Ce n'est pas une hypothèse que je privilégie, car les animaux ne commencent à diminuer leur alimentation qu'à partir du 3ème jour du protocole. Si l'aliment n'avait pas été au goût des animaux je me serais attendu à ce qu'ils le rejettent dès le début du protocole. Je pense donc plutôt que l'aliment a provoqué un trouble, peut-être digestif (ou autre) chez les animaux que nous n'avons pas pu détecter. Quoi qu'il en soit ce constat nous force à reconsidérer les doses de glyphosate et d'AMPA que les animaux ont effectivement ingéré. Nous devons donc recalculer ces doses par la multiplication de la masse d'aliment ingéré chaque jour (g) et de la concentration en glyphosate et AMPA contenus dans cet aliment (**Figure 33**).

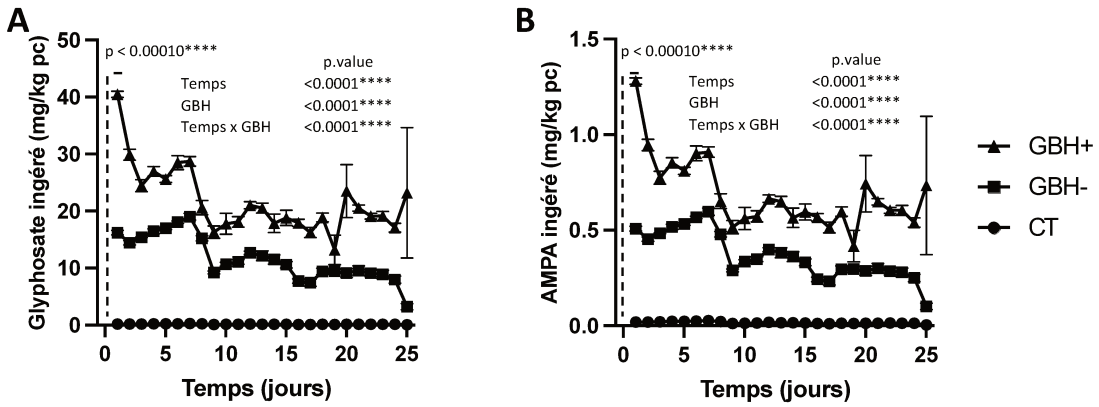


Figure 33. Quantité de glyphosate et d'AMPA ingérés par les animaux des groupes CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20) au cours du protocole. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

L'ordre des groupes reste inchangé mais les doses effectivement ingérées par les animaux sont bien plus faibles que les doses initialement choisies.

Conséquence (vraisemblablement) d'une alimentation réduite, le poids corporel et l'épaisseur de la couche de gras abdominal des animaux sont réduits chez les animaux GBH- et GBH+ (**Figure 34-A et -B**, respectivement). Les niveaux de lipides circulants, eux, restent inchangés (**Tableau 14**). Bien que cela puisse paraitre surprenant, le fait qu'une privation alimentaire ne modifie pas les niveaux de lipides circulants a déjà été documenté chez la poule (Regar et al.,

2019). Cela témoigne de la fine et rapide régulation de ces taux, vraisemblablement par des facteurs hormonaux (Bernardi et al., 2021).

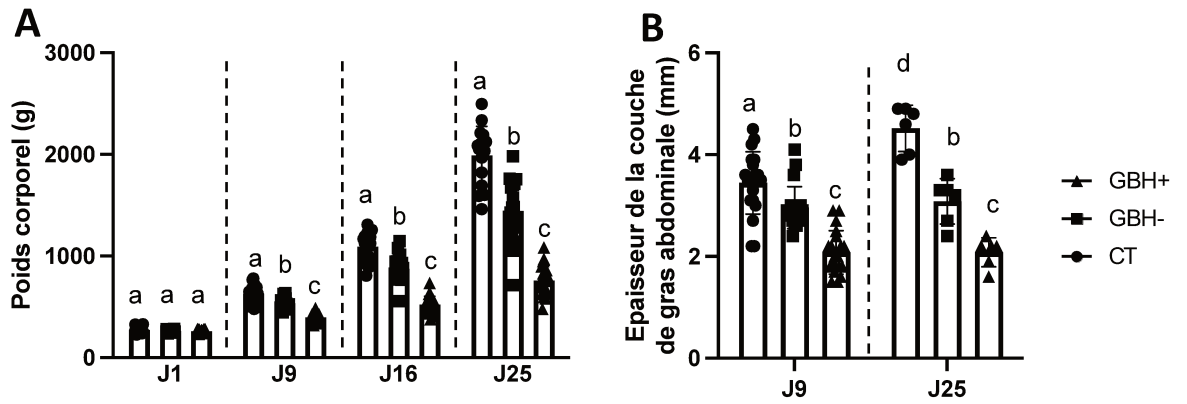


Figure 34. (A) Poids corporel (g) et (B) épaisseur de la couche de gras abdominal (mm) des animaux des groupes CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

		CT	GBH-	GBH+
Cholestérol (ng/L)	J1	1.59 ± 0.05	1.63 ± 0.04	1.64 ± 0.02
	J9	1.49 ± 0.07	1.56 ± 0.06	1.84 ± 0.08
	J25	1.61 ± 0.03	1.40 ± 0.05	1.35 ± 0.04
Triglycérides (ng/L)	J1	0.91 ± 0.02	0.90 ± 0.01	0.89 ± 0.02
	J9	0.91 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.92 ± 0.03
	J25	0.88 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.02
Phospholipides (ng/L)	J1	4.25 ± 0.18	4.13 ± 0.12	3.82 ± 0.11
	J9	3.36 ± 0.18	3.82 ± 0.16	4.32 ± 0.30
	J25	4.12 ± 0.10	3.61 ± 0.16	3.11 ± 0.13

Tableau 14. Concentration de cholestérol, de triglycérides et de phospholipides dans le plasma des animaux CT (n=20), GBH- (n=20) et GBH+ (n=20). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

3. Impact du GBH sur le microbiote caecal chez l'adulte

A la différence des cellules animales, certaines bactéries peuvent exprimer la voie shikimate, inhibée par le glyphosate. Les bactéries peuplant le microbiote caecal qui exprimeraient cette voie métabolique pourraient donc être sensibles à l'apport alimentaire de GBH.

> L'utilisation du glyphosate comme antibiotique a d'ailleurs été brevetée (Mesnage and Antoniou, 2020). L'efficacité du glyphosate à contrôler certaines infections bactériennes a par exemple été montrée chez la souris (Nosanchuk et al., 2001; Silver et al., 2019). Cependant, il n'existe à ma connaissance pas de médicament dont il est la molécule active.

Il fait aujourd'hui consensus que la santé du microbiote intestinal est étroitement liée à la santé de l'hôte. Ce dernier, en plus de participer à la digestion des aliments, contribue à la détoxication des xénobiotiques, à maintenir l'immunité de l'hôte ainsi qu'à la synthèse de composés tels que des vitamines ou des hormones (Samsel and Seneff, 2013a). Par exemple, le tryptophane alimentaire peut servir de précurseurs à la synthèse de sérotonine par les cellules épithéliales intestinales. Il peut également être pris en charge par des bactéries commensales comme *Clostridium sporogenes* et *Lactobacillus spp* pour être changé en 3-Indole Propionic Acid (IPA), une molécule antioxydante neuroprotectrice qui contribue entre autres à prévenir la maladie d'Alzheimer (Barnett et al., 2022). Autre exemple, les sucres qui atteignent le gros intestin sans être préalablement dégradés en molécules plus petites (comme c'est notamment le cas pour les fibres alimentaires) peuvent quant à eux être pris en charge par certaines bactéries pour être métabolisés en SFCA (Short Chain Fatty Acids, ou acides gras à chaine courte) qui ont de nombreux rôles dans le maintien de la santé de l'hôte. Ils sont la principale source d'énergie pour les colonocytes et sont impliqués dans la production d'hormones régulatrices du métabolisme. Ils participent ainsi au contrôle de la glycémie, la digestion des graisses et des protéines, ou encore à la promotion de la satiété (Barnett et al., 2022).

Dans une revue publiée en 2013, Samsel et Seneff indiquent que malgré la multitude de facteurs environnementaux (de toxines notamment) qui peuvent impacter le microbiote intestinal, beaucoup de maladies et de troubles de la santé découlant d'une dysbiose

intestinale pourraient être attribuables à l'action du glyphosate sur ce dernier. Cela inclut des troubles du spectre autistique, la maladie de Parkinson ainsi que la maladie d'Alzheimer (Samsel and Seneff, 2013b). Par exemple, il a été montré que le glyphosate peut augmenter l'activité de la phenylalanine ammonia lyase (PAL), une enzyme exprimée par certaines bactéries du microbiote intestinal, provoquant une accumulation d'ammoniac. Une telle accumulation pourrait résulter en l'apparition de troubles du spectre autistique (Samsel and Seneff, 2013b). Des comportements dépressifs chez de jeunes rats adultes ont également été détectés suite à une exposition orale à un GBH (Cattani et al., 2017).

Des travaux ont été réalisés sur différents modèle afin de caractériser le possible impact des GBH sur les communautés bactériennes du microbiote de différents compartiments du tractus digestif. Les travaux de Mesnage et Antoniou ont montré que chez l'humain, *Akkermansia muciniphila* est la bactérie la plus grandement responsable de la voie shikimate. A noter que cette bactérie exprime une EPSPS de classe II, insensible au glyphosate. Les auteurs considèrent néanmoins que la majorité des bactéries exprimant cette enzyme en exprime la classe I (Mesnage and Antoniou, 2020). Il existe également des bactéries capables de métaboliser le glyphosate, notamment pour en extraire le groupement phosphate.

Chez la poule, il a été montré que des bactéries pathogènes comme *E. coli* sont grandement résistantes au glyphosate alors que la plupart des bactéries bénéfiques telles que *E. faecalis*, *E. faecium* et *B. adolescentis* lui sont hautement sensibles (Shehata et al., 2013b). L'apport alimentaire de glyphosate pourrait donc impacter les communautés bactériennes du tractus digestif, dont on connait la grande influence sur la santé de l'hôte et notamment sur son métabolisme.

Les résultats présentés ci-après ont été analysés en rassemblant les groupes CT et Ex-CT. Aucune différence significative de composition ni de diversité bactérienne n'est observée entre ces groupes. Rassembler ces groupes permet d'augmenter la robustesse des analyses statistiques réalisées par la suite.

i. Diversité bactérienne

L'exposition alimentaire chronique au GBH a modifié durablement la composition microbiote caecal des poules. La diversité α permet de caractériser la distribution des abondances des taxons au sein d'un échantillon. Nous avons choisi de mesurer l'indice de Chao, basée sur la richesse spécifique de chaque échantillon ; l'indice de Shannon, intégrant la richesse et l'abondance spécifiques ; et l'indice de Faith, qui intègre également les relations phylogénétiques entre les taxons identifiés.

Assez surprenamment, le GBH n'a pas eu d'effet immédiat sur la diversité du microbiote, mais un effet différé qui n'est apparu qu'après le retrait du produit, comme on peut l'observer en **Figure 35-A, -B et -C**.

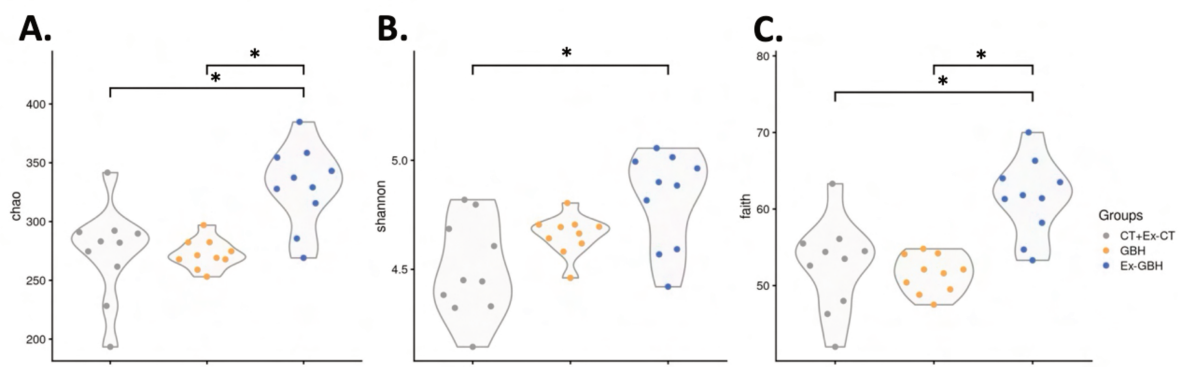


Figure 35. Diversité α du microbiote dans les groupes CT+Ex-CT (n=12), GBH (n=9) et Ex-GBH (n=12) mesurée par les indices Chao (C), Shannon (D) et Faith (E). p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

Les indices de diversité Chao, Shannon et Faith ne sont significativement augmentés que dans le groupe Ex-GBH. De manière générale, une grande diversité microbienne indique que le microbiote est en bonne santé (Mesnage et al., 2021a). Une étude récente a montré que chez le rat, une administration orale de GBH réduit la diversité du microbiote caecal (Mesnage et al., 2021a). Il est donc d'autant plus surprenant qu'en plus d'être différé, l'effet de l'exposition au GBH soit une augmentation de la diversité bactérienne caecale de la poule. Pourtant, les travaux de Tang et al., 2020 présentent des résultats similaires aux nôtres, c'est à dire une augmentation de la diversité du microbiote intestinal dans un groupe de rats oralement exposés au glyphosate (bien qu'il s'agisse de glyphosate pure et non d'un GBH).

L'impact différé du GBH est reflété par le fait que huit taxons diffèrent du contrôle à la fin de l'expérience, mais pas immédiatement après l'exposition à GBH (**Figure 36**). D'autres taxons sont immédiatement affectés par l'exposition alimentaire chronique (**Figure 36**). La **Figure 36**

représente l'ensemble des 17 taxons dont l'abondance diffère à la fin de l'exposition, à la fin du protocole (donc après retrait du GBH) ou les deux.

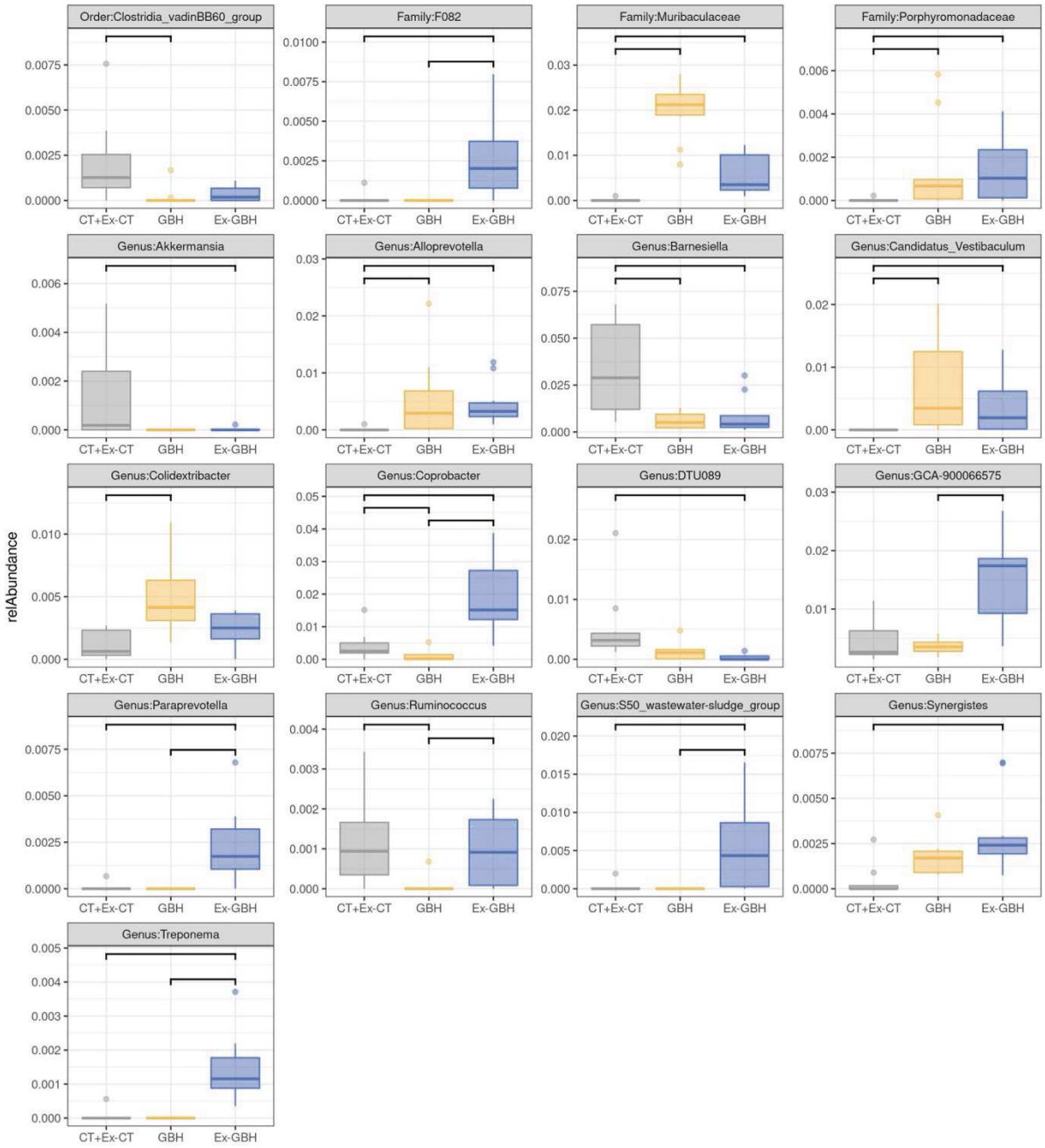


Figure 36. Abondance relative des taxons différentiels dans le contenu caecal de poules exposées au GBH pendant 42 jours (GBH, n=9), exposées pendant 42 jours puis non exposées jusqu'au jour 70 (Ex-GBH, n=12) et contrôles aux jours 42 et 70 pris ensemble (CT + Ex-CT, n=10), identifiés de manière commune par les méthodes ALDEx2, DESeq2 et ANCOM-BC. Une barre entre deux groupes indique que l'abondance relative est significativement différente entre ces deux groupes. Les taxons sont identifiés au niveau de l'ordre, de la famille et du genre. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± erreur standard de la moyenne (SEM).

Les travaux de Mesnage et Antoniou, 2020 ont montré que le glyphosate peut inhiber la voie Shikimate dans le microbiote intestinal humain. Un grand nombre de taxons possède au moins une enzyme de cette voie, mais peu les possèdent toutes. Autrement dit la voie shikimate n'est que rarement achevée entièrement par une bactérie seule, mais est plutôt achevée grâce à la collaboration de plusieurs individus s'échangeant les produits intermédiaires de la voie. La principale représentante des bactéries équipées pour réaliser cette voie métabolique est *Akkermansia muciniphila* (Mesnage and Antoniou, 2020). A noter qu'*Akkermansia muciniphila* est équipée avec une EPSPS de classe II insensible au glyphosate. Pourtant, dans une autre étude, Mesnage et al., 2021 ont bien observé que l'apport oral de GBH peut augmenter l'abondance d'*Akkermansia muciniphila*. Ce résultat semble en opposition avec ce que nous observons ici chez la poule, à savoir une diminution de l'abondance d'*Akkermansia*. Il serait alors pertinent d'isoler et de séquencer ce taxon à partir des caeca des poules exposées, afin de confirmer que l'EPSPS qu'il exprime est bien une EPSPS de classe II et non de classe I, ce qui expliquerait sa sensibilité accrue. *Akkermansia* n'est cependant pas la seule bactérie capable de réaliser la voie shikimate, comme illustré par le fait que Mesnage et al., 2021 ont détecté une accumulation de shikimate et de 3-dehydroshikimate dans le caecum des rats oralement exposés à un GBH, suggérant une inhibition de l'EPSPS (Mesnage et al., 2021b). Là encore nous pourrions quantifier la présence de ces métabolites chez les poules exposées dans de futurs travaux afin de confirmer l'hypothèse d'une inhibition de la voie shikimate par le GBH. D'autant qu'une accumulation de Shikimate n'est probablement pas sans conséquence pour l'hôte, puisqu'il a été montré qu'il peut promouvoir l'apparition de cancer et en stimuler la prolifération. Il est cependant également capable d'agir comme anti-oxydant, ce qui pourrait permettre de mitiger l'induction du stress oxydatif par le GBH observé dans le plasma des poules, s'il était transféré vers la circulation sanguine (Mesnage et al., 2021b).

Des études réalisées sur divers modèles suggèrent d'ailleurs un lien entre le stress oxydatif et le microbiote intestinal. *Colidextribacter*, dont l'abondance est réversiblement augmentée dans notre étude, est très positivement corrélée avec les niveaux plasmatiques de MDA, également réversiblement augmentés dans notre étude (Wang et al., 2021; Fréville et al., 2022).

D'autres taxons sont capables d'utiliser le glyphosate comme source de phosphate. A ma connaissance la Glyphosate Oxydoréductase (enzyme catalysant la dégradation du glyphosate

en AMPA) n'a jamais été identifiée dans le tractus digestif des vertébrés, mais seulement chez les communautés bactériennes des sols. Des homologues de la CP-lyase ont néanmoins été identifiés chez certaines protéobactéries du microbiote humain (Mesnage and Antoniou, 2020). Il serait donc intéressant de rechercher des homologues de cette enzyme dans le microbiote caecal des poules exposées.

Bien que certains taxons soient effectivement sensibles à l'apport de glyphosate et de GBH, toutes les modifications observées dans les communautés bactériennes ne peuvent être attribuées à l'actions directe du GBH. Il est en effet très probable que certaines des dynamiques observées soient plutôt attribuables à une perturbation des interactions écologiques au sein du microbiote. Il a en effet été démontré dans une étude précédente que la diminution de l'abondance d'une population bactérienne peut profiter à d'autres populations (Ruuskanen et al., 2020).

ii. Production de SCFA

Nous pouvons de surcroit noter la diminution réversible du taxon *Ruminococcus*. Cette diminution est également observable chez le rat (Dechartres et al., 2019). *Ruminococcus* (Ruminococcaceae) est une bactérie intestinale capable de produire des acides gras à chaine courte (de l'anglais short-chain fatty acids, SCFA) à partir de glucides alimentaires (Barnett et al., 2022). C'est aussi le cas *d'Akkermansia*, dont il a été montré qu'elle produit du propionate chez l'humain (Morrison and Preston, 2016). Il nous a donc paru pertinent de mesurer la concentration en SCFA dans les fèces des animaux issus des différents groupes du protocole afin d'observer si la diminution de l'abondance de ces taxons corrèle bien avec une chute de la production de SCFA.

Les concentrations de SCFA ont été mesurées dans les contenus caecaux des poules CT, Ex-CT, GBH et Ex-GBH. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 15** ci-après.

	J42			J70		
SCFA (µmol/g)	CT	GBH	P.value	Ex-CT	Ex-GBH	P.value
Acetate	28.0 ± 2,98	18,0 ± 1,45**	0,009	25.8 ± 2,98	16,6 ± 2,14*	0,022
Propionate	8,36 ± 0,96	5,43 ± 0,62*	0,022	8,02 ± 1,12	5,63 ± 0,98	0,126
Isobutyrate	0,770 ± 0,05	0,51 ± 0,05**	0,004	0,730 ± 0,08	0,59 ± 0,06	0,194
Butyrate	2,08 ± 0,31	1,64 ± 0,26	0,293	1,85 ± 0,32	1,30 ± 0,20	0,166
Isovalerate	0,530 ± 0,05	0,389 ± 0,04*	0,041	0,510 ± 0,06	0,450 ± 0,04	0,377
Valerate	0,710 ± 0,08	0,516 ± 0,05*	0,044	0,620 ± 0,09	0,390 ± 0,05*	0,033
Caproate	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		0,020 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,068
Total isoSCFA	1,30 ± 0,09	0,9 ± 0,09**	0,006	1,24 ± 0,13	1,04 ± 0,10	0,233
Total SCFA	41,5 ± 4,93	26,4 ± 2,27*	0,015	38,0 ± 4,67	25,2 ± 3,57*	0,045

Tableau 15. Concentration des acides gras à chaîne courte dans le contenu caecal (µmol/g) pendant l'exposition alimentaire au GBH (GBH, J42, n=8) chez les poules contrôles (CT, n=8) et après l'exposition alimentaire au GBH (Ex-CT, J70, n=12 et Ex-GBH, n=11). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Nous observons une diminution des concentrations de l'ensemble des SCFA au dernier jour d'exposition. Seules les productions d'acétate et de valérate semblent être restaurées après sevrage. Pourtant, aucun effet significatif de l'exposition au GBH n'a été détecté sur le phénotype des animaux, que ce soit sur leur métabolisme ou leur comportement. Ce résultat est surprenant considérant l'importance des SCFA et le grand nombre de fonctions auxquels ils sont associés. Nous pouvons néanmoins émettre l'hypothèse que des modifications détectables du métabolisme des animaux pourraient apparaitre après un temps d'exposition plus long.

iii. Autres effets

Outres des effets sur le métabolisme, nous pourrions mettre les perturbations du microbiote caecal que nous observons en lien avec d'autres types d'effets. Le lien entre microbiote et comportement a été étudié plusieurs fois lors de travaux réalisés sur divers modèles. Il a ainsi été établi que la composition du microbiote influence les comportement sociaux et alimentaire (Wong et al., 2015). Ici, les animaux n'ont pas présenté de comportements anormaux/différents entre les groupes. Nous avons bien observé une réduction du nombre de coups de becs donnés à la mangeoire durant la période post exposition, mais cette réduction était présente aussi bien chez les animaux Ex-GBH que chez les animaux Ex-CT. Aucune

différence significative dans la composition du microbiome n'ayant été détectée entre les groupes CT et Ex-CT, il est difficile de penser qu'une modification du microbiote caecal des animaux soit à l'origine cette réduction. Il sera néanmoins intéressant de réaliser une analyse métabolomique des contenus caecaux pour rechercher des marqueurs différentiellement exprimés avant et après l'exposition chez tous les groupes d'animaux. Nous avons entamé ce travail en comparant la production de SCFA chez tous les animaux, mais seul le facteur « GBH » permet de détecter des différences significatives entre les groupes (**Figure 37**).

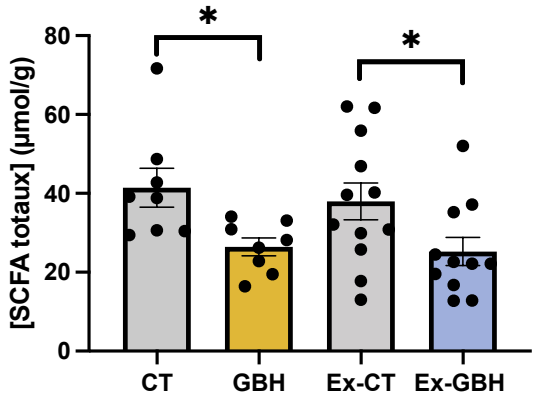


Figure 37. Concentrations en SCFA totaux dans les contenus caecaux des animaux (µmol/g). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Aussi les expérimentations que nous avons réalisées se sont concentrées sur le microbiote caecal des animaux. Il serait pertinent de les compléter par des analyses similaires réalisées dans d'autres compartiments intestinaux.

4. Conclusion

L'exposition alimentaire chronique au GBH ne semble avoir que des effets limités sur le métabolisme des poules adultes. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus chez le rat à la suite d'une exposition à une dose de 1,75 mg/kg pc/jour de glyphosate ou d'équivalent glyphosate contenu dans un GBH par voie orale. En revanche, l'exposition alimentaire des animaux en croissance a entrainé une chute dose dépendante de leur consommation alimentaire. En conséquence, les animaux avaient un poids et une épaisseur de couche de gras abdominale réduits.

L'exposition alimentaire chronique au GBH a engendré une perturbation de la composition du microbiote caecal des poules adultes. Cette dysbiose, bien que liée à une chute des niveaux fécaux de SCFA, n'a pas entrainé d'effets détectables sur leur physiologie.

III. Impact du GBH sur la reproduction des poules et sur le développement de leur descendance

1. Poule adulte (Estienne et al., 2022)

i. Accumulation du glyphosate dans les œufs et mortalité embryonnaire

L'impact du GBH sur la reproduction de la poule a été déterminé chez les poules adultes (**Protocole Adulte**). Des œufs ont été collectés chez les poules CT, GBH, Ex-CT et Ex-GBH. Le glyphosate a été dosé dans le vitellus et dans l'albumen de ces œufs. Le résultat de ces dosages est donné en **Figure 38** ci-dessous.

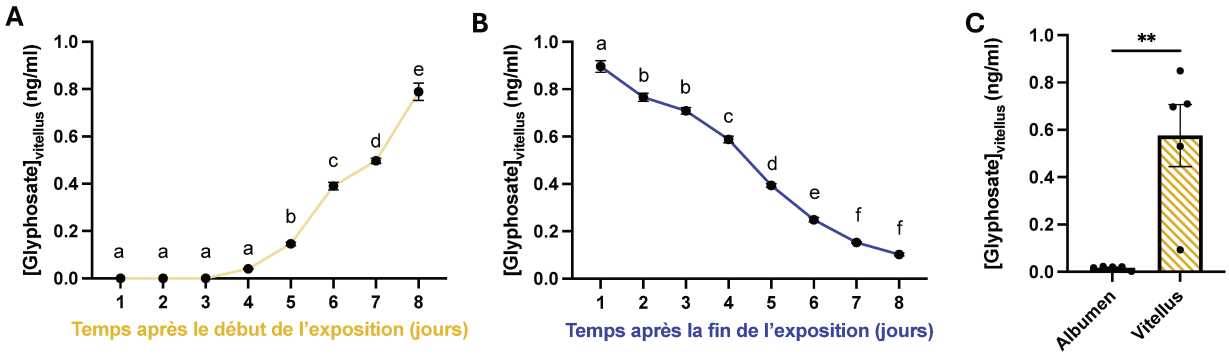


Figure 38. Concentrations de glyphosate mesurées dans l'albumen de oeufs issus des animaux GBH (n=10) et Ex-GBH (n=10) au début du protocole (A) et après le retrait du produit (B). Concentration de glyphosate mesurée dans l'albumen et le vitellus des oeufs issus des animaux GBH, à J42 (C). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Le glyphosate est exclusivement détecté dans le vitellus et non dans l'albumen, probablement en raison des adjuvant qui augmentent sa lipophilie, renforçant ainsi son affinité pour les lipoprotéines contenues dans le vitellus. La concentration augmente dès le 5ème jour après le début de l'exposition et diminue progressivement après la fin de celle-ci. Cette diminution semble décrite par une relation affine (donc proportionnelle au temps). En réalité, elle est mieux décrite par un polynôme du 2nd degré [GBH] = $0,0007t^2$ -0,1279t + 1,0392 (avec t le temps en jours ; R^2 = 0,9833). Ainsi, les œufs collectés pendant l'exposition présentaient des niveaux élevés de glyphosate, contrairement à ceux collectés et incubés après l'exposition, qui ne contenaient probablement que des traces résiduelles. Il est probable que la durée requise

pour que le glyphosate disparaisse du vitellus soit équivalente à celle nécessaire pour que les derniers follicules contaminés soient pondus par l'animal (Bello et al., 2023).

En parallèle de ces dosages, nous avons mesuré les mortalités embryonnaires précoces (à ED6) et tardives (à ED15) sur tous ces œufs, grâce à la technique du mirage. Le **Tableau 16** ci-dessous présente les valeurs de mortalités embryonnaires calculées.

			Mortalité embryonnaire	
		Œufs fertiles (%)	**Précoce (ED6, %)**	**Tardive (ED15, %)**
Pendant l'exposition	CT	90.88±1.62	7.68±1.13	0.67±0.42
	GBH	89.40±1.89	80.87±1.51	50±0.08
	p.value	0.5553	p<0.0001****	p<0.0001****
Après l'exposition	Ex-CT	93.66±1.77	4.01±1.07	1.27±0.64
	Ex-GBH	93.01±1.86	3.01±0.99	0.97±0.57
	p.value	p>0.05	p>0.05	p>0.05

Tableau 16. Pourcentage d'œufs fertiles et mortalités embryonnaires précoces et tardives des œufs issus des animaux CT (n=478), GBH (n=477), Ex-CT (n=369) et Ex-GBH (n=367). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

Nous observons une forte augmentation des mortalités embryonnaires précoces et tardives chez les animaux du groupe GBH pendant l'exposition. Quatre-vingts pourcents des embryons étaient morts à ED6, et 50% de ces derniers étaient morts arrivés à ED15 (soit au total 90% des œufs fertiles). En réalité, les mirages ont été effectués quotidiennement, révélant une mortalité massive des embryons à ED3. À ce stade, il a été observé que la membrane vitelline se déploie sur la surface du jaune (Hamburger and Hamilton, 1992), tandis que les premières structures cardiaques émergent et commencent à battre. Nous pouvons donc supposer qu'un transfert de glyphosate du vitellus vers l'embryon survient à ce moment, ce qui pourrait être à l'origine de la mort des embryons.

2. Poule en croissance (Fréville et al., 2024a)

Après avoir exposé les poules en croissances aux doses CT, GBH- (13 mg gly eq/kg pc/jour) et GBH+ (34 mg gly eq/kg pc/jour) pendant 25 jours, nous avons collecté et pesé plusieurs de leurs organes (**Figure 39**).

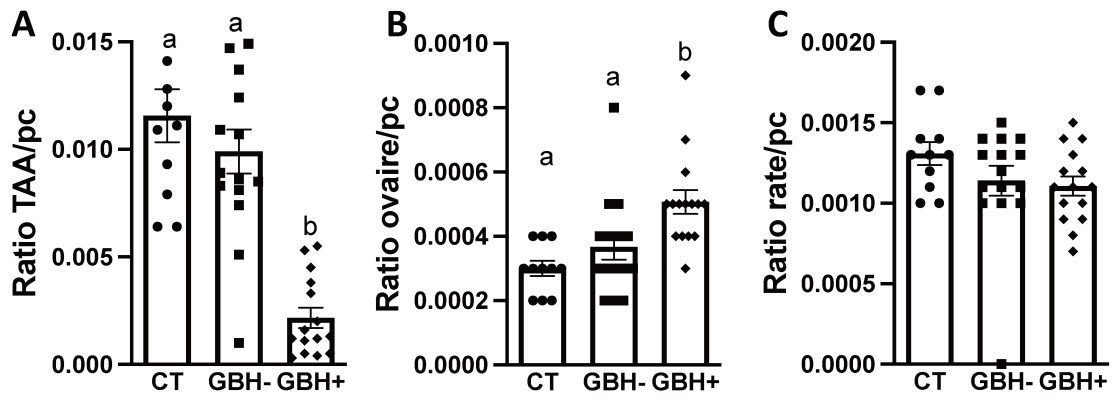


Figure 39. Poids relatif du tissu adipeux abdominal (TAA), de l'ovaire et de la rate des poules présenté sous forme de ratio ramené au poids corporel des animaux (n=20 pour chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous avons alors constaté que le poids des ovaires rapporté au poids corporel des animaux GBH+ était plus important que celui des animaux CT et GBH-. Cependant, le poids corporel des animaux diminue avec la dose de GBH administrée. Il y a donc deux interprétations possibles à cette augmentation du poids relatif des ovaires des animaux GBH+ :

- Soit les ovaires des animaux GBH+ sont effectivement plus lourds que les ovaires des animaux CT et GBH-.
- Soit, le poids des ovaires est inchangé et la diminution du poids corporel des animaux (dénominateur du calcul du ratio) augmente la valeur de leur poids relatif.

Cette observation a motivé la réalisation d'une analyse RNAseq sur les ovaires des animaux des trois groupes. Trois comparaisons ont alors été faites :

- CT vs GBH+ (**Figure 40**)
- CT vs GBH- (**Figure 41**)
- GBH- vs GBH+ (**Figure 42**)

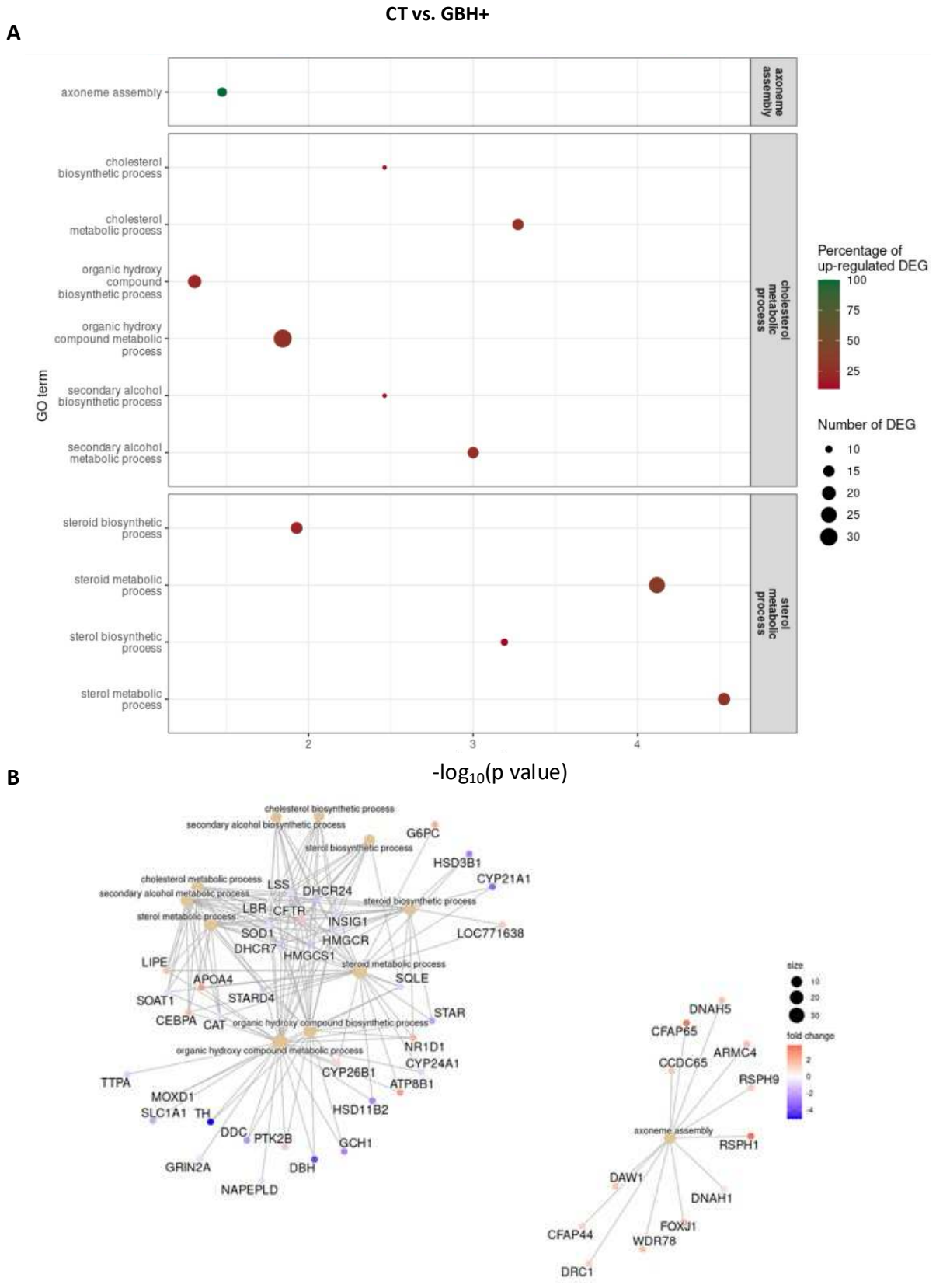
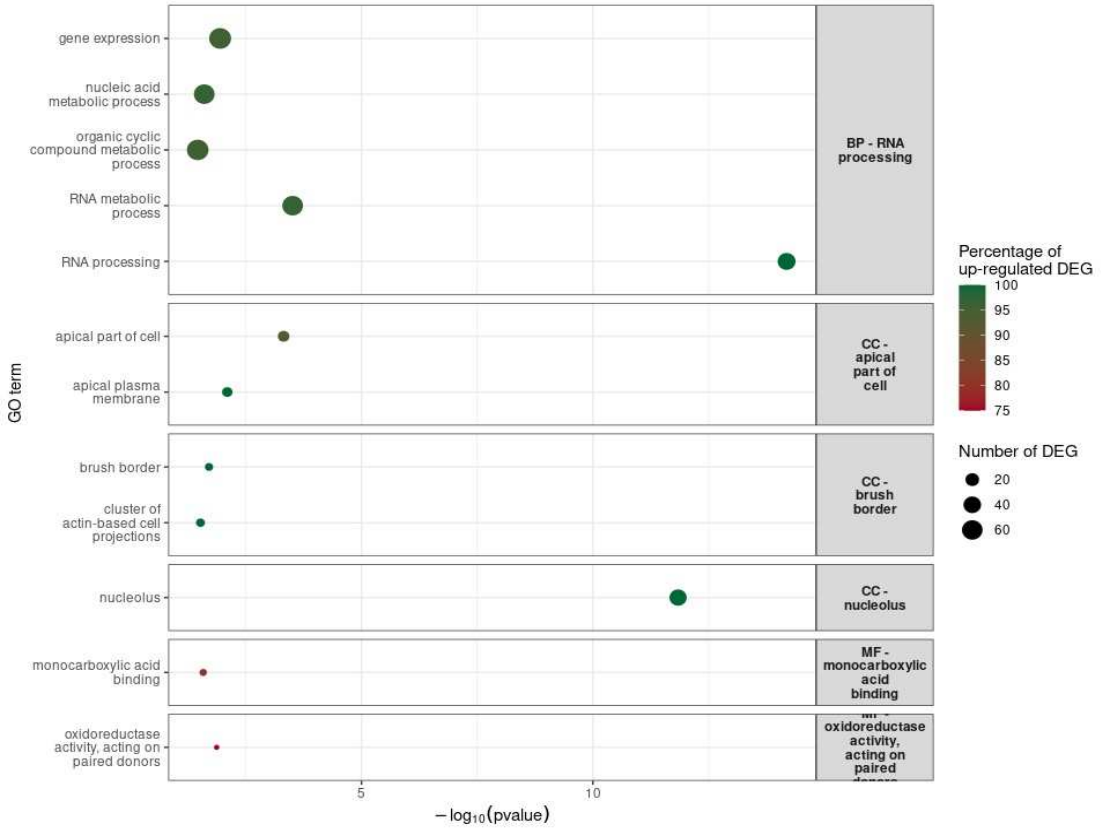


Figure 40. (A) Les termes GO les plus enrichis chez les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de l'ovaire entre les animaux CT (n=5) et GBH+ (n=5), avec une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. (B) Réseau d'interaction génique des DEGs dans l'ovaire des animaux CT (n=5) et GBH (n=5), où les nœuds et les arêtes représentent les associations entre gènes, avec les nœuds rouges et violets correspondant respectivement aux gènes up-régulés et down-régulés, et une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie.

CT vs. GBH-

A



B

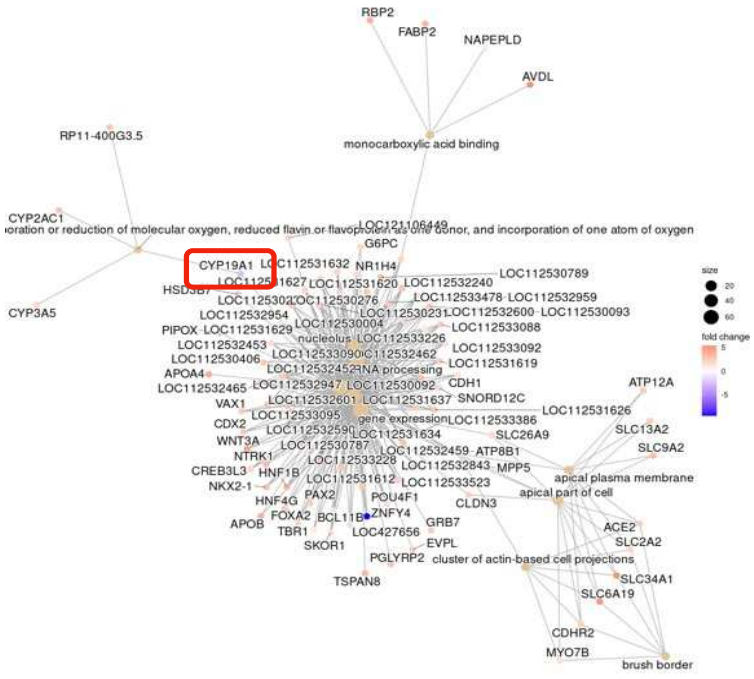


Figure 41. (A) Les termes GO les plus enrichis chez les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de l'ovaire entre les animaux CT (n=5) et GBH+ (n=5), avec une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. (B) Réseau d'interaction génique des DEGs dans l'ovaire des animaux CT (n=5) et GBH (n=5), où les nœuds et les arêtes représentent les associations entre gènes, avec les nœuds rouges et violets correspondant respectivement aux gènes up-régulés et down-régulés, et une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie.

GBH- vs GBH+

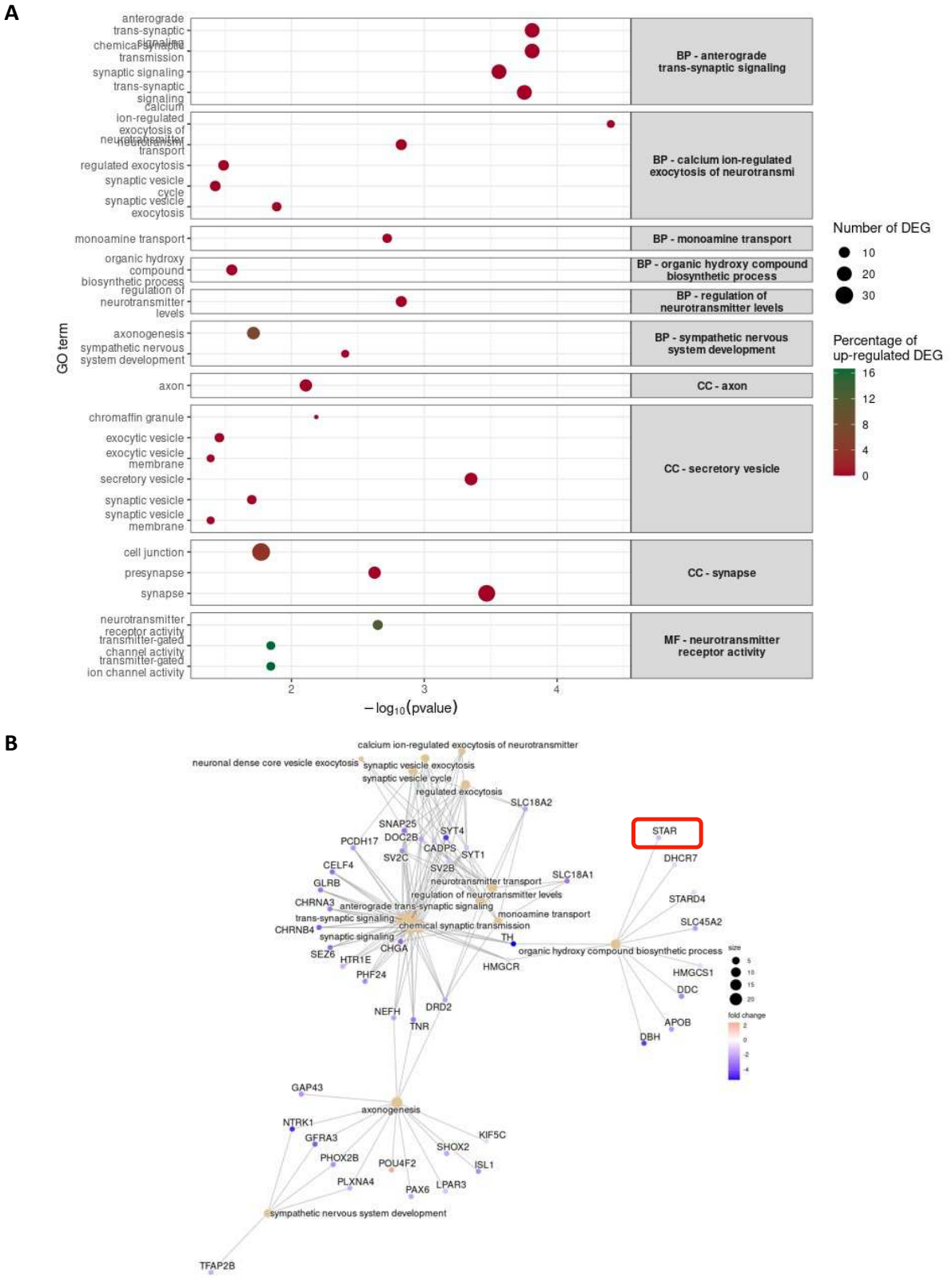


Figure 42. (A) Les termes GO les plus enrichis chez les gènes différentiellement exprimés (DEGs) de l'ovaire entre les animaux CT (n=5) et GBH+ (n=5), avec une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie. (B) Réseau d'interaction génique des DEGs dans l'ovaire des animaux CT (n=5) et GBH (n=5), où les nœuds et les arêtes représentent les associations entre gènes, avec les nœuds rouges et violets correspondant respectivement aux gènes up-régulés et down-régulés, et une taille de point corrélée positivement au nombre de DEGs dans chaque voie.

Il ressort de cette analyse que chez les animaux GBH+, la plupart des gènes affectés par l'exposition sont liés au métabolisme du cholestérol et des stérols. Notons que *HSD3B* et *STAR* font partie des transcrits sous-exprimé. Chez les animaux GBH-, *CYP19A1* est sous-exprimé. Tous ces transcrits codent pour des enzymes et transporteurs impliqués dans la stéroïdogenèse. Nous avons confirmé par qPCR et par Western Blot que les niveaux de transcrits et de protéines de ces enzymes sont effectivement réduits chez les animaux GBH- et GBH+ (**Figure 43**).

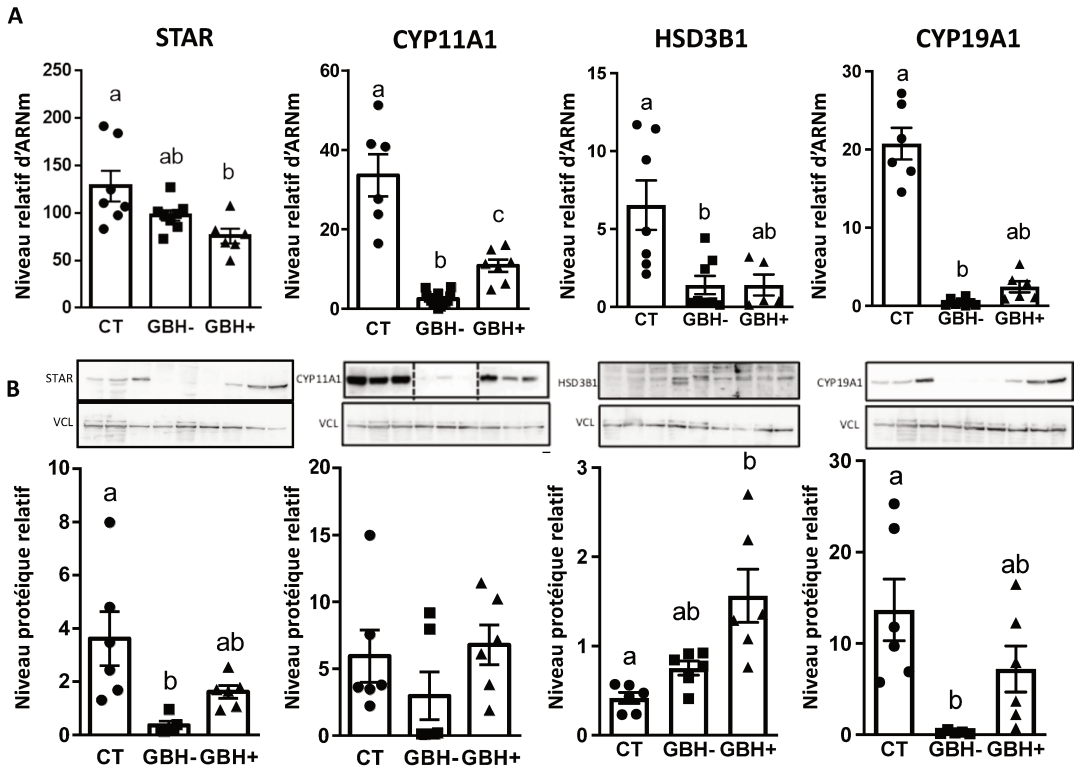


Figure 43. (A) Niveaux relatifs d'ARNm de facteurs stéroïdogènes dans les ovaires des animaux (n=8 dans chaque groupe). (B) Niveaux protéiques relatifs de facteurs stéroïdogènes dans les ovaires des animaux (n=6 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

L'effet semble être bien plus prononcé chez les animaux GBH-, pour lesquels les niveaux protéiques de STAR et CYP19A1 (aromatase) sont à quasi-zéro. Ce type de courbe non monotone en U rappelle ce que l'on peut observer dans certains cas de perturbations endocriniennes (Vandenberg, 2014). Bien sûr, cette observation seule ne suffit pas à affirmer que le GBH est un perturbateur endocrinien, mais il apparait désormais légitime de

s'interroger sur la possible existence d'une perturbation endocrinienne causée par le GBH chez la poule.

3. Les GBH, perturbateurs endocriniens chez la poule ?

i. Synthèse de Pg par les cellules de la granulosa (Fréville et al., 2024b)

Nous avons exposé des cellules primaires de la granulosa de poules issues de follicules F1 et F3 et 4 à des doses croissantes de GBH pendant 24h. La viabilité et la prolifération de ces cellules sont données en **Figure 44**.

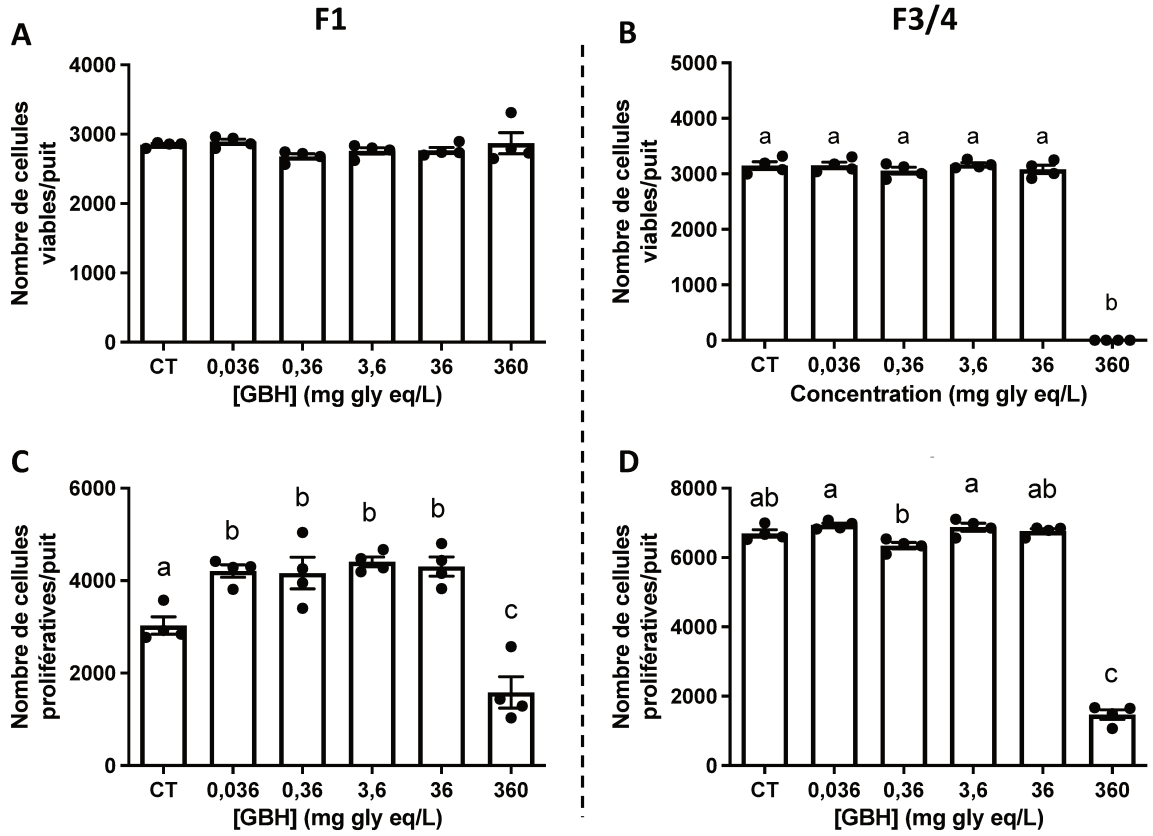


Figure 44. Viabilité et prolifération des cellules de la granulosa primaires issues de follicules F1 (A et C) et de follicules F3 et F4 (B et C) en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=4, N=4) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Aucun effet n'est observé sur la viabilité cellulaire des cellules issues des follicules F1. Une augmentation de la prolifération de ces cellules est néanmoins observée pour les doses comprises entre 0,036 et 36 mg gly eq/L. Une diminution significative de la prolifération cellulaire est observée pour la dose de 360 mg gly eq/L. Pour les follicules F3/4, nous observons une diminution significative de la viabilité et de la prolifération cellulaire à la dose de 360 mg gly eq/L.

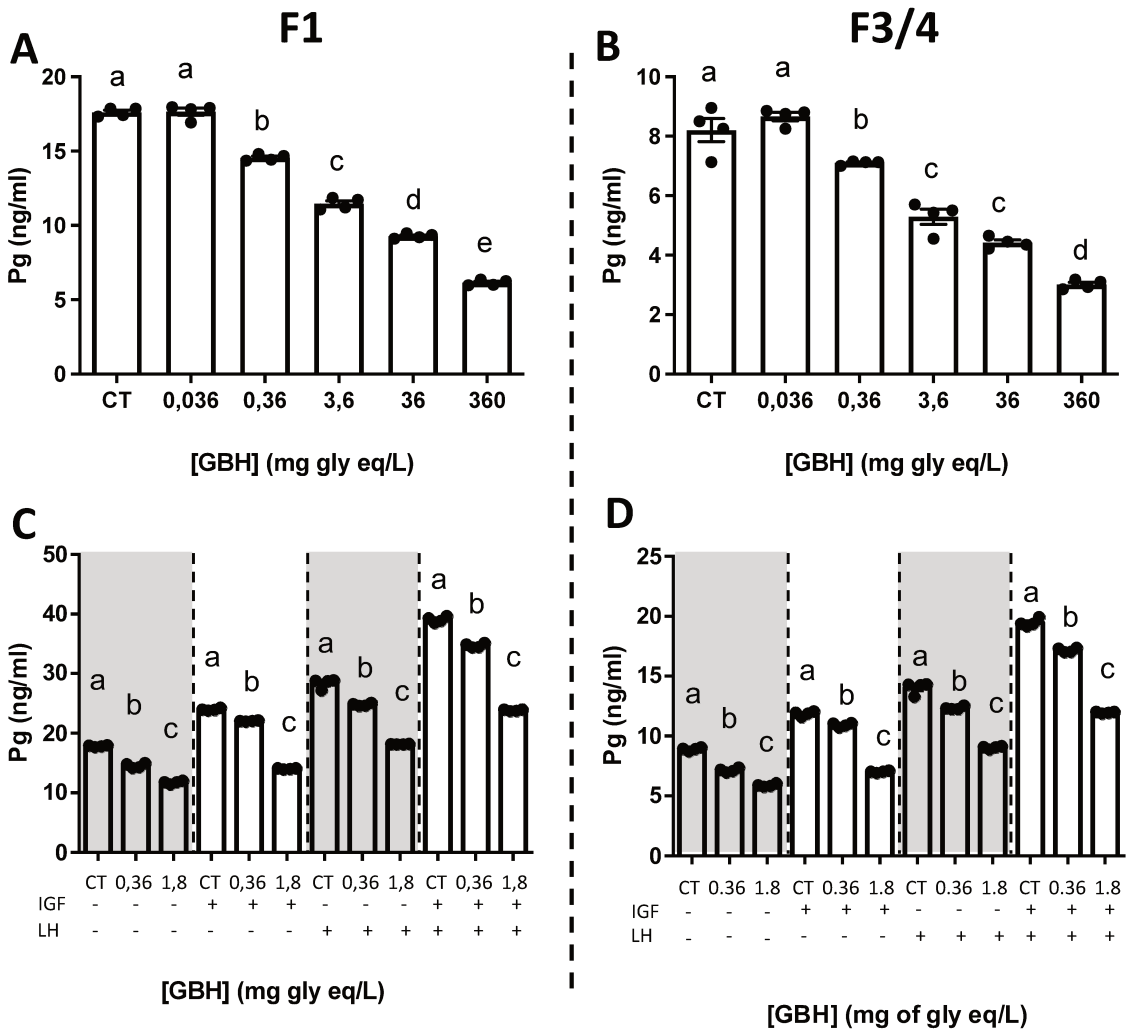


Figure 45. Concentration en Pg (ng/mL) dans le milieu de culture des cellules de la granulosa primaires issues de follicules F1 et de follicules F3 et F4 en présence de concentrations croissantes de GBH (A et B), avec ou sans ajout de LH et FSH (10^{-8} M) dans le milieu de culture (n=4 par groupe) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

La **Figure 45** ci-dessus représente les niveaux de Pg dans le milieu des cellules après 24h d'exposition. La production de Pg est réduite de manière dose dépendante à partir de la dose de 0,36 mg gly eq/L pour les follicules F1 et les follicules F3 et F4, avec ou sans ajout de LH et/ou IGF-1 dans le milieu de culture.

ii. Synthèse de Pg par les explants ovariens (Fréville et al., 2024a)

Nous avons exposé des explants ovariens issus de poules âgées de 10 jours pendant 24h à des doses croissantes de GBH. Nous avons par la suite dosé la progestérone et l'œstradiol dans le milieu de culture des explants (**Figure 46**).

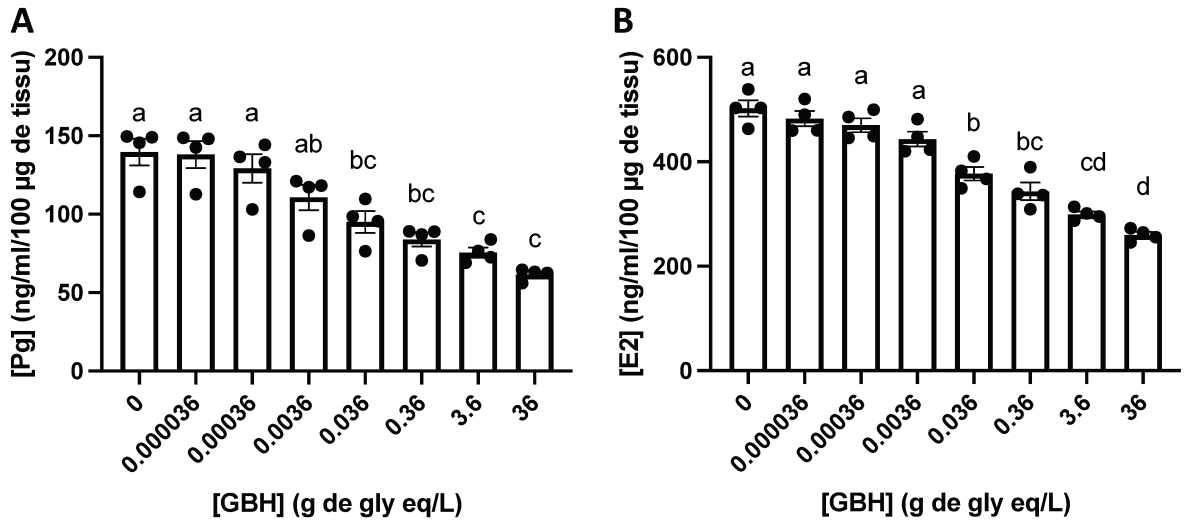


Figure 46. Concentration en Pg (A) et E2 (B) (ng/mL) dans le milieu de culture des explants ovariens en présences de concentrations croissantes de GBH pendant 24h (n=4). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous pouvons constater que les productions d'hormones sont significativement réduites pour des concentrations supérieures ou égales à 0,036g d'équivalent glyphosate/L. Nous avons mesuré l'expression des transcrits d'enzymes de la stéroïdogenèse dans ces explants (**Figure 47**).

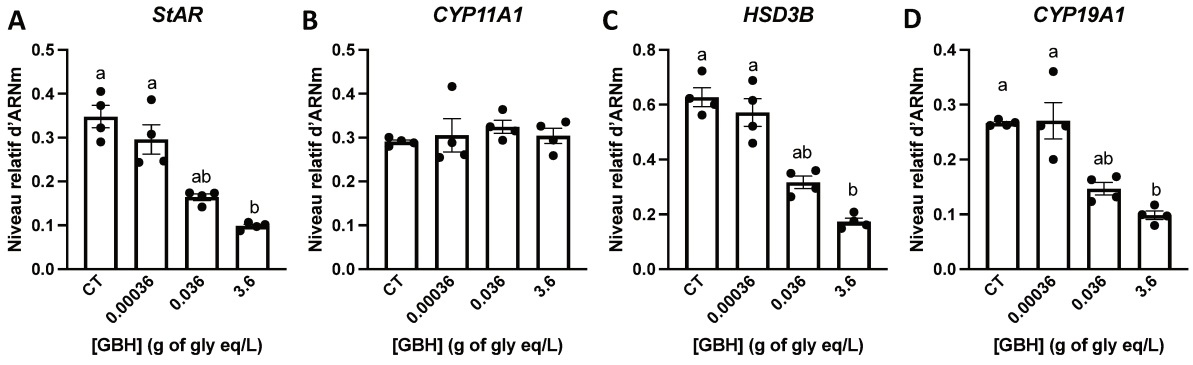


Figure 47. (A) Niveaux relatifs d'ARNm de facteurs stéroïdogènes dans les explants ovariens exposés à des doses croissantes de GBH pendant 24h (n=4 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

La réduction dose dépendante des niveaux de transcrits de *StAR*, *HSD3B* et *CYP19A1* semble cohérente avec la diminution dose dépendante des niveaux de Pg et E2. Une mesure de l'expression et de l'activité protéique dans ces explants permettrait de confirmer que la réduction observée de la sécrétion hormonale est bien due à une diminution des niveaux d'enzymes.

4. Développement de la descendance

i. Suivis du développement embryonnaire des œufs GBH

Le développement des embryons a été évalué par une dissection puis une pesée des organes (**Tableau 17**).

Pendant l'exposition	ED15		ED21	
	CT (D42 n=20)	GBH (D42 n=20)	CT (D42 n=20)	GBH (D42 n=20)
Œuf (g)	55,87±0,70	54,60±0,70	_	_
Embryon (g)	21,32±0,24	11,40±1,18*	41.09±1.04	38.16±2.25
Vésicule vitelline (g)	13,08±0,53	6,063±0,77*	2.97±0.35	3.01±0.92
Foie (g)	0,39±0,014	0,21±0,02*	1.02±0.03	0.84±0.05*
Cerveau (g)	0,58±0,02	0,34±0,03*	0.89±0.03	0.74±0.05*
Tractus digestif	1,14±0,06	0,48±0,07*	4.97±0.09	4.33±0.37
Cœur (g)	0,14±0,01	0,08±0,01*	0.33±0.02	0.28±0.01

Tableau 17. Poids des organes des embryons des œufs issus des animaux CT (n=20) et GBH (n=20) à ED15 et ED21. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Les embryons du groupe GBH présentent un retard de développement embryonnaire. L'ensemble des organes que nous avons pesés ainsi que l'embryon lui-même avaient un poids réduit dès ED15. Seuls le foie et le cerveau des embryons étaient de masses réduites à ED21. Cela s'explique probablement par le fait que seuls les embryons « les moins impactés par l'exposition » survivent jusqu'à ED21. En revanche, seulement un ou deux poussins ont survécu après l'éclosion.

Notre approche pour évaluer les effets du GBH sur le développement embryonnaire se différencie de celles adoptées dans d'autres études. Alors que certains auteurs ont opté pour des injections *in ovo* pour évaluer ces effets, nous avons préféré commencer par créer une exposition parentale. Cependant, bien que le mode d'administration soit différent, les effets que nous observons sont similaires à ceux que ces auteurs ont observé. Par exemple, Winnick and Dzialowski, 2013 ont observé une réduction de la masse embryonnaire, de la masse cardiaque, de la masse hépatique, de la longueur du tibiotarse (un os de la patte) et de la longueur du bec, après des injections de glyphosate et de GBH. Ils observent également une augmentation de la mortalité embryonnaire. Toutefois, une étude appliquant un protocole

similaire a été réalisée chez la caille japonaise. Les auteurs ont exposé des cailles parents à un GBH (200 mg/kg de nourriture) et ont observé que le développement embryonnaire de la descendance était réduit (Ruuskanen et al., 2020b). Cependant, cette réduction était moins spectaculaire que celle que nous avons constatée. Cela s'explique très probablement par le fait que la dose choisie est nettement inférieure à celle que nous utilisons (équivalente à 1250 mg/kg de nourriture.

ii. Impact in ovo du GBH

À ce stade, il est pertinent de se demander si les effets observés par d'autres auteurs à la suite d'injections *in ovo* auraient également été constatés à la suite d'une exposition parentale, qui est un scénario plus probable sur le terrain. Afin d'explorer cette question, nous avons également effectué des injections *in ovo* pour confirmer que les effets observés *in vivo* peuvent également être observés *in ovo*.

Nous avons donc injecté des doses croissantes de GBH (0,03 ; 0,3 ; 3 ; 30 ng gly eq/g d'œuf, ou du PBS comme contrôle) dans des œufs à E13 (data autour de laquelle l'embryon commence à puiser dans les réserves énergétiques de l'albumen). Nous avons également gardé un groupe d'œufs non injectés. Aucune surmortalité embryonnaire n'a été constatée les jours suivants. Après 4 jours d'exposition (ie à ED17), les embryons ont été disséqués et les organes pesés. Aucun effet significatif n'a été détecté sur le poids de l'œuf, de l'embryon, de la vésicule vitelline, de la rate, et du tissu adipeux de l'embryon. En revanche, une augmentation significative de la masse du cœur des embryons a été observée pour la dose de 0,03 ng gly eq/g d'œuf, soit la plus faible dose injectée (**Figure 48**).

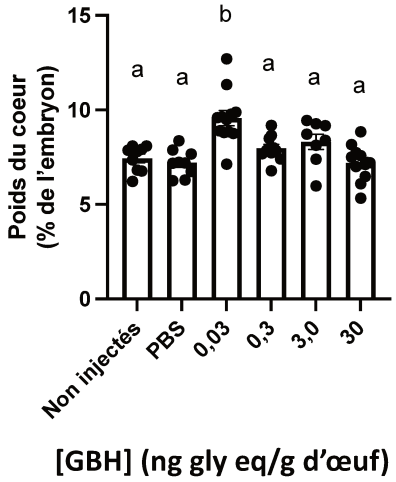


Figure 48. Poids relatif du coeur des embryons (ng gly eq/g d'oeuf) (n=12 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Cette observation est assez surprenante, surtout considérant que Winnick and Dzialowski, 2013 ont quant à eux observé une réduction de la masse du cœur après injection de GBH. Notons tout de même que la dose, le moment de l'injection et le moment des dissections sont différents dans le travail de ces auteurs. Nous avons donc tenté de reproduire cet effet *in vitro* en ajoutant des doses croissantes de GBH dans le milieu de culture de cardiomyocytes primaire obtenus à partir de cœurs d'embryon. Nous avons mesuré la viabilité et la prolifération des cellules après 24 h d'exposition (Figure 49).

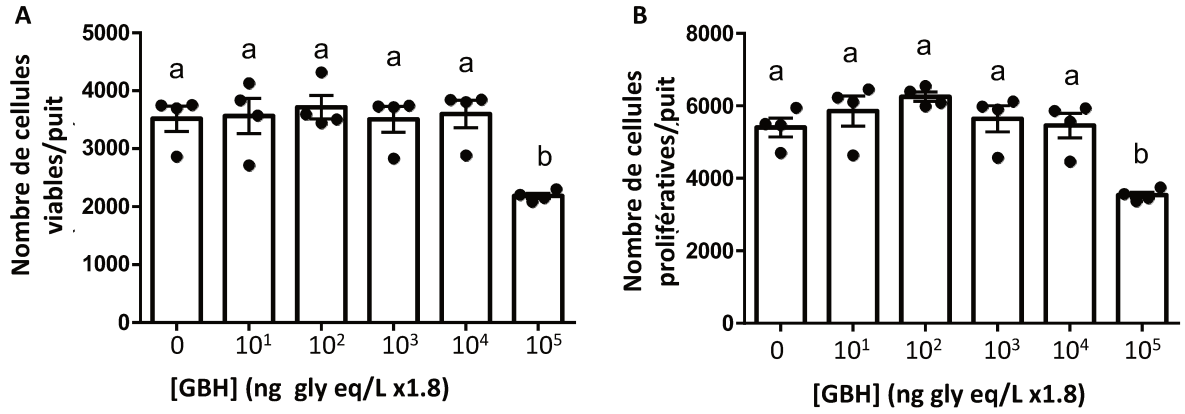


Figure 49. Viabilité (A) et prolifération (B) des cellules primaires cardiaques après 24h d'exposition à des doses croissantes de GBH (n=4 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous observons des effets similaires à ceux observés par Winnick and Dzialowski, 2013, c'est-à-dire une réduction dose-dépendante de la viabilité ainsi que de la prolifération des cellules.

Finalement, nous avons souhaité utiliser une technique appelée CAM assay afin d'évaluer l'effet du GBH sur l'angiogenèse *in ovo*. Ici encore, c'est la plus faible dose utilisée qui produit un effet significatif sur le développement des vaisseaux sanguins sur la CAM (**Figure 50**).

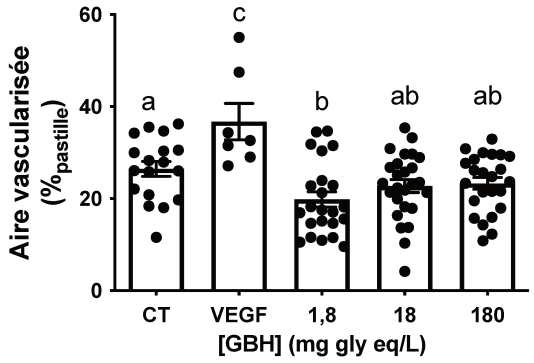


Figure 50. Aire vascularisée sur la CAM après 72h d'exposition au GBH (CT, n=18; VEGF, n=7, 1,8 mg gly eq/L, n=23; 18 mg gly eq/L, n=26; 180 mg gly eq/L, n=26). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

iii. *Suivis du développement de la descendance Ex-GBH (Estienne et al., 2023)*

Le jour de l'éclosion, les poussins ont subi un test comportemental de type open-field test. Lors de ce test, les poussins du groupe Ex-GBH ont parcouru une distance significativement plus grande que les poussins issus des œufs fécondés du groupe CT. Leur vitesse de déplacement, le nombre de fèces produits et le nombre de sauts étaient également plus importants chez les animaux issus des œufs Ex-GBH.

	CT (n = 15)	Ex-GBH (n = 15)
Distance (cm)	1265±93.7	1897±129.1***
Vitesse (cm/sec)	4,21±0.31	6,32±0.43***
Sauts (n)	0,50±0.22 a	1,81±0.36**
Fèces (n)	0,25±0.11 a	0,75±0.14*

Tableau 18. Paramètres obtenus à la suite de l'Open-field test. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

L'impact des GBH sur le comportement a été étudié chez de nombreux modèles. Par exemple chez l'abeille, l'ingestion de doses sublétals de GBH provoque des troubles comportementaux tels qu'une diminution de la vitesse de déplacement, des tremblements, une désorientation et des auto-lavages excessifs (Prado et al., 2023). Il a également été observé lors d'une étude précédente qu'une exposition à un GBH augmente l'anxiété chez la souris (Aitbali et al., 2018). Les auteurs relient cette observation à une dysbiose microbienne dans le tractus digestif des animaux. Nous pouvons donc faire un rapprochement entre les résultats de cette étude et les effets observés sur le microbiote caecal des poules (**Impact du GBH sur le microbiote caecal chez l'adulte**). Cependant, les poules adultes exposées au GBH ne présentaient aucune altération du comportement (données non présentées). En outre ce que nous observons ici ressemble plus à une diminution de l'anxiété chez les poussins issus des œufs Ex-GBH. Une étude similaire à la nôtre réalisée chez la descendance de souris adultes oralement exposées à un GBH a également observé une diminution de la mobilité des animaux, en lien avec une activation des récepteurs NMDA, une altération de la transmission cholinergique, un dysfonctionnement des astrocytes, une suractivation de ERK1/2 et une diminution de la phosphorylation de p65 NF-κB (Cattani et al., 2017). Il serait donc intéressant d'étudier ces paramètres chez les animaux de notre étude dans de futures travaux et les confronter à ce qui a été observé dans cette étude.

Le développement des poussins issus de l'éclosion des œufs Ex-GBH a été évalué par une pesée au jour de l'éclosion, et 5 et 10 jours après l'éclosion.

Poids du poussin (g)	Ex-CT (n = 213)	Ex-GBH (n = 186)
Éclosion + 0	44.19±0.21	44.57±0.22
Éclosion + 5	107.1±0.80	112.5±0.79*
Éclosion + 10	171.5±1.39	176.1±1.59*

Tableau 19. Poids des poussins issus des poules des groupes Ex-CT (n=213) et Ex-GBH (n=186) 0, 5 et 10 jours après l'éclosion. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

Nous observons que le poids corporel des animaux est supérieur chez les poussins issus des œufs Ex-GBH par rapport aux poussins issus des œufs Ex-CT. Pourtant, la quantité de nourriture consommée par les animaux est la même dans les deux groupes. Nous avons disséqué ces animaux afin de collecter et de peser leurs tissus adipeux sous-cutané et abdominaux.

Ratio poids organe/ poids corporel	Éclosion + 0		Éclosion + 5		Éclosion + 10	
	CT (n = 20)	Ex-GBH (n = 20)	CT (n = 10)	Ex-GBH (n = 10)	CT (n = 20)	Ex-GBH (n = 20)
Tissu adipeux sous-cutané	0.44±0.06	0.68±0.07*	0.48±0.07	0.27±0.03*	0.43±0.03	0.46±0.04
Tissu adipeux abdominal	_	_	0.24±0.02	0.49±0.06*	0.37±0.02	0.47±0.04*

Tableau 20. Ratio poids organe/poids corporel des poussins issus des poules Ex-CT et Ex-GBH 0, 5 et 10 jours après l'éclosion. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Nous observons que les poussins issus des œufs Ex-GBH présentent une masse de tissu adipeux plus importante, ce qui semble être la raison de l'augmentation de leur poids corporel par rapport aux poussins du groupe témoin. Nous avons procédé à une analyse lipidomique du tissu adipeux abdominal des animaux afin d'identifier les lipides différentiellement présents (**Figure 51**). Cette analyse a révélé que l'abondance des acides gras monoinsaturés (MUFA) est globalement augmentée et que l'abondance des acides gras polyinsaturés (PUFA) est globalement diminuée chez les animaux du groupe Ex-GBH. Les PUFA sont associés à une réduction de la lipogenèse chez les oiseaux (Sanz et al., 2000; Crespo and Esteve-Garcia, 2001). Leur réduction pourrait donc être en partie responsable de l'augmentation de l'engraissement que nous observons.

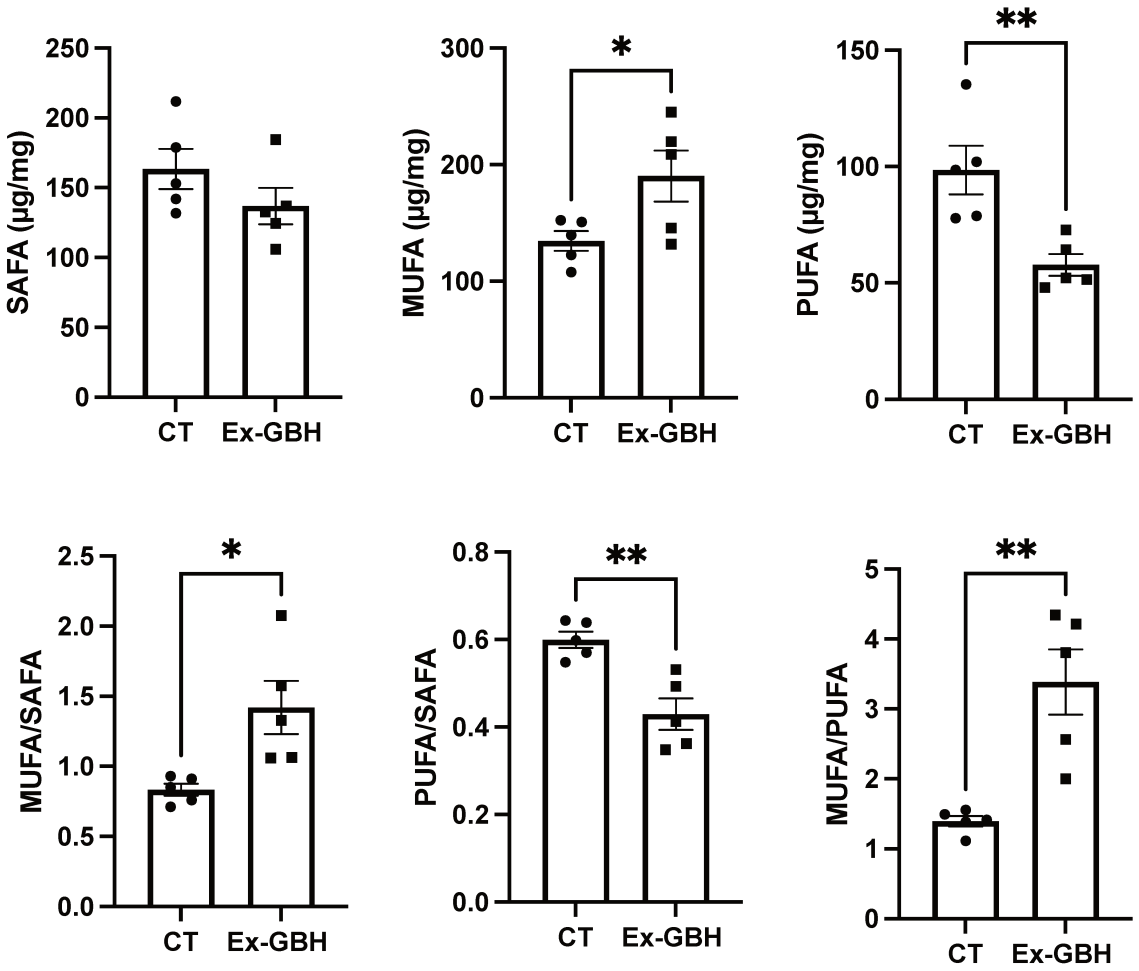


Figure 51. Mesures lipidomiques dans le tissu adipeux abdominal des poussins au jour 5 de vie. La quantité de plusieurs lipides (mg/mg de tissu adipeux) a été déterminée et les résultats pour ceux présentant des différences significatives entre Ex-CT (n = 5) et Ex-GBH (n = 5)..Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Nous avons également réalisé une prédiction bio-informatique des variations d'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras, reliant les variations des taux d'acides gras aux enzymes catalysant leurs productions. Cette analyse nous a permis d'identifier ELOV3 et FADS2 comme enzymes sous-exprimées, et FADS1, SCD1, ELOVL2, ELOVL1, 2, 3, 5, et 6 comme enzymes surexprimées, ce que nous avons vérifié par qPCR (**Figure 52**).

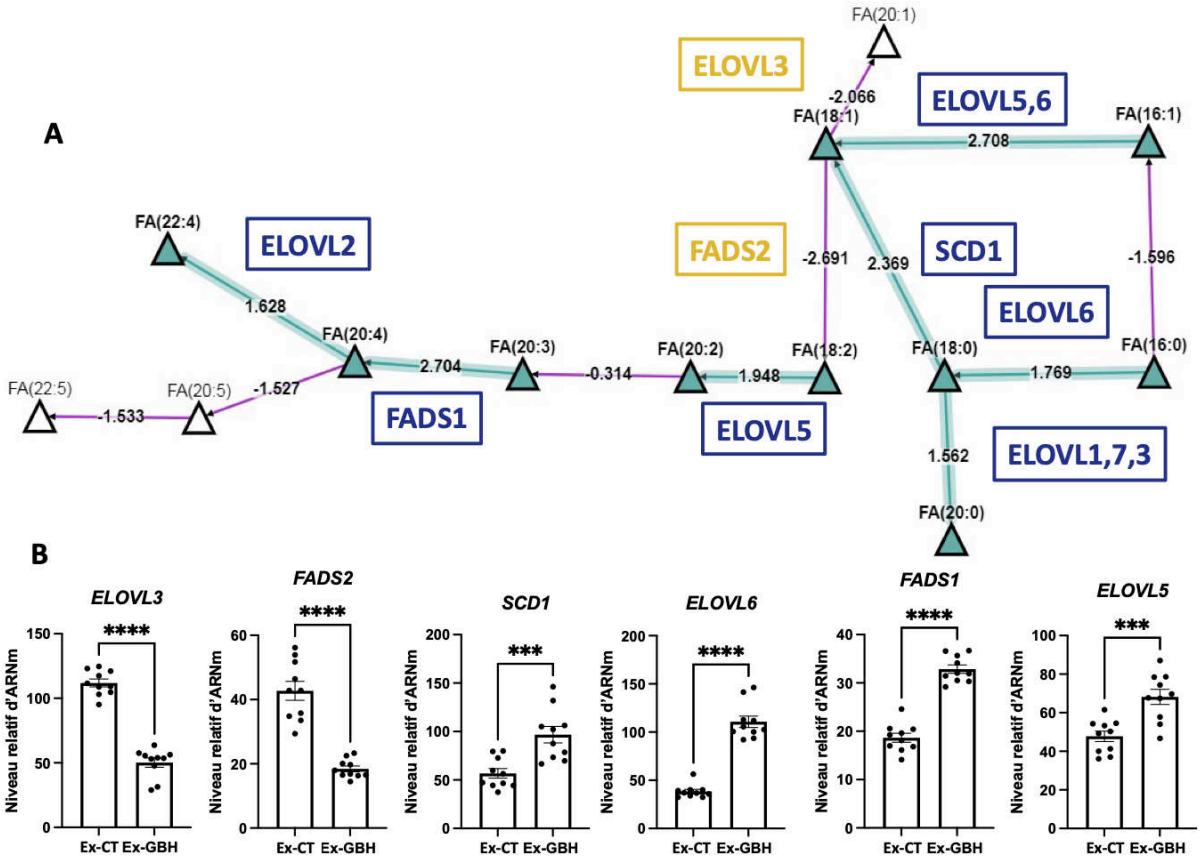


Figure 52. (A) Prédiction des niveaux d'expression des enzymes des voies de synthèse des lipides. L'analyse bio-informatique et la représentation graphique des résultats ont été réalisées grâce au programme open source LIPIDMAP (https://lipidmaps.org/biopan). La figure est présentée sous forme de comparaison des données Ex-CT vs Ex-GBH. Les gènes identifiés comme up-régulés sont représentés en bleu et les gènes que la prédiction a identifié comme down-régulés sont représentés en jaune. (B) Niveau relatif des transcrits des enzymes impliquées dans les voies lipidomiques identifiées (Ex-CT, n = 10 et Ex-GBH, n = 10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Par ailleurs, les résultats de qPCR obtenus sur FASN, ainsi que sur les récepteurs de la chémérine CMKLR1 et CCRL2 dans le foie des animaux montrent qu'une modification de la lipogenèse hépatique entre probablement en jeu dans le phénotype observé (**Figure 53**).

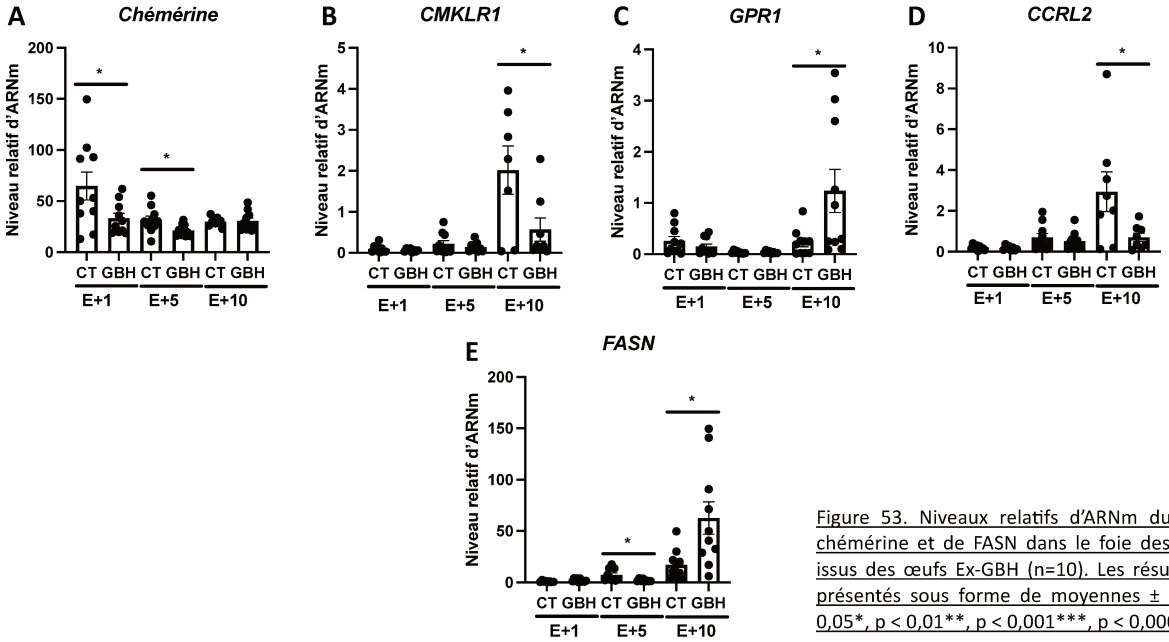


Figure 53. Niveaux relatifs d'ARNm du système chémérine et de FASN dans le foie des poussins issus des œufs Ex-GBH (n=10). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. p < 0,05*, p < 0,01**, p < 0,001***, p < 0,0001****.

Il convient de souligner ici que le moment de la collecte des œufs est suffisamment éloigné de l'exposition pour que les œufs soient considérés comme peu ou pas contaminés par le glyphosate (21 jours, voir **Figure 38**). Une étude similaire a été menée dans notre laboratoire. Dans cette étude le parent mâle a été exposé à la même dose de GBH que celle utilisée ici (Serra et al., 2021a). Les résultats obtenus sont très similaires à ceux que nous avons obtenus, montrant une augmentation de la consommation alimentaire, du poids corporel et de la masse du tissu adipeux sous-cutané chez la descendance. La combinaison de ces deux études laisse donc supposer qu'une régulation transgénérationnelle est responsable de nos observations.

5. Conclusion

Les poussins issus des œufs des poules exposées au GBH présentent une importante mortalité embryonnaire, ainsi que des retards de développement. Ces effets sont réversibles puisqu'ils sont perdus après retrait du produit. En revanche, les poussins issus du groupe Ex-GBH présentent un engraissement plus important, par rapport au contrôle. Ces résultats indiquent donc que l'exposition au GBH peut avoir des effets transgénérationnels sur la descendance.

Les résultats obtenus sur les ovaires des animaux en croissance ainsi que ceux obtenus sur les modèles cellulaires et les explants semblent indiquer que le GBH modifie la prolifération et réduit la viabilité des cellules sécrétrices d'hormones et réduit la synthèse d'hormones stéroïdiennes par les ovaires.

La combinaison de ces résultats indique que les caractéristiques clés 6 et 10 des perturbateurs endocriniens sont donc satisfaites par le GBH. La présence d'effet transgénérationnel est un indice supplémentaire en faveur de l'hypothèse selon laquelle le GBH se comporte comme un perturbateur endocrinien.

Résultats d'ouverture

Nous avons vu dans la partie précédente que si le GBH contenu dans la nourriture ne provoque pas de diminution de la prise alimentaire chez la poule adulte, il est bien associé à une réduction de la prise alimentaire chez les poules en croissance. Nous avons donc souhaité enquêter sur les causes de cette réduction. Des travaux sur la régulation des fonctions métaboliques par des hormones appelées adipokines ont été menés par notre équipe. Une adipokine en particulier, la chémérine, a retenu notre attention pour ce travail. La chémérine est une adipokine dont l'association négative avec la prise alimentaire chez la poule a été montrée lors de récents travaux menés par notre équipe. Cette réduction est accompagnée d'une réduction des expressions des transcrits *Npy* et *Agrp* (orexignènes) et à une augmentation de l'expression des transcrits de *Crh* et *Tas1r1* (anorexigènes) dans l'hypothalamus. (Estienne et al., 2021). L'équipe SENSOR a développé des outils efficaces pour l'étude de cette protéine, comme des anticorps spécifiques de la poule. Nous avons donc décidé de focaliser nos travaux sur la chémérine.

D'autres adipokines sont également impliquées dans la régulation hormonale de la prise alimentaire. L'adiponectine, l'adipokine la plus abondante dans le plasma sanguin, présente des effets similaires, car elle active de manière synergique les neurones mélanocortiniques avec la leptine dans l'ARC, tout en inhibant les neurones NPY/AgRP (Sun et al., 2016). Ses récepteurs sont ADIPOR1 et ADIPOR2. D'autres adipokines comme la visfatine sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire chez la poule (Cline et al., 2008). Nous avons donc souhaité caractériser l'impact du GBH alimentaire sur l'expression de la chémérine et de son récepteur CMKLR1 dans diverses régions de l'hypothalamus des animaux en croissance. Nous avons également caractérisé l'effet de cette alimentation sur l'expression de plusieurs adipokines dans le tractus digestif de ces mêmes animaux, dans le but d'identifier de potentielles variations associées au GBH permettant d'expliquer la diminution de la prise alimentaire.

Ouverture I. Impact du GBH sur la régulation centrale de la prise alimentaire

Nous avons vu précédemment que les poules en croissances issues des groupes GBH- et GBH+ s'alimentaient moins pendant le **protocole poules en croissance**. Nous avions alors mentionné l'hypothèse selon laquelle cette diminution de la prise alimentaire pouvait s'expliquer par une réduction de l'appétence de la nourriture contenant du GBH. Cette hypothèse n'est cependant pas celle en laquelle je crois personnellement. Nous avons donc souhaité explorer une autre hypothèse pour expliquer notre observation. Au sein de notre équipe, plusieurs travaux ont porté sur une hormone appelée chémérine, et sur ses effets physiologiques. Il ressort de ces travaux que la chémérine est impliquée dans la régulation de plusieurs processus métaboliques, dont la régulation de l'engraissement et de l'homéostasie du glucose (Bernardi et al., 2021). En outre, la chémérine est associée à une réduction de la prise alimentaire et avec la maigreur chez la poule. Elle est également associée à une diminution de l'expression des transcrits des neuropeptides orexigènes *Npy* et *Agrp*, ainsi qu'à une augmentation de l'expression du transcrits anorexigène *Crh* (Estienne et al., 2021). Nous avons donc dosé la chémérine dans le plasma sanguin des poules en croissance, à J1, J9 et J25 (**Figure 54**).

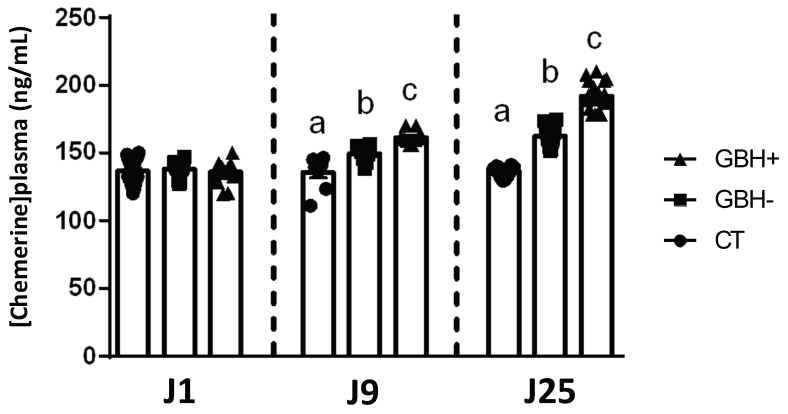


Figure 54. Concentrations de chémérine dans les plasmas des animaux du protocole Poules en Croissance à J1, J9 et J25. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous observons une augmentation dose dépendante de la concentration en chémérine dans le plasma des animaux. Cette observation ne suffit bien sûr pas pour affirmer que

l'augmentation des niveaux plasmatiques de chémérine est responsable de la diminution de la prise alimentaire des animaux. Elle nous a néanmoins motivé à caractériser l'expression de l'hormone et de son récepteur dans l'hypothalamus des animaux des trois groupes. La présence de la chémérine et celle de CMKLR1 (son récepteur principal) ont été recherchées et quantifié dans quartes régions de l'hypothalamus, par immunohistochimie (**Figure 55**) :

- Le noyau antéromédian (AM), impliqué dans la régulation de l'appétit.
- Le septum latéral, impliqué dans la régulation des émotions (en particulier l'anxiété), la locomotion et la navigation. Il joue également un rôle dans la motivation à obtenir une récompense (Wirtshafter and Wilson, 2021).
- Le noyau paraventriculaire (PVN), impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Qin et al., 2018).
- L'éminence médiane (EM), qui est un organe circumventriculaire, c'est-à-dire qu'il possède une barrière hémato-encéphalique poreuse et est traversé de vaisseaux à l'épithélium fenestré. Au contact de ces vaisseaux, se trouvent des tanycytes formant un pont entre le 3ème ventricule et le système porte (Chevillard, 2022). L'EM communique donc avec les organes du système endocrinien périphérique par le système porte. C'est une structure clé pour les communications endocrines entre le cerveau et le reste de l'organisme (Chevillard, 2022).

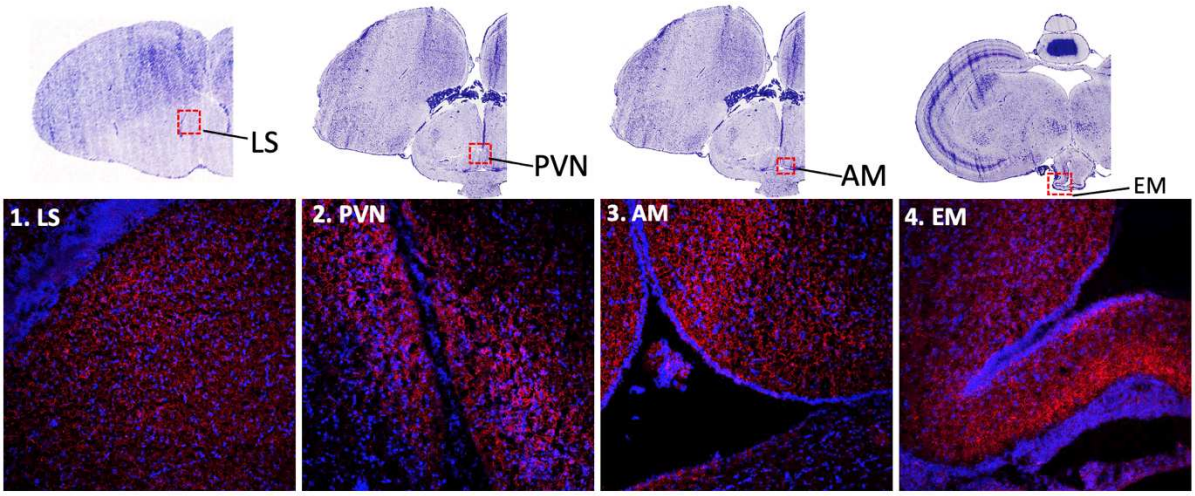


Figure 55. Détection immunohistochimique de la chémérine dans (1.) le septum latéral, (2.) le noyau paraventriculaire, (3.) le noyau anteromédiant et (4.) l'éminence médiane de l'hypothalamus des animaux CT.

Nous observons un marquage de la chémérine plus fort dans l'EM. Étant donné que l'éminence médiane est un organe dépourvu de barrière hémato-encéphalique, la plus forte quantité de chemérine détectée en son sein pourrait résulter d'un passage facilité de la chémérine depuis la circulation sanguine. Il semble également, d'après les images d'immunofluorescence, que le signal chémérine soit concentré en bordure de l'EM. Il a déjà été montré chez les rongeurs que dans l'EM, la chémérine et ses récepteurs sont localisés dans les tanycytes et les cellules épendymales, en périphérie (Helfer et al., 2016). Nous pouvons donc formuler l'hypothèse que la chémérine stimule les tanycytes afin de réguler le passage de signaux hormonaux impliqués dans la prise alimentaire à travers l'EM (Rizzoti and Lovell-Badge, 2017).

Étant donné la forte expression de la chémérine dans l'EM, nous avons décidé de comparer son expression dans cette région pour les 3 groupes d'animaux (**Figure 56**).

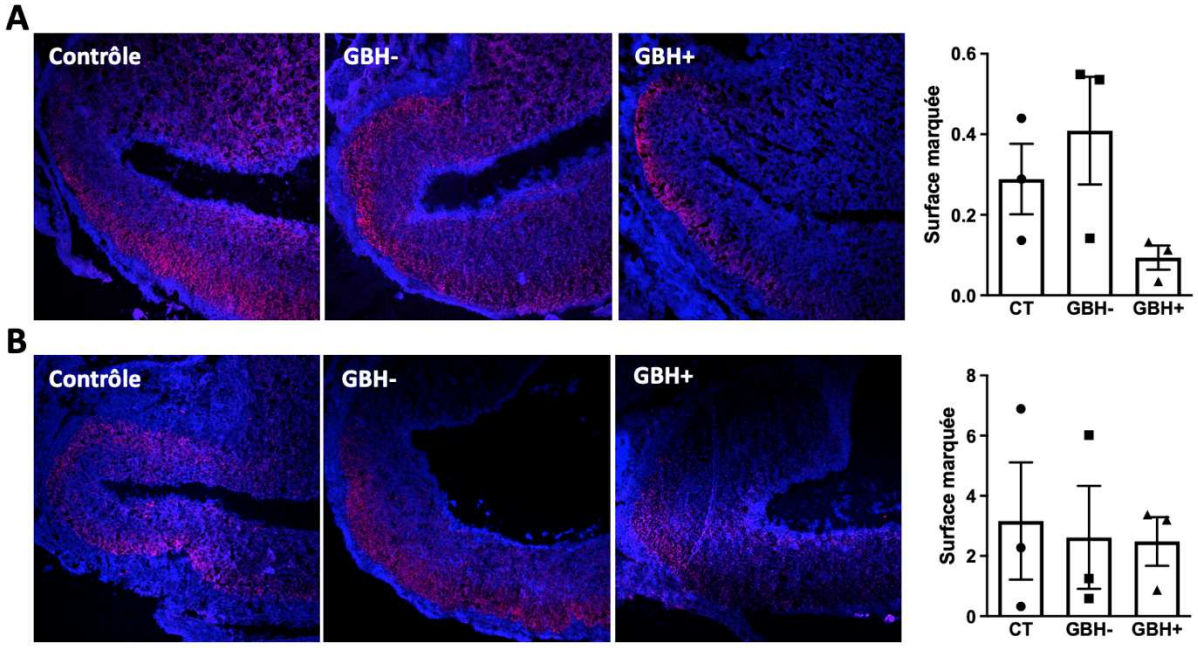


Figure 56. Détection immunohistochimique de la chémérine (A) et de CMKLR1 (B) dans l'éminence médiane de l'hypothalamus des animaux CT, GBH- et GBH+ (n=3 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

Aucun effet significatif de l'exposition au GBH n'a été détecté pour l'expression de la chémérine et de son récépteur CMKLR1 dans l'EM des animaux, bien qu'il existe une tendance à la diminution dans le groupe GBH+. Il semble par conséquent que la réduction de la prise alimentaire des animaux GBH- et GBH+ ne soit pas liée à l'action de la chémérine dans leur hypothalamus. Cependant, le nombre d'animaux utilisés est faible et ce résultat reste à confirmer.

Ouverture II. Impact du GBH sur l'expression d'adipokines dans le tractus digestif

Dans la partie précédente nous avons tenté d'identifier un lien entre la diminution de la prise alimentaire des animaux en croissance et une adipokine au niveau hypothalamique. Ici, nous tentons d'identifier un lien entre cette diminution de la prise alimentaire et la dynamique de plusieurs adipokines dans le tractus digestif, en plus de la chémérine et de ses récepteurs. L'adipokine la plus abondante dans le plasma sanguin est l'adiponectine (entre 5 et 30 mg/L de sang chez l'homme) (Estienne et al., 2020). Elle a de nombreux rôles métaboliques, comme la régulation de la glycémie et de l'homéostasie des lipides (Pajvani et al., 2003; Tao et al., 2014). Chez la poule, l'adiponectine a un impact négatif sur l'engraissement, et un impact positif sur la prise alimentaire (Yan et al., 2014; Mellouk et al., 2018). Ses récepteurs principaux sont ADIPOR1 et ADIPOR2 (Yamauchi et al., 2003), qui sont ubiquitairement distribué dans le corps malgré une prévalence plus importante dans les muscles squelettiques, le foie et les cellules endothéliales (Ramachandran et al., 2007, 2013; Estienne et al., 2020). La visfatine quant à elle régule la prise alimentaire chez la poule (Cline et al., 2008). Elle stimule également la croissance musculaire et la différentiation des adipocytes (Mellouk et al., 2018). D'autres adipokines telles que l'apéline et l'adipoline ont également été étudiées chez l'humain et la poule chez qui elle sont associées au métabolisme du glucose (Knights et al., 2014). Nous avons donc mesuré les niveaux de transcrit de ces hormones et de leurs récepteurs dans le tractus digestif des animaux en croissance. Ces niveaux sont variables entre les compartiments et entre les groupes, indiquant un possible lien entre la prise alimentaire réduite et les adipokines testées.

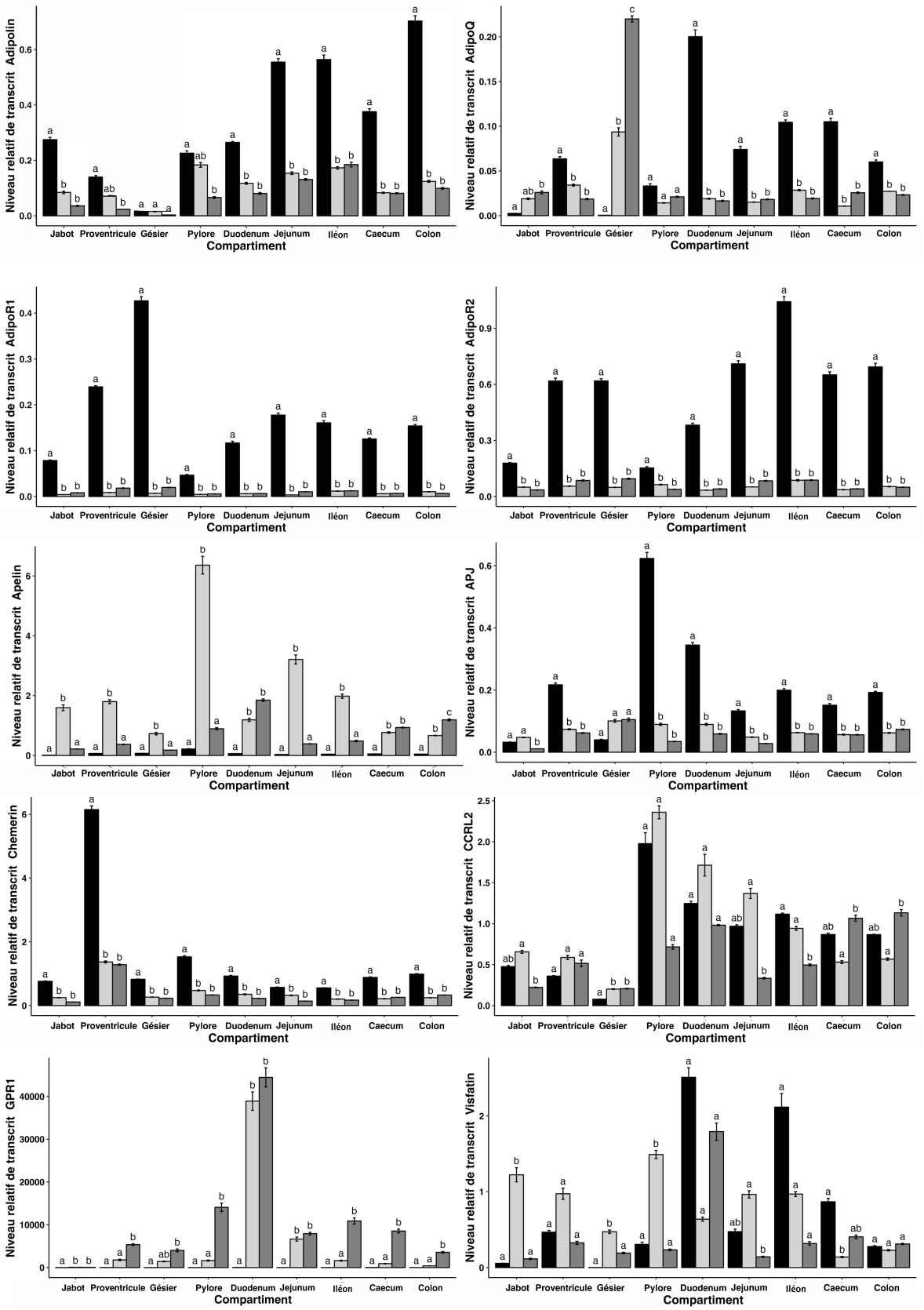


Figure 57. Niveaux relatifs de transcrits d'adipokines dans le tractus digestif des animaux en CT, GBH- et GBH+ (n=8 par groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Ouverture III. Impact du GBH sur l'immunité et la sensibilité aux infections

6. Poules adultes

Lors du **Protocole Adulte**, nous avons émis l'hypothèse que les perturbations du microbiote caecale que nous avons observées pourraient être dues à des modifications d'expression de molécules pro inflammatoires. Nous avons mesuré les niveaux de transcrits codant pour plusieurs de ces molécules dans le gésier, le caecum et la rate des animaux (**Tableau 21**).

		J42			J70		
		CT	GBH	P.value	Ex-CT	Ex-GBH	P.value
Gesier	*COX2*	0.201	0.132	0.188	0.188	0.142	0.194
	HSP27	39.9	33.8	0.637	64.1	53.4	0.360
	HSP40	94.1	93.1	0.835	91.3	93.3	0.582
	HSP60	0.533	0.361	0.113	0.707	0.628	0.310
	HSP70	3.18	2.48	0.443	4.31	2.29*	0.015
	HSP90	2.24	1.49	0.249	1.87	1.55	0.544
	NFκB	0.079	0.059	0.417	0.104	0.099	0.760
	PTGES	0.087	0.054	0.168	0.074	0.055	0.245
	TNFa	0.036	0.029	0.154	0.023	0.033	0.052
Caecum	*Chemerin*	0.336	0.337	0.986	0.272	0.257	0.731
	CMKLR1	0.017	0.017	0.984	0.065	0.048	0.301
	IgA	12.3	8.49	0.364	4.46	6.70*	0.041
	IFNα	0.071	0.086	0.620	0.434	0.290	0.230
	IFNβ	0.002	0.005	0.179	0.024	0.011	0.100
	IL-1β	0.013	0.007	0.095	0.020	0.016	0.338
	IL-6	0.001	0.001	0.895	0.004	0.002	0.077
	IL-8	0.040	0.025	0.185	0.049	0.032	0.242
Rate	*IFNα*	0.031	0.025	0.607	0.112	0.061	0.108
	IFNβ	3.50	2.18	0.301	7.90	6.00	0.414
	IL-1β	0.006	0.004	0.182	0.010	0.014	0.279
	IL-8	0.076	0.075	0.964	0.065	0.038*	0.036
	IL-22	0.035	0.021	0.273	0.093	0.024**	0.003

Tableau 21. Niveaux relatifs d'ARNm de divers gènes liés à l'immunité dans les gésiers, caeca et rates des animaux du Protocole Adulte pendant l'exposition (J42, n=9 dans chaque groupe) et après l'exposition (J70, n=12 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. $p < 0,05$*, $p < 0,01$**, $p < 0,001$***, $p < 0,0001$****.

Nous n'observons que très peu d'effets de l'exposition alimentaire au GBH sur l'expression de transcrits de molécules pro inflammatoires. Seuls *IL-8* et *IL-22* dans la rate des animaux et *HSP70* dans le gésier des animaux ont des niveaux d'expression significativement réduits après

l'exposition. Il est néanmoins possible que ces facteurs aient subi des changements de niveaux avant les prélèvements, qui étaient peut-être effectués trop tard, empêchant ainsi leur détection.

Une telle réduction d'expression de facteurs pro inflammatoires pourrait avoir pour conséquence une sensibilité accrue aux infections. De plus, la modification de l'expression de ces molécules est vraisemblablement liée à la perturbation du microbiote caecal que nous observons. Le microbiote du tractus digestif constitue un important rempart de défense face aux infections. Il serait donc intéressant d'une part de tester la capacité d'agents pathogènes tels que la salmonelle à infecter l'animal lorsque son microbiote est affaibli. D'autre part, nous pourrions mesurer l'impact que l'exposition au GBH a sur la capacité des cellules à faire face aux infections d'elles-mêmes.

7. Cas d'une infection à *Salmonella Enteritidis*

La salmonelle *Salmonella Enteritidis* est l'un des principaux agents infectieux dans les élevages de poules. La consommation de viande infectée est reconnue comme étant l'une des voies majeurs de zoonose (Foley et al., 2013). La surmortalité, les frais médicaux et la baisse de productivité liés aux salmonelloses en font un enjeux majeur de santé publique (dont le coût est estimé à plus de 3 milliards de dollars (USD) aux États-Unis) (Foley et al., 2013).

> Bien sûr, dans le cadre de ce travail, c'est plus l'impact de la santé sur la poule qui nous intéresse, mais il m'a paru pertinent de mentionner cette donnée afin de faire une petite digression sur l'initiative « One Health ». La santé animale, la santé humaine et la santé des écosystèmes sont liées et c'est sur ce postulat que le programme conjoint européen « One health » a été créé et coordonné par l'ANSES à partir de 2018. L'objectif de ce programme est de permettre des avancées dans le domaine des zoonoses, de l'antibiorésistance et des risques émergents (ANSES, 2017).

Les cellules épithéliales et immunitaires du tractus digestif constituent une barrière de protection contre les infections. *Salmonella* est également en compétitions avec le microbiote de l'animal pour établir des interactions avec les cellules du tractus (Foley et al., 2013). L'entrée dans la cellule de l'hôte se fait par deux mécanismes moléculaires. Tout d'abord, le mécanisme

trigger, qui repose sur l'action du type III secretion system 1 (T3SS1), et le mécanisme **zipper** qui repose sur des interactions entre des facteurs bactériens appelés invasines et des facteurs (récepteurs) de la cellule hôte (Chaussé et al., 2023).

Nous avons précédemment constaté qu'en cas de surexposition au GBH, le microbiote caecal, qui agit comme une barrière de défense contre les infections bactériennes, est perturbé. De plus, plusieurs facteurs immunitaires sont modulés à la suite de cette exposition. Par conséquent, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure une exposition au GBH pourrait faciliter ou inhiber une infection par *Salmonella* chez la poule.

Deux modèles cellulaires aviaires ont été utilisés. Tout d'abord les cellules LMH issues de carcinomes hépatocellulaires et de morphologie épithéliale, puis les cellules macrophages HD11. Ces cellules ont été exposées à des doses croissantes de GBH en présence de *Salmonella Enteritidis*, dont l'adhésion, l'invasion et la multiplication au sein de ces deux modèles cellulaires ont été évalué pour chaque dose.

i. Impact du GBH sur la croissance de Salmonella Enteritidis

La première étape de ce travail a été de choisir la plage de dose de GBH qui nous allions utiliser pour les tests bactériologiques. Notre objectif est d'identifier de possibles effets sur les interactions hôtes-bactéries. Ainsi, il a été nécessaire de déterminer quelles doses peuvent être appliquées aux bactéries et aux modèles cellulaires sans induire de toxicité sur aucun d'entre eux. Cette problématique est classiquement résolue par des tests de croissance bactérienne en présence de la substance à tester pendant 24 h.

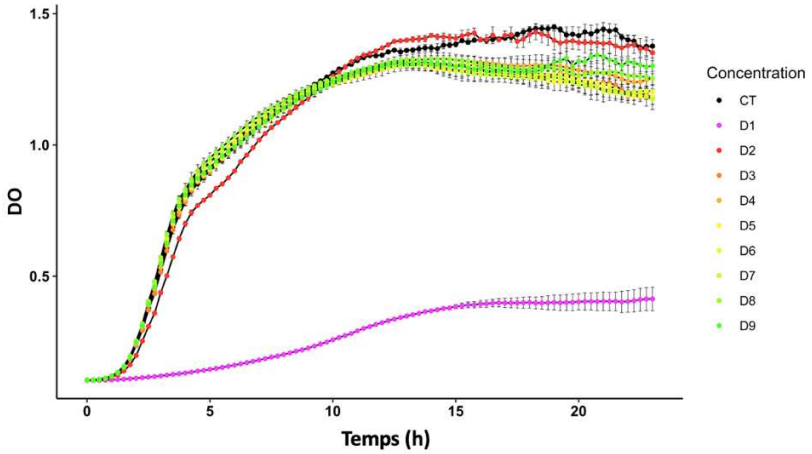


Figure 58. Croissance de *Samonella* Enteritidis en présence de doses croissantes de GBH (n=3 pour chaque concentration). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM.

Nous observons que la plus forte concentration D1 induit une forte inhibition de la croissance de la bactérie. La croissance bactérienne semble légèrement ralentie par la concentration D2, comme indiqué par une phase exponentielle retardée. Toutes les concentrations inférieures (de D3 à D9) semblent réduire la hauteur de la phase de plateau. La quantité de bactérie dans le milieu est donc réduite. La phase exponentielle ne semble néanmoins pas être affectée par la présence du GBH dans le milieu à ces concentrations. Il a été montré que *Salmonella* typhymurium exprime l'EPSPS, la rendant sensible au glyphosate (Comai et al., 1983). Les effets que nous observons sur la croissance bactérienne pourraient donc être dus à une inhibition de cette enzyme, si elle était effectivement exprimée chez *Samonella* Enteritidis. Ils pourraient également être dus à la toxicité des autres composants de la formulation.

ii. Impact du glyphosate sur l'infection des cellules LMH par Salmonella enteritidis

La viabilité et la prolifération des cellules LMH seules ont tout d'abord été évaluées afin de choisir la dose qui sera par la suite utilisé pour les tests bactériologiques (**Figure 59**).

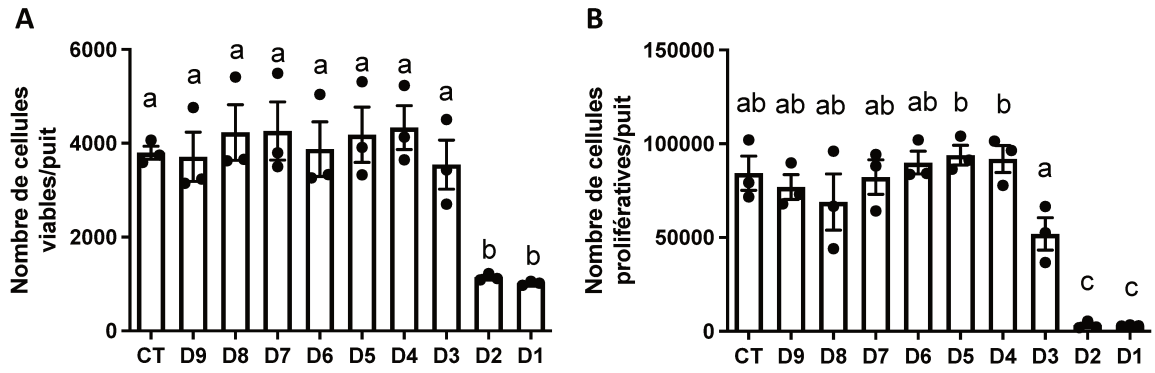


Figure 59. Viabilité (A) et prolifération (B) des cellules de la lignée LMH en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=3 pour chaque concentration) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

La viabilité des cellules est significativement réduite pour les doses D1 et D2, et une tendance à la réduction de la prolifération est observable dès la dose D3. Nous avons donc choisi d'utiliser les doses comprises entre la dose D3 et la dose D9 pour les tests bactériologiques.

Les tests d'adhésion, d'invasion et de multiplication ont été réalisés et les résultats sont présentés en **Figure 60** ci-dessous.

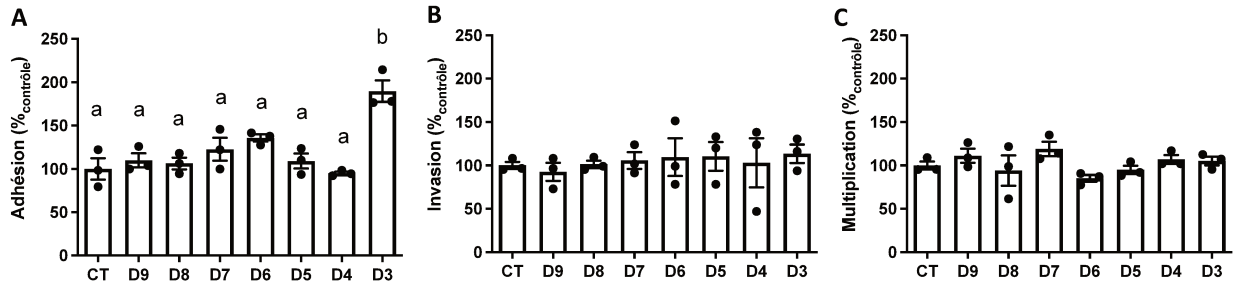


Figure 60. Adhésion (A), invasion (B) et multiplication (C) des bactéries *Salmonella* Enteritidis dans les cellules de la lignée LMH en présence de conentrations croissantes de GBH (n=4 pour chaque concentration). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous observons une augmentation de l'adhésion des bactéries aux cellules à la dose la plus forte de GBH. Aucun effet n'est observé sur l'invasion et la multiplication des bactéries.

S'est alors posée la question de savoir pourquoi les bactéries adhèrent davantage aux cellules lorsqu'elles sont exposées à la dose D3. Nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait s'expliquer par des modifications lipidiques au niveau de la membrane plasmique des

cellules. Nous avons donc mesuré l'expression de plusieurs hormones et enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique, par qPCR **(Figure 61)**.

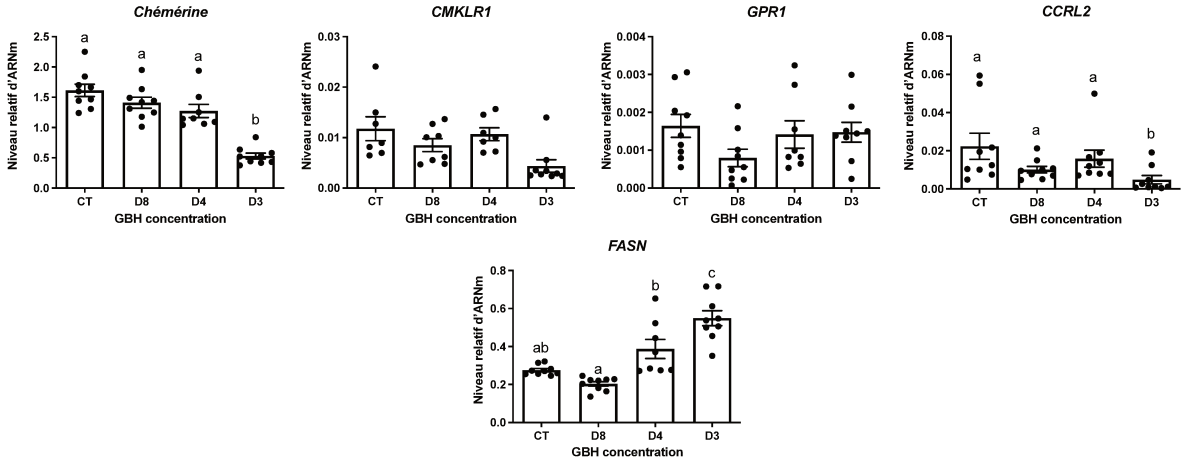


Figure 61. Niveaux relatifs d'ARNm de facteurs lipogèniques dans les cellules de lignée LMH exposées à des doses croissantes de GBH pendant 24h (n=9 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous pouvons observer que plusieurs des marqueurs mesurés indiquent une lipogenèse accrue lorsque les cellules sont exposées à la dose D3. Par exemple, l'expression du transcrit de la Fatty Acid Synthase *FASN* est significativement augmentée à cette dose, alors que celle du transcrit de la chémérine est significativement réduite. De même, nous avons pu observer par microscopie optique qu'un plus grand nombre de vésicules lipidiques sont présentes dans les cellules à la dose D3 par rapport au contrôle (**Figure 62**).

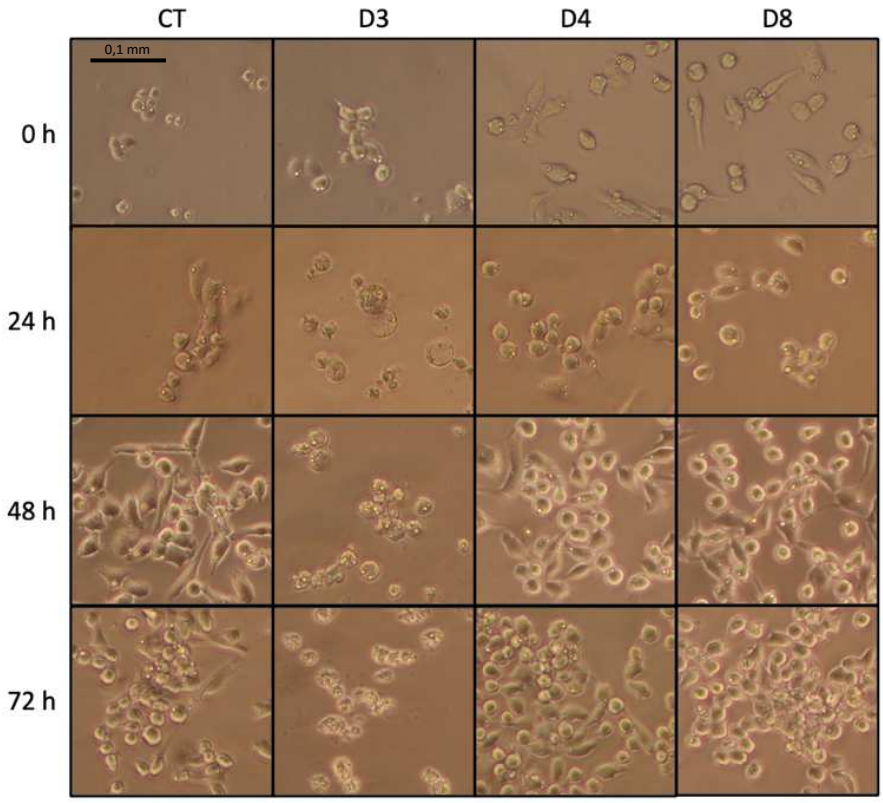


Figure 62. Observation au microscope optique de cellules LMH exposées aux dilutions D3, D4, D8 ainsi qu'au CT pendant 0, 24, 48 et 72h.

Nous avons pu confirmer cette observation grâce à un marquage à l'huile rouge des cellules. L'huile rouge se lie spécifiquement aux gouttelettes lipidiques dans les cellules. L'augmentation de l'intensité du marquage dans les cellules du groupe D3 indique donc que la quantité de gouttelettes lipidiques dans ces cellules est plus grande.

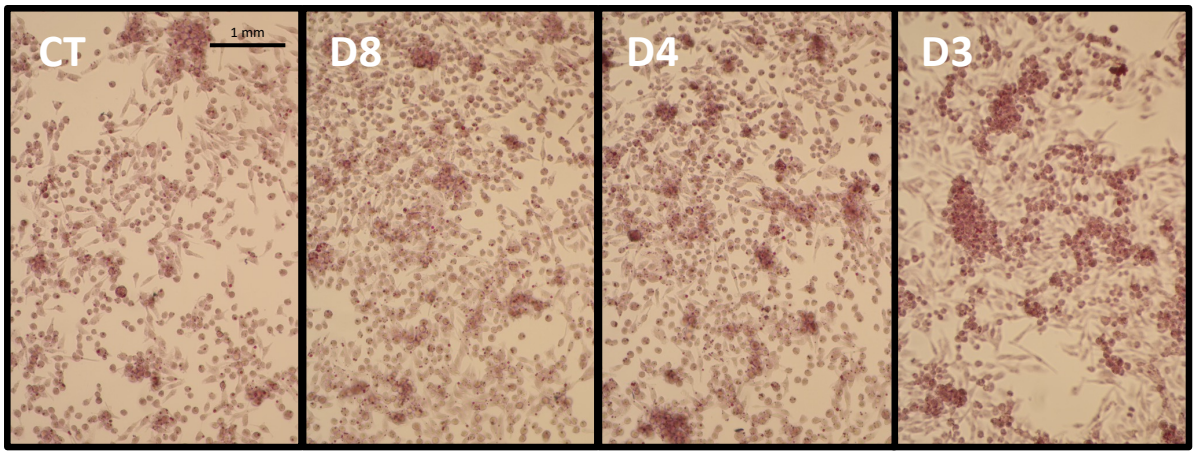


Figure 63. Observation au microscope optique de cellules LMH marquées à l'huile rouge et exposées aux dilutions D3, D4, D8 ainsi qu'au CT pendant 0, 24, 48 et 72h.

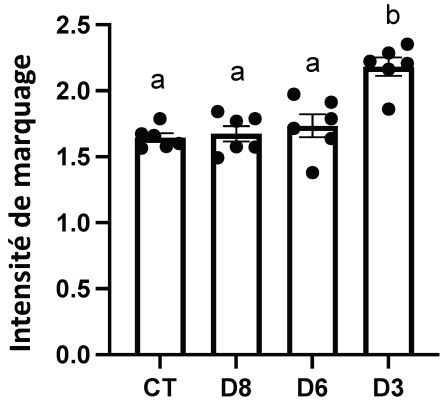


Figure 64. Intensité du marquage à l'huile rouge dans les cellules LMH exposées aux dilutions D3, D4, D8 ainsi qu'au CT pendant 24h (n=6 dans chaque groupe). Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Il semble donc bien que la dose D3 de GBH provoque une augmentation de la lipogenèse dans les cellules LMH. Cette augmentation pourrait être due à l'entrée de la cellule en apoptose, puisqu'il a été montré que l'accumulation de gouttelettes lipidiques est une conséquence cellulaire de l'apoptose (Boren and Brindle, 2012). Cependant, nous n'avons observé aucune diminution de la viabilité cellulaire à cette dose. Nous avons donc décidé de tester à nouveau la viabilité des cellules en présence des concentrations croissantes de GBH, cette fois-ci après 24 h, 48 h et 72 h d'exposition (**Figure 65**).

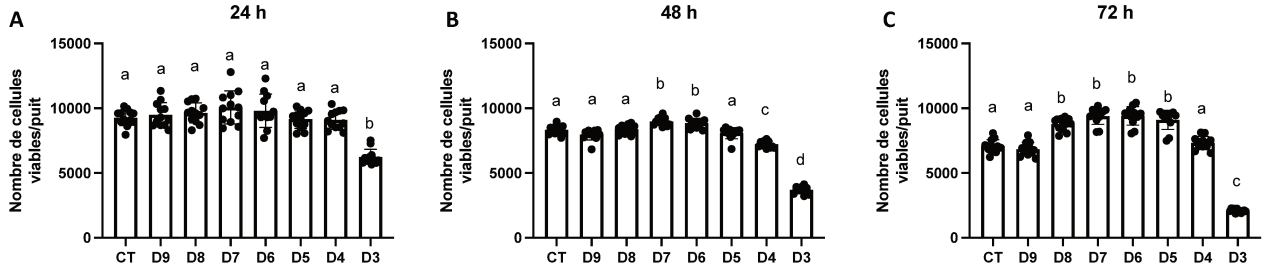


Figure 65. Viabilité des cellules de la lignée LMH en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=3 pour chaque concentration) pendant 24h (A), 48h (B) et 72h (C). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Ici nous observons bien une diminution de la viabilité des cellules dès la dose D3, qui s'accentue après 48 h et 72 h d'exposition. Il est cependant assez surprenant d'observer une augmentation de la viabilité cellulaire aux doses intermédiaires après 72h d'exposition. Nous pourrions suspecter un effet d'hormèse, mais les concentrations auxquelles l'effet apparait restent très élevées.

On parle d'effet d'hormèse lorsqu'un toxique induit une stimulation plutôt qu'une inhibition du paramètre biologique mesuré. Ce type d'effet se manifeste généralement pour de faibles doses, ce qui n'est pas le cas ici. A titre personnel, étant donné que les cellules LMH sont des cellules de foie, et qu'elles sont donc équipées d'un grand nombre d'enzyme du métabolisme des xénobiotiques, je n'exclue pas la possibilité qu'un ou plusieurs des constituants du GBH soient métabolisés en un composé utilisable par la cellule pour son maintien.

iii. Impact du glyphosate sur l'infection des cellules HD11 par Salmonella enteritidis

Encore une fois la viabilité et la prolifération des cellules HD11 seules ont tout d'abord été évalués afin de choisir la dose qui sera par la suite utilisée pour les tests bactériologiques (**Figure 66**).

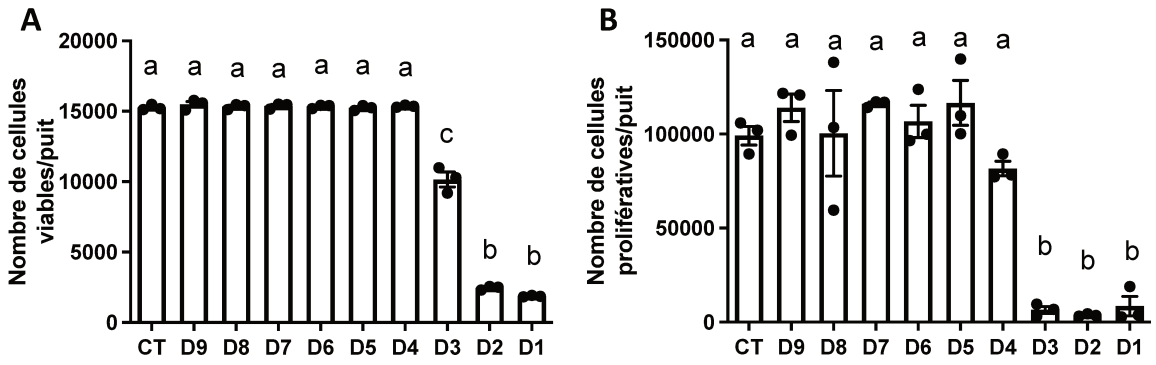


Figure 66. Viabilité (A) et prolifération (B) des cellules de la lignée HD11 en présence de concentrations croissantes de GBH dans le milieu de culture (n=3 pour chaque concentration) pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

La viabilité et la prolifération des cellules HD11 sont significativement réduites à partir de la concentration D3. Nous avons choisi de conserver la dose D3 pour les tests bactériologiques et de n'éliminer que les doses D2 et D1. Nous gardons néanmoins à l'esprit que tout effet observé lors de ces tests est à pondérer par la réduction de la viabilité et de la prolifération des cellules.

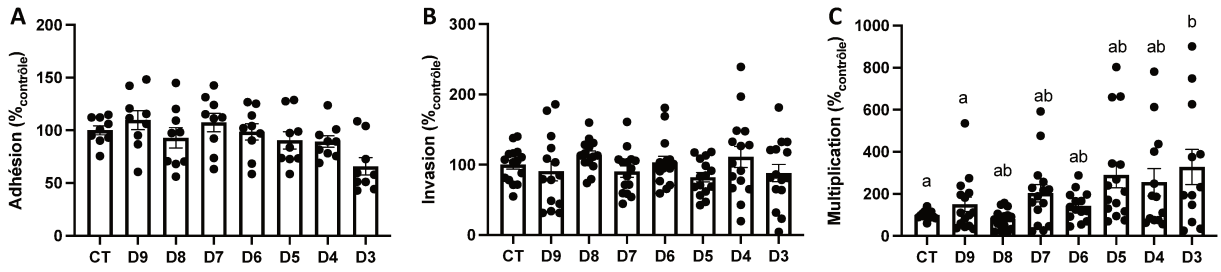


Figure 67. Adhésion (A), invasion (B) et multiplication (C) des bactéries *Salmonella* Enteritidis dans les cellules de la lignée HD11 en présence de concentrations croissantes de GBH (n=4 pour chaque concentration). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Nous observons ici une augmentation de la multiplication des bactéries à la dose plus forte (D3). Nous avons cherché à expliquer ce phénomène. Une mesure des niveaux de transcrits de plusieurs marqueurs immunitaires chez des cellules HD11 exposées à des doses croissantes de GBH nous a permis d'observer que plusieurs marqueurs pro-inflammatoires ont des niveaux de transcrits augmentés lorsque les cellules sont exposées pendant 24 h à la dose D3.

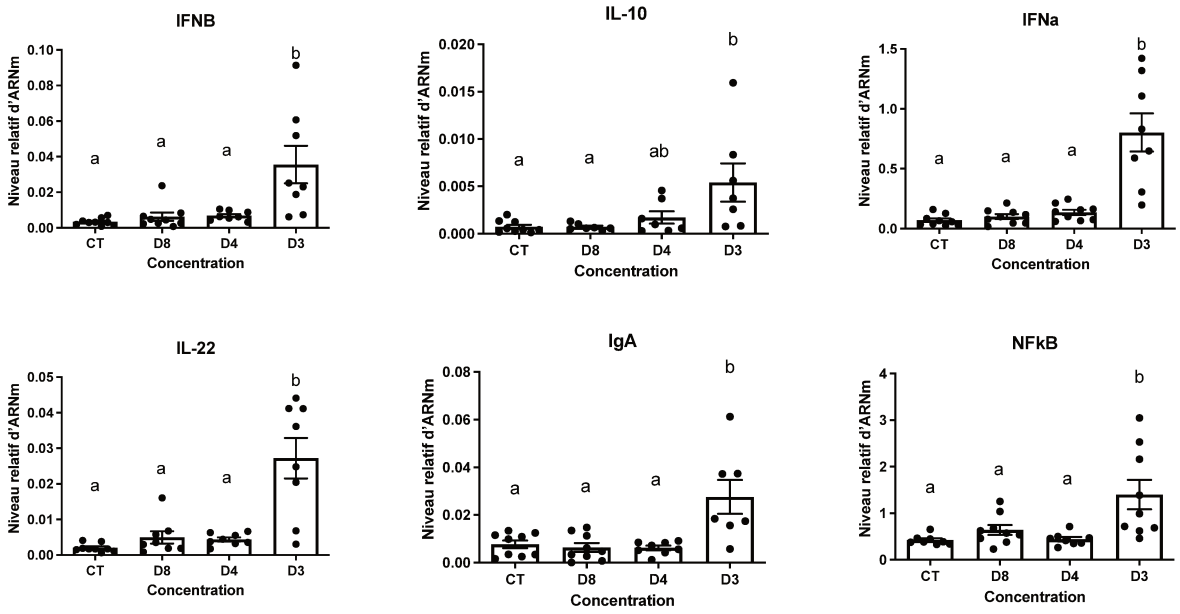


Figure 68. Niveaux relatifs d'ARNm de gènes liés à l'immunité dans les cellules de lignée HD11 exposées à des doses croissantes de GBH pendant 24h (n=9 dans chaque groupe). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives entre les groupes.

iv. Conclusion

Ces résultats semblent montrer que de fortes doses de GBH peuvent accroitre la sensibilité des deux modèles cellulaires aux infections. La transposabilité de cette observation *in vivo* reste néanmoins à étudier.

Bilan des résultats

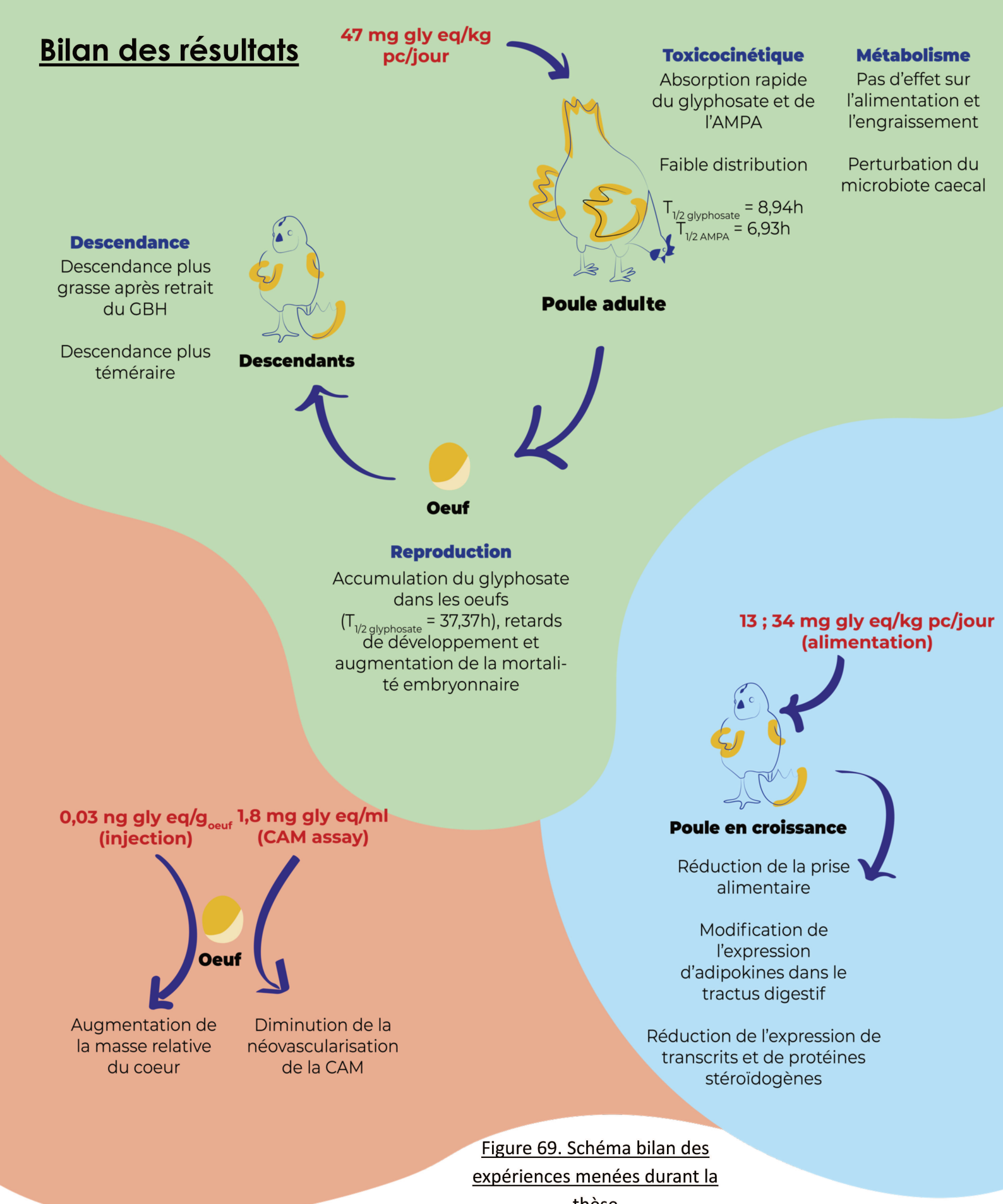


Figure 69. Schéma bilan des expériences menées durant la thèse

Les expériences menées lors de ce travail ont permis de détecter des effets du GBH sur la reproduction et le métabolisme des poules aux trois stades de développement évalués. Tout d'abord, nous avons montré chez les individus adultes que le glyphosate et l'AMPA sont rapidement absorbés à la suite d'une exposition alimentaire aiguë à un GBH (40 mg gly eq/kg pc), et qu'ils sont faiblement distribués dans les tissus périphériques. Ces mesures ont également permis de calculer les demi-vies du glyphosate et de l'AMPA, en collaboration avec le laboratoire ANSES de Fougères (T1/2 glyphosate = 8,94 h et T1/2 AMPA = 6,93 h).

Toujours chez l'adulte, une exposition alimentaire chronique de 42 jours au GBH (47 mg/kg pc/jour) suivie d'une période de sevrage de 28 jours a permis de montrer une accumulation tissulaire du glyphosate et de l'AMPA, principalement dans le foie des animaux. Cette accumulation n'est cependant pas liée à des effets détectables sur le métabolisme des animaux, dont l'engraissement n'a pas été impacté par l'exposition. Des modifications partiellement réversibles de la composition et des fonctions du microbiote cæcal ont néanmoins été détectées. La production de SCFA par les bactéries du microbiote cæcal était ainsi réduite, sans effet mesurable sur la physiologie des poules adultes. Cependant, une accumulation réversible du glyphosate a été mesurée dans le vitellus des œufs pondus par les animaux exposés, liée à des retards de développement et à une impressionnante augmentation de la mortalité embryonnaire. Le retrait du GBH de l'alimentation des mères a permis de réduire les concentrations de glyphosate dans le vitellus et de restaurer un développement embryonnaire normal. Pour autant, la descendance issue des œufs pondus après le retrait du produit n'était pas totalement inaffectée, puisqu'elle présentait un engraissement augmenté et un comportement modifié (activité locomotrice augmentée).

Chez les poules en croissance exposées à 13 et 34 mg gly eq/kg pc/jour, une réduction dose-dépendante de la prise alimentaire a été observée. Les niveaux de transcrits et de protéines de facteurs stéroïdogènes dans les ovaires des animaux étaient également réduits. Cette réduction de l'expression de facteurs stéroïdogènes a également été observée *in vitro* sur des cultures primaires de cellules de la granulosa et sur des explants ovariens, dont la production de progestérone était également réduite de manière dose-dépendante par l'apport de GBH à des doses comprises entre 0,036 et 360 mg gly eq/L.

Finalement, des injections *in ovo* ont permis de montrer une augmentation significative de la masse du cœur des embryons exposés à une dose de 0,03 ng gly eq/g d'œuf. L'utilisation de la technique du CAM assay a également permis de montrer une réduction de la néovascularisation de la membrane chorioallantoïque après une exposition à une dose de 1,8 mg gly eq/L de GBH.

Ces résultats semblent donc indiquer que même à faible dose, une exposition à un GBH peut entraîner des effets néfastes sur la santé aviaire. Il paraît donc important de discuter de l'interprétation de ces résultats afin d'en tirer des conclusions pertinentes et de les intégrer dans le contexte de diminution des effectifs d'espèces d'oiseaux en milieu agricole.

Discussion générale

L'impact des GBH sur les oiseaux demeure largement méconnu, mais ce travail représente une réelle avancée dans ce domaine de recherche

L'impact des herbicides à base de glyphosate sur la santé des oiseaux n'a été que peu exploré par la communauté scientifique. Il existe un petit corpus d'études traitant le sujet, auquel s'ajoute la présente étude chez la poule. Nous avons pu montrer que le GBH entraine des effets différents selon la dose (13, 34, 40 et 47 mg gly eq/kg pc/jour), le mode d'administration (intraveineuse, voie orale, injection *in ovo* etc.) et le stade de développement de l'animal (adulte, en croissance, embryon). En outre, il ressort des résultats de cette étude que la compréhension de l'impact des GBH sur la santé aviaire (mais également sur la santé de tout animal) ne peut être atteinte que par la combinaison de différentes approches méthodologiques et de plusieurs spécialités scientifiques. L'exposition environnementale ne peut être comprise que par l'intégration de données géologiques, chimiques et météorologiques etc. De même, l'absorption de la substance, son comportement dans l'organisme et ses effets ne peuvent être compris qu'en combinant des données toxicocinétiques, physiologiques, comportementales etc. Pour aller plus loin, la compréhension des implications écosystémiques de ces effets requerrait un regard d'écologue. Il apparait également que de nouveaux effets toxiques potentiels sont identifiés à mesure que notre compréhension des systèmes biologiques évolue. J'en veux pour exemple les effets sur le microbiote pour lesquels il n'existe à ce jour aucun consensus international concernant les méthodologies à appliquer pour les évaluer (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023). Il semble donc fondamental de continuer des études similaires à la nôtre pour discuter de ces méthodologies. Il convient cependant d'admettre que notre travail n'échappe pas à une limite assez commune des études écotoxicologiques menées en laboratoire, à savoir que les variations interspécifiques n'y sont pas prises en compte, tout comme les conséquences des effets détectés à l'échelle des populations et des communautés. Nous avons tout de même cherché à décrire les effets différés sur la physiologie et le comportement des animaux, qui font également souvent défaut à ce type d'étude (Moreau et al., 2022).

Dans la partie qui suit, je tente de discuter des effets que nous avons identifiés ; de leur gravité ainsi que de la possibilité d'utiliser certains d'entre eux pour évaluer la gravité d'une

contamination environnementale. J'ai également souhaité discuter des possibles implications de nos résultats à des échelles écosystémiques. En effet, tous les effets décrits ici en laboratoire n'existent pas nécessairement *in situ* (et inversement). Il parait primordial de déterminer le réel impact écologique de ceux qui y sont conservés. De plus, les variations interspécifiques de sensibilité, les effets à long termes et les effets comportementaux sont difficilement détectables en laboratoire (Moreau et al., 2022). Bien sûr, nous avons, comme pour toute étude menée en laboratoire, dû faire des choix de doses d'exposition. Ces choix, bien que pouvant se justifier au regard des règlementations européennes, peuvent paraitre arbitraires. Aussi, les oiseaux sauvages ne sont pas exposés uniquement à des GBH, mais à tout un spectre de produits différents (Malalgoda and Simsek, 2021). Chacun d'eux a des propriétés physicochimiques, des cibles biologiques et des dynamiques environnementales différentes. Il semble donc fondamental de mener des études sur d'autres pesticides utilisés en agriculture, ainsi que sur leurs effets cocktails (c'est-à-dire sur leurs effets combinés, qui font également souvent défaut aux études écotoxicologiques). Les effets cocktails des pesticides apparaissent lorsqu'un organisme est exposé simultanément à plusieurs substances (ce qui est en réalité un cas de figures quasiment systématique). Les molécules peuvent alors se comporter de 3 manières différentes (Hernández et al., 2017) :

- Elles n'interagissent pas. Nous observons alors une simple additivité des effets toxiques.
- Les molécules interagissent de manière synergique. Les effets toxiques d'une molécule sont alors potentialisés par ceux des autres. La toxicité des molécules est alors supérieure à l'addition des toxicités des molécules seules.
- Les molécules interagissent de façon antagoniste. La toxicité des molécules sera alors inférieure à l'addition des toxicités des molécules seules.

De manière générale, une synergie entre deux molécules apparait lorsque la biodisponibilité, l'absorption, le transport interne, le métabolisme, la liaison au site actif ou l'excrétion sont affectés par la combinaison des molécules (Cedergreen, 2014). Il existe des études qui montrent des effets synergistes des GBH en association avec d'autres substances. Ces études sont néanmoins rares, notamment chez l'oiseau (Roustan et al., 2014). Ce constat peut s'expliquer par le fait que 95% des cas identifiés concernent des inhibiteurs de la

cholinestérase et des fongicides azolés (Cedergreen, 2014). Des effets cocktails liés aux GBH sont donc moins fréquemment détectés.

Le choix du mode d'administration

La plupart des travaux consacrés à l'étude de la toxicité des GBH ont choisi d'étudier la toxicité orale/alimentaire du produit. Les autres voies de contaminations environnementales sont le plus souvent non prises en compte. La toxicité du produit est alors mesurée grâce à des grandeurs telles que la LD50 (dose léthale 50, c'est-à-dire dose qui provoque la mort de 50% des individus dans une population exposée), la NOAEL (dose sans effet nocif observable, de l'anglais No Observed Adverse Effect Level) etc. Il existe des grandeurs permettant d'estimer la toxicité d'un produit administré via d'autres modes d'administration. La toxicité par voie cutanée peut être mesurée par le DTI (pour Dermal Toxicity Index), calculable par la relation DTI = log(LD50 orale /LD50 cutanée x 1000) (Mineau, 2002). Une toxicité cutanée élevée est donc associée à un DTI faible. La valeur du DTI est très variable selon la molécule active (Mineau, 2002). A ma connaissance, aucune DTI n'a été calculée pour le glyphosate chez les espèces aviaires. La contamination cutanée se fait vraisemblablement par les pattes de l'animal, étant donné que le reste du corps est protégé par les phanères. Une contamination par les voies respiratoires est également possible, bien qu'elle soit moins probable compte tenu de la faible volatilité de la molécule.

Nos travaux ont montré que la contamination parentale par voie alimentaire est une importante voie de contamination au GBH chez la poule. Ce phénomène est bien décrit chez les volailles du fait du risque de transfert aux populations humaines (Moreau et al., 2022). L'embryon peut également être contaminé par passage de la substance à travers la coquille de l'œuf et les membranes coquillières. Nous avons montré par nos expériences de CAM Assay qu'une telle contamination par la membrane chorioallantoïque est susceptible de provoquer une réduction du développement vasculaire de l'œuf.

Une toxicité relativement modérée, à l'exception des effets observés sur les œufs

La plupart des effets que nous avons détectés ne peuvent être qualifiés que de modérément toxiques. En effet, aucune surmortalité n'a été observée à la suite des expositions alimentaires chez l'adulte et chez les animaux en croissance. En revanche, les œufs produits par les adultes pendant l'exposition présentaient une spectaculaire surmortalité embryonnaire, liée à une rapide accumulation de glyphosate dans le vitellus. D'après notre étude, c'est là que serait la principale menace pour les oiseaux. Cependant, la dose parentale étant très élevée, il est fort probable que cette surmortalité soit largement exagérée par rapport à celle qui serait observée à la suite d'une exposition à des doses plus réalistes. Nous avons utilisé une dose alimentaire de 1250 mg/kg de nourriture, alors que la dose maximale effectivement mesurée dans des céréales est de 11 mg/kg (Xu et al., 2019). Cependant, la rapide accumulation du glyphosate dans le vitellus, et ce, dès les premiers jours du protocole indique que le dosage du glyphosate dans les œufs constitue un excellent test pour évaluer une contamination au sein d'une population. Les données récoltées lors de l'expérience permettent d'ores et déjà de réaliser des prédictions de l'évolution des concentrations en glyphosate dans des œufs au cours du temps.

> 💬 Cet outil pourrait se révéler particulièrement utile, par exemple pour un industriel commercialisant des œufs et qui souhaiterait savoir combien de temps après une contamination accidentelle les œufs restent contaminés/non commercialisables.

Il serait très intéressant de reproduire l'expérience d'exposition alimentaire chronique sur une plage de doses plus grande, avec une grande résolution pour les doses faibles. Par exemple, 0,01 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10, ; 50 ; 100 ; 500 ; 1000 et 1250 mg gly eq/kg de nourriture. L'objectif serait d'établir un modèle prédictif de la dose à laquelle une population a été exposée et de l'ancienneté de la contamination grâce à un simple dosage de glyphosate dans quelques œufs. Dans le cas d'une étude de terrain, cette évaluation impliquerait de prélever des œufs dans l'environnement. La mise en place d'une telle mesure reste donc à arbitrer compte tenu de la grande valeur que peut avoir l'œuf d'oiseau sauvage, notamment si celui-ci appartient à une espèce menacée.

Des effets sur le microbiote du tractus gastro intestinal comme potentiels indicateurs de contamination

L'observation la plus excitante de ce travail est certainement la réponse des bactéries du tractus gastro intestinal à l'alimentation contenant l'herbicide. Cette observation est d'autant plus intéressante que la perturbation de certaines des bactéries sensibles à l'apport de GBH est reversée par le retrait du produit. Ces résultats ouvrent donc la porte à l'utilisation du microbiote comme indicateur de contamination aux herbicides à base de glyphosate, voir à la gravité de cette contamination. Il existe plusieurs outils et techniques permettant d'étudier le microbiote, chacune ayant des avantages et inconvénients spécifiques. La méthode d'analyse que nous avons choisie pour étudier le microbiote des animaux est la méthode du séquençage des ARNr 16S. Cette méthode présente plusieurs avantages. Le séquençage ne requiert qu'une faible quantité de biomasse pour être efficace et les données produites sont relativement faciles à traiter, le tout pour un coût réduit (Morgan et al., 2022). La principale limite de cette méthode est inerrante au concept de classification appliqué aux microorganismes. La classification selon des critères pouvant être perçus comme arbitraires provoque des imprécisions voire des erreurs d'interprétations qui peuvent fausser les conclusions (Morgan et al., 2022). Aussi, les résultats obtenus, c'est-à-dire des niveaux relatifs de bactéries dans chaque groupe, ne peuvent être interprétés que par confrontation avec les fonctions connues de chaque bactérie. Cette étape implique donc, soit de réaliser une étude bibliographique fournie pour chaque taxon identifié, soit d'utiliser des outils bio-informatiques pour prédire quelles fonctions assurées par le microbiote sont susceptibles d'être perturbées. C'est à cette fin qu'ont été développés des logiciels comme PICRUSt2 et Tax4Fun2 (Morgan et al., 2022). Cependant, il est important de noter que les fonctions de certaines bactéries peuvent varier en fonction du profil génétique et de l'environnement de l'hôte. De plus, le transfert horizontal de gènes, qui ne peut être intégré dans ce type d'analyse, représente également une source potentielle d'erreurs d'interprétation.

Il existe donc d'autres types d'analyse permettant d'étudier le microbiote comme le Shotgun Whole Genome Sequencing, qui repose sur le séquençage de tous les ADN présents dans un échantillon. En plus de permettre l'identification des taxons, cette technique permet d'identifier les voies métaboliques achevées dans un échantillon, et de les relier aux taxons présents (Morgan et al., 2022). Le couplage de ces analyses avec des analyses métabolomiques

et protéomiques permet alors d'obtenir un profile fonctionnel plus exhaustif qu'avec le seul séquençage des ARNr 16S. Ce type d'analyse multi-omique a d'ailleurs permis de confirmer que les herbicides à base de glyphosate inhibent bien la voie shikimate dans le microbiome du rat (Mesnage et al., 2021b). La présence de métabolites intermédiaires de la voie shikimate tels que l'acide shikimique (c'est-à-dire la forme acide du shikimate) serait donc une bonne stratégie pour la recherche d'indicateurs de contamination. Elle pourrait être couplée avec la recherche de bactéries exprimant des enzymes de la voie shikimate, comme *Akkermansia* dont on attend que l'abondance soit réduite en cas de contamination. Mesnage et al., 2021b prévoient également qu'*Acinetobacter johnsonii* pourrait avoir une abondance augmentée en cas de contamination, car elle est capable d'utiliser le glyphosate comme source de phosphate pour sa propre croissance. Nous n'avons pas identifié cette bactérie dans notre étude chez la poule, mais nous pouvons formuler l'hypothèse qu'une ou plusieurs autres bactéries du microbiote aviaire que nous avons identifiées présentent des caractéristiques similaires.

La suite directe de notre travail pourrait donc consister en une analyse bio-informatique reposant sur les outils cités précédemment, couplée à une analyse métabolomique de nos échantillons afin d'en dresser le profile taxonomique et métabolomique complet. Il sera alors possible de désigner la perturbation de certains taxons et certaines voies métaboliques comme spécifiquement corrélées à la contamination à l'herbicide, avec un degré de confiance plus élevé. Si les résultats obtenus se révélaient répétables, nous serions donc en possession d'un nouvel outil pour la détection d'une contamination aux GBH au sein d'une population d'oiseaux. Il serait également intéressant de tester cet outil sur des excréments plutôt que sur des contenus caecaux ou intestinaux, afin de le rendre non invasif. Nous avons déjà désigné certaines bactéries comme potentielles candidates, et il est attendu que la voie shikimate puisse servir d'indicateur de contamination. Ces analyses futures pourraient en révéler d'autres.

Nous avons jusqu'ici choisi de discuter du lien entre le microbiote intestinal et le métabolisme des oiseaux. À première vue, un lien entre dysbiose intestinale et reproduction peut sembler moins évident. Des liens entre reproduction et microbiote du tractus reproducteur sont plus classiquement étudiés. Les travaux de Liu et al., 2022 montrent pourtant qu'il existe une corrélation entre les abondances de *Prevotella* et *Bacteroides* et la qualité spermatique chez

le rat, en lien avec une augmentation de la production d'IL-17. Cette augmentation est également responsable de dommages oxydatifs dans les testicules des animaux (Liu et al., 2022). Les auteurs rapportent une architecture testiculaire anormale, une diminution de la motilité et une augmentation du nombre de malformations des spermatozoïdes. Il est alors intéressant de remarquer que dans notre étude les niveaux de *Alloprevotella* et *Paraprevotella*, deux genres appartement à la même famille que *Prevotella* (Prevotellaceae) sont augmentés en présence de GBH ou après le retrait du produit. Dans l'étude de Serra et al., 2021a publiée par notre équipe, des coqs ayant subi un protocole similaire au **Protocole Adulte** présentaient une qualité spermatique altérée, en lien avec une considérable augmentation du stress oxydatif dans les spermatozoïdes (Serra et al., 2021a). La composition du microbiote caecal chez ces animaux n'avait pas été étudiée. Nous pouvons néanmoins envisager que ces animaux présentent une dysbiose similaire à ceux de la présente étude, étant donné la proximité des protocoles appliqués (seul le sexe des animaux est différent). Un lien entre le microbiote caecal et la baisse de qualité spermatique similaire à celui observé par Liu et al., 2022 pourrait alors être conjecturé.

Des effets endocriniens à approfondir

L'un des effets des herbicides à base de glyphosate les plus débattus est la perturbation endocrinienne. Les perturbateurs endocriniens sont un enjeu écologique et de santé publique majeur car ils sont distribués dans une grande variété de produits consommables et dispersés dans l'environnement. C'est notamment le cas pour de nombreux produits biocides. Certains perturbateurs endocriniens comme des phytohormones sont naturellement présents dans l'environnement. Considérant le risque posé par ces produits, l'Union Européenne a établi un certain nombre de règlements pour encadrer leur utilisation et pour contrôler leur transfert vers des populations sensibles (Kalofiri et al., 2021). L'enjeu est de trouver un consensus sur les critères permettant de conclure sur la classification d'un produit en tant que perturbateur endocrinien, ce qui s'avère plus compliqué que pour d'autres types de xénobiotiques, étant donné la singularité de leur toxicité. C'est pour cette raison que la communauté scientifique a établi un certain nombre de critères permettant de discuter de la perturbation endocrinienne causée par un produit (La Merrill et al., 2020). Nous avons montré qu'au moins deux de ces critères sont satisfaits chez la poule par le GBH, à savoir l'altération de la synthèse d'hormones et la modification du destin des cellules sécrétrices. Il existe d'autres caractéristiques propres à certains perturbateurs endocriniens qui semblent être possédées par le GBH. Par exemple, nous avons montré des effets transgénérationnels, des courbes dose-réponse non conventionnelles et des effets propres à certains stades de développement. Nos travaux viennent apporter des éléments supplémentaires en faveur de l'existence d'une perturbation endocrinienne causée par les GBH. D'autres études avaient en effet montré que les GBH satisfont plusieurs des caractéristiques clés des perturbateurs endocriniens (Muñoz et al., 2021). Pourtant, l'EFSA ne classe pas les GBH comme perturbateurs endocriniens. Pour arriver à cette conclusion, l'EFSA a réalisé une revue de littérature pour déterminer si le glyphosate interagit avec les voies de synthèse et de signalisation des œstrogènes, des androgènes, de la stéroïdogénèse et de la thyroïde (European Food Safety Authority (EFSA) et al., 2023). La conclusion de l'EFSA est donc assez surprenante considérant les résultats obtenus dans notre étude chez l'oiseaux et dans d'autres études réalisées sur d'autres modèles. En l'état, il est donc difficile de conclure définitivement sur l'existence ou non d'une perturbation endocrinienne par les herbicides à base de glyphosate chez la poule. Nous pourrions néanmoins approfondir nos travaux en recherchant les mécanismes moléculaires ayant mené

aux effets observés. Les travaux de Mesnage et al., 2017 ont déjà montré que le glyphosate contenu dans les GBH peut activer les ERα *in vitro*. Nous pourrions utiliser les techniques décrites dans leur article (E-screen assay, ERE-luciferase reporter gene assay) afin de tester l'activation des ERα dans les cellules de la granulosa de poule.

En outre, les effets que nous avons recherchés étaient focalisés sur l'ovaire. Il serait intéressant de remonter l'axe HPG pour évaluer l'impact de l'exposition alimentaire au GBH sur les dynamiques de la GnRH, la LH et la FSH, ainsi que de leurs récepteurs. Les études recherchant l'effet des GBH sur la secrétions de GnRH sont rares (Serra et al., 2021b). Les travaux de Ren et al., 2018 ont mis en évidence une modulation de la transcription de ces hormones après administration orale de GBH chez des souris gestantes. Ce type de recherche n'a à ma connaissance jamais été conduit chez l'oiseau.

Les animaux en croissance ont rejeté l'alimentation enrichie en GBH pour une raison encore non élucidée

L'une des grandes questions qui reste en suspens est la raison pour laquelle les animaux en croissance ont rejeté l'aliment contenant le GBH dans notre étude. Ce n'est pourtant pas la première fois qu'une telle observation est faite. Grue, 1982 avait déjà observé une réduction de la prise alimentaire chez des Quiscale bronzés exposés à différents pesticides organophosphorés, pouvant mener à la mort de l'animal. De même, MKay et al., 1999 ont montré que des pigeons évitent évite la consommation de graines contaminées au fonofos (un insecticide organothiophosphate) en situation *in situ*.

Nous avons recherché une explication à ce phénomène au niveau central, en quantifiant l'expression de la chémérine et de son récepteur dans l'hypothalamus des animaux. La chémérine et ses récepteurs sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Estienne et al., 2021). Cependant, aucune différence significative d'expression de l'hormone et de son récepteur n'a été observée entre les animaux des groupes CT, GBH- et GBH+. Il serait pertinent de reproduire ces mesures en augmentant les effectifs de chaque groupe pour obtenir davantage de robustesse statistique. De plus, nous pourrions envisager de mesurer l'expression d'un certain nombre d'autres marqueurs moléculaires impliqués dans la régulation centrale de l'appétit. L'expression du transcrit et de la protéine du neuropeptide Y et de l'Agouti-related peptide pourrait être mesurée par qPCR et Western Blot. La compréhension des mécanismes impliqués dans la réduction de la prise alimentaire semble essentielle, tant sur le plan écologique (pour la « fitness » des animaux) qu'agronomique (pour la production d'œufs et de viande).

Il serait également intéressant de savoir si les animaux, en plus de rejeter un aliment contaminé, rejettent également un environnement contaminé. Il existe un test fréquemment réalisé dans les études d'écotoxicologie permettant d'évaluer le comportement d'évitement des vers de terre exposés à des échantillons de sol sur 48h (ISO 17512-1 (2009)). Nous pourrions adapter ce test pour les animaux en croissance. Nous pourrions imager de diviser une parcelle circulaire fermée en 3 compartiments de surfaces identiques, traitées ou non avec deux doses différentes de GBH (par exemple une dose réelle de traitement et une dose deux fois inférieur). Nous replanterions un couvert végétal (à définir) et libérerions des animaux en croissance au centre de la parcelle. Nous pourrions ensuite suivre le déplacement des animaux

sur plusieurs semaines, par exemple grâce à des balises GPS. Nous pourrions ainsi déterminer en temps réel l'évitement ou non des zones contaminées par les animaux. Cette information me semble particulièrement importante sur le plan écologique. La disparition d'une espèce dans une communauté n'étant pas sans conséquence pour l'écosystème.

Des effets sur les interactions écologiques ?

Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur les effets directs que peuvent avoir les GBH sur la santé des poules. Nous avons montré une association du GBH avec des effets sur la physiologie, le métabolisme, la reproduction et le comportement des poules. Ces paramètres font partie des principales composantes liées aux dynamiques populationnelles (Moreau et al., 2022). Ces effets doivent donc être replacés dans le réseau d'interactions écologiques que les oiseaux ont entre eux et avec leur environnement. Des altérations dans la distribution d'une espèce peuvent avoir des effets indirects en cascades à tous les niveaux trophiques dans une communauté (Saaristo et al., 2018). Il est par exemple pertinent de s'intéresser à la réponse d'un prédateur à une disponibilité réduite de proies. Saaristo et al., 2018 présentent l'exemple d'un contaminant chimique qui serait introduit dans un écosystème. Ce produit ne changerait pas le comportement d'une espèce B, mais rendrait une espèce A moins craintive, avec pour conséquence une augmentation de sa tendance à prendre des risques. L'espèce A passerait donc plus de temps à chercher de la nourriture et moins de temps à éviter les prédateurs. Une espèce C, proie de l'espèce A serait donc indirectement affectée par le contaminant, même si elle y était résistante, car elle devrait allouer plus de temps et d'énergie aux comportements anti-prédateurs pour faire face à la prédation accrue par l'espèce A. La diminution des effectifs de l'espèce C entrainerait alors à son tour une augmentation des effectifs de sa proie végétale D etc. L'espèce B pourrait alors modifier ses préférences alimentaires et entrer en concurrence avec l'espèce A, dont la prise de risque accrue pourrait la rendre elle-même plus vulnérable à la prédation. Au bilan, c'est tout l'écosystème qui se retrouverait perturbé par l'introduction du contaminant.

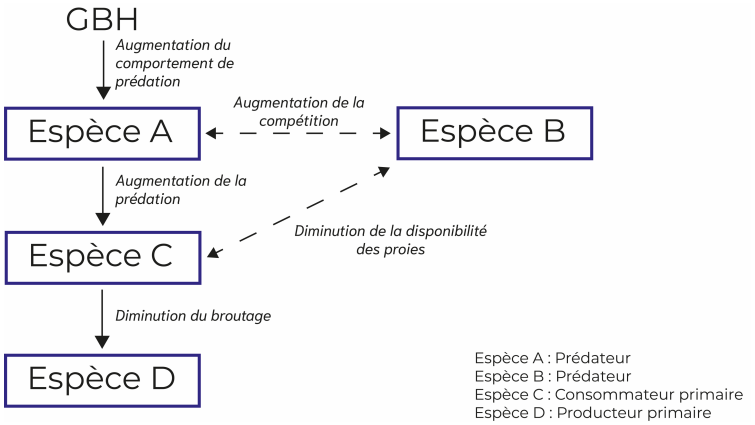


Figure 70. Impact (simplifié) de l'introduction environnementale d'un GBH sur un réseau trophique (adapté de Saaristo et al., 2018)

L'impact de substances sur l'activité motrice est donc un paramètre régulièrement évalué dans les études écotoxicologiques (Saaristo et al., 2018). Nous avons montré que les poussins issus des poules exposées au GBH n'ont pas un comportement de peur approprié dans un nouvel environnement. Cette observation laisse penser que l'exposition au GBH pourrait entrainer un scénario similaire à celui décrit par Saaristo et al., 2018. Les proies invetebrées des oiseaux pourraient donc être indirectement impactées par le GBH. Elles pourraient également être directement affectées par la toxicité du produit, ce qui aurait donc un effet direct sur la population d'oiseaux.

Comme on pouvait s'y attendre par suite des travaux de Gill et al., 2018, les oiseaux dont le régime alimentaire est au moins partiellement composé d'invertébrés sont très négativement impactés par les couvertures agricoles à forte intensité d'intrants. La réduction de la disponibilité d'invertébrés dont se nourrissent les oiseaux est en effet un facteur majeur de déclin (Stanton et al., 2018; Rigal et al., 2023). Les récents travaux de Hallmann et al., 2017 ont suscité de vives réactions dans la communauté scientifique. Ils montrent qu'en 30 ans, les zones protégées ont enregistré une chute de 75% de la biomasse totale d'insectes volants. Cette impressionnante réduction de biomasse est attribuée à de nombreux facteurs dont l'intensification des pratiques agricoles et l'usage de pesticides. En outre, il a été montré que l'abondance de plusieurs oiseaux insectivores est assez logiquement corrélée à la biomasse d'insectes dans l'environnement (Møller, 2019). Des études récentes rapportent des effets des GBH sur plusieurs espèces d'insectes. Par exemple, il a été montré qu'une exposition orale au glyphosate réduit l'activité des antennes et augmente la profondeur du sommeil chez l'abeille (Vázquez et al., 2020). En plus d'un impact indirect sur les oiseaux prédateurs, l'utilisation de GBH (et autres pesticides) pourrait donc avoir un impact plus systémique, en menaçant les

processus de pollinisation des plantes à fleurs (Moreau et al., 2022). De plus, l'interaction de l'herbicide avec d'autres facteurs comme l'augmentation des températures peut en moduler les effets, comme démontré dans l'étude de Stahlschmidt et al., 2022. Ces travaux montrent qu'une exposition orale à un GBH peut ne déclencher des effets qu'à certains stades de développement ou dans certaines conditions de température. Il a été observé que les effets de l'augmentation de la température et du GBH sur la prise alimentaire et la croissance de l'animal se cumulent (Stahlschmidt et al., 2022).

Il faut également inclure dans ces processus la possibilité d'un transfert trophique de GBH depuis l'invertébré ou la graine proie vers l'oiseau, puis de l'oiseau vers son prédateur. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que nous avons montré que le glyphosate et l'AMPA s'accumulent dans différents tissus des animaux par suite d'une exposition alimentaire chronique. Ils sont donc très susceptibles d'être transférés à un éventuel prédateur qui s'en nourrirait. L'impact sur les populations serait donc fonction non seulement de la toxicité du GBH sur l'oiseau, mais également de sa toxicité sur son prédateur (Baudrot et al., 2020).

Nous aurions également pu mesurer l'effet de l'exposition au GBH sur le comportement reproducteur et parental des poules. Il a été montré que l'exposition au parathion (un insecticide organophosphoré inhibiteur des cholinestérases) provoque une réduction réversible du temps passé dans le nid chez la mouette atricille (White et al., 1983). Une étude similaire a été menée chez des étourneaux sansonnets femelles, exposé au dicrotophos (insecticide organophosphoré inhibiteur de l'acétylcholinestérase) durant leur 6ème jour de gestation. Les femelles exposées ont passé moins de temps sur leurs œufs que les témoins au cours des 6 jours suivants, tandis que les mâles y ont passé plus de temps, sans que cela n'ait d'impact sur le taux d'éclosion (Grue et al., 1997). Il serait alors pertinent de mesurer le temps passer par les poules à couver pendant une exposition alimentaire au GBH similaire à celle que nous avons réalisé dans le **Protocole Adultes**.

En plus des interactions écologiques mentionnées précédemment, il existe d'autres types d'interactions susceptibles d'être affectées par une exposition à un GBH. Nous avons montré des modulations immunitaires chez les poules exposées, notamment dans leur tractus digestif. Il était alors pertinent de s'interroger sur une possible susceptibilité accrue au parasitisme et aux infections. L'existence d'un tel effet aurait également des conséquences écosystémiques.

Shehata et al., 2013 ont montré que des bactéries pathogènes pourraient être avantagées dans le microbiote de poules exposées à un GBH par leur alimentation. Nous n'avons détecté que de légers effets sur la capacité de la Salmonelle à infecter des lignées cellulaires de foie et de macrophage. Seule une petite augmentation de l'adhésion de la bactérie aux cellules de la lignée hépatique, ainsi qu'une augmentation de sa multiplication dans les cellules macrophages ont été observées à très forte dose (non pertinente d'un point de vue environnemental). Il convient donc de poursuivre des recherches dans cette direction (par exemple en réalisant un test d'infection *in vivo* sur des animaux exposés au GBH).

Les pesticides exercent-ils une pression évolutive sur les oiseaux ? Cette pression est-elle mesurable ?

Étonnamment, peu d'études se sont penchées sur les conséquences d'une exposition aux GBH (et par extension aux pesticides) sur les trajectoires évolutives des oiseaux. L'évolution est un processus long, apparaissant sur plusieurs générations. L'utilisation intensive de pesticides et la prise de conscience de leurs effets néfastes étant relativement récente, la question de savoir si elle induit ou non des adaptations évolutives ne s'est pas immédiatement posée chez les oiseaux. La plupart des études se sont concentrées sur l'apparition de résistance chez le moustique et dans les plantes cultivables, car la compréhension de ces mécanismes de résistance a un intérêt agronomique et de santé publique immédiat (Cothran et al., 2013). Des études existent néanmoins quant à l'apparition de résistances aux pesticides chez les amphibiens. Une étude datant de 2013 montre que les populations de grenouilles évoluant à proximité de terres agricoles sont plus résistantes (résistance évaluée par un test de mortalité des embryons en solution contenant des concentrations croissantes de pesticides) au chlorpyrifos, mais pas au GBH (Cothran et al., 2013). De même, Hua et al., 2015 ont montré une augmentation de la tolérance au malathion et au carbaryl chez des populations de grenouilles proches de zones agricoles. Ces études montrent donc que l'utilisation de pesticides est très susceptible de provoquer des adaptations évolutives chez les populations exposées, permettant d'augmenter leur tolérance aux produits. Étant donné les effets que nous avons détectés, il est très probable que des adaptations aux pesticides émergent à long terme ou aient déjà émergée chez les oiseaux des milieux agricoles. Nous avons observé un fort impact de l'exposition au GBH sur la mortalité embryonnaire, liée à une forte concentration de glyphosate dans le vitellus, ce qui en situation réelle représenterait à coup sûr une immense pression de sélection. Aussi, l'analyse RNAseq réalisée sur les animaux en croissance a révélé une augmentation de l'expression de transcrits liés à la biotransformation des xénobiotiques dans les ovaires des animaux. Une étude de long terme pourrait être initiée pour déterminer si de telles pressions pourraient se traduire par des modifications génétiques chez les oiseaux. Nous pourrions par exemple rechercher l'apparition de duplications de séquences génétiques codant pour des enzymes du métabolisme des xénobiotiques dans le génome d'oiseaux capturés en zones agricoles sur plusieurs dizaines d'années, notamment dans les ovaires et dans le foie des animaux, puisque ces deux organes jouent un rôle

important dans la formation du vitellus. Ces adaptations évolutives pourraient par exemple prévenir le transfert de glyphosate vers le vitellus. Il est également fort probable, étant donné l'importante chute des effectifs d'insectes que les oiseaux insectivores tendent à changer de régimes alimentaires avec le temps.

Il est important de noter que l'apparition d'une résistance à un stress quel qu'il soit se fait au prix d'une réduction de la fitness (c'est-à-dire des performances reproductrices, métaboliques etc.) dans un milieu qui serait dépourvu de ce stress. Dans le cas présent, une augmentation de l'énergie allouée à la détoxication pourrait se faire au prix d'une diminution de l'énergie allouée à d'autres processus, comme la croissance et la reproduction (Saaristo et al., 2018). Aussi, la réduction de la variabilité génétique au sein de la population exposée pourrait la rendre plus sensible à l'apparition d'autres stress (Jansen et al., 2011). Cependant, cette perte de fitness n'est pas obligatoire, et dépend en réalité du ou des pesticides auxquels la population est exposée. Aussi arrive-t-il que la population sectionnée soit avantagée par les caractères acquis, même en absence des pesticides (Jansen et al., 2011).

Des effets réels, mais à mettre en perspective avec les autres facteurs de déclins de la biodiversité

Les expériences menées lors de ce travail nous ont permis d'identifier plusieurs effets néfastes des GBH sur le métabolisme et la fertilité des poules. Pour autant, la toxicité directe des herbicides à base de glyphosate (ou même plus généralement des pesticides) ne saurait être considérée comme seul facteur de déclin des populations d'oiseaux. Par exemple, l'étude de Linz et al., 1996 rapporte des chutes d'effectif de trois oiseaux du Dakota, l'Agelaius, la Carouges à tête jaune et le Cistothorus. D'après cette étude, ces chutes d'effectif seraient dues à la destruction des végétaux en raison de l'application d'un GBH. La fragmentation/destruction des habitats serait donc ici une plus grande menace que la toxicité directe du produit. Bien sûr, les effets que nous avons mis en évidence dans la présente étude ont très certainement un impact réel sur les populations d'oiseaux, mais les données produites dans les études telles que celle de Linz et al., 1996 nous rappellent que cet impact existe conjointement avec celui d'autres types de pression qui interagissent entre elles et avec les oiseaux. Toutefois, les travaux menés jusqu'à présent ne permettaient pas de comprendre la complexité de ces interactions et leurs implications à grande échelle.

Les récents travaux de Rigal et al., 2023 ont alors considérablement amélioré la compréhension de la manière dont les pressions anthropiques affectent l'avifaune. Ils viennent confirmer le postulat initial de la présente étude, à savoir que les espèces aviaires évoluant dans les zones agricoles sont les premières concernées par la diminution des abondances des populations, et que l'utilisation de pesticides est l'un des principaux facteurs du déclin des populations d'oiseaux. Les effectifs de l'avifaune dans les zones agricoles ont chuté de 57% depuis 1980, alors que ceux des oiseaux évoluant en milieu urbain ont chuté de 28%, et ceux des oiseaux évoluant en milieu forestier ont chuté de 18% (Rigal et al., 2023). Les pratiques agricoles, l'urbanisation et le couvert forestier ont suivi des dynamiques différentes dans chaque pays d'Europe depuis 1980, l'impact que ces pressions ont eu sur les espèces aviaires est donc largement hétérogène entre les pays. Les variations de températures dues au dérèglement climatique, elles aussi largement hétérogènes, doivent également être intégrées dans le réseau des facteurs interagissant avec l'avifaune européenne.

De plus, il est important de noter que la progression de chaque facteur peut n'être que partiellement corrélée avec les changements au niveau de la population. Cela est dû au fait

que certains facteurs peuvent se subdiviser en plusieurs sous-facteurs, et la direction de variation de ces sous-facteurs n'est pas nécessairement la même que celle du facteur global. Par exemple, l'urbanisation a globalement progressé dans tous les pays d'Europe. Elle a donc un impact global négatif sur l'avifaune européenne. En revanche, l'augmentation du couvert forestier global en Europe n'est pas liée à une amélioration des dynamiques populationnelles. En réalité, bien que le couvert forestier ait globalement augmenté, la qualité de ces forêts n'est pas pour autant nécessairement améliorée, car les forêts anciennes, essentielles pour de nombreuses espèces d'oiseaux ont décliné au profit de forêts nouvelles moins favorables (Rigal et al., 2023).

Ainsi, la compréhension globale des mécanismes menants à la diminution globale de l'avifaune européenne ne pourra être achevée que par l'association d'études comme la nôtre, recherchant les effets néfastes à l'échelle de l'individu, d'études de terrain évaluant par exemple la contamination environnementale, le transfert aux populations, et les conséquences écologiques, et d'études corrélatives de grande échelle telles que celle de Rigal et al., 2023.

Conclusion

Les travaux réalisés durant cette thèse ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs effets néfastes à la suite d'expositions à un herbicide à base de glyphosate par différentes voies chez la poule. Les effets détectés affectent le métabolisme et la reproduction des animaux. Des effets endocriniens et sur le microbiote caecal ont également été constatés. La plupart des effets identifiés étaient quantifiables, et évoluaient avec la dose d'exposition. Ce travail apporte donc des éléments de compréhension de l'impact de herbicides à base de glyphosate chez la poule. Ils peuvent être utilisés afin de déterminer la part de responsabilité des herbicides à base de glyphosate sur le déclin des populations d'oiseaux observé depuis 30 ans, et de replacer cet impact dans un contexte écosystémique.

Bibliographie

Adam, A., Marzuki, A., Abdul Rahman, H., and Abdul Aziz, M. (1997). The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 39, 147–151.

Aitbali, Y., Ba-M'hamed, S., Elhidar, N., Nafis, A., Soraa, N., and Bennis, M. (2018). Glyphosate based- herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 67, 44–49. doi: 10.1016/j.ntt.2018.04.002

Alhabeeb, H., AlFaiz, A., Kutbi, E., AlShahrani, D., Alsuhail, A., AlRajhi, S., et al. (2021). Gut Hormones in Health and Obesity: The Upcoming Role of Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 13, 481. doi: 10.3390/nu13020481

Al-Rajab, A. J., and Schiavon, M. (2010). Degradation of 14C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. *J. Environ. Sci.* 22, 1374–1380. doi: 10.1016/S1001-0742(09)60264-3

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Martínez, M. A., Castellano, V. J., Martínez, M., Martin, M. T., et al. (2009). Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol. Lett.* 190, 91–95. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.008

ANSES (2017). One Health : une seule santé pour les êtres vivants et les écosystèmes. Available at: https://www.anses.fr/fr/content/one-health-une-seule-santé-pour-les-êtres-vivants-et-les-écosystèmes

Avigliano, L., Fassiano, A. V., Medesani, D. A., Ríos De Molina, M. C., and Rodríguez, E. M. (2014). Effects of Glyphosate on Growth Rate, Metabolic Rate and Energy Reserves of Early Juvenile Crayfish, Cherax quadricarinatus M. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 631–635. doi: 10.1007/s00128-014-1240-7

Bahr, J. (1991). The Chicken Ovary as a Model of Follicular Development. *Semin. Reprod. Med.* 9, 352–359. doi: 10.1055/s-2007-1019427

Barnett, J. A., Bandy, M. L., and Gibson, D. L. (2022). Is the Use of Glyphosate in Modern Agriculture Resulting in Increased Neuropsychiatric Conditions Through Modulation of the Gut-brain-microbiome Axis? *Front. Nutr.* 9, 827384. doi: 10.3389/fnut.2022.827384

Baudrot, V., Fernandez-de-Simon, J., Coeurdassier, M., Couval, G., Giraudoux, P., and Lambin, X. (2020). Trophic transfer of pesticides: The fine line between predator–prey regulation and pesticide–pest regulation. *J. Appl. Ecol.* 57, 806–818. doi: 10.1111/1365-2664.13578

BAYER (2024). Available at: https://www.bayer-agri.fr/produits/herbicides-sur-autres-grandes-cultures/

Beckmann, L., Simon, O., and Vahjen, W. (2006). Isolation and identification of mixed linked *β* -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial

characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities. *J. Basic Microbiol.* 46, 175–185. doi: 10.1002/jobm.200510107

Bellairs, R., and Osmond, M. (2005). *The atlas of chick development*., 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier.

Bello, A., Henri, J., Viel, A., Mochel, J. P., and Poźniak, B. (2023). Ionophore coccidiostats – disposition kinetics in laying hens and residues transfer to eggs. *Poult. Sci.* 102, 102280. doi: 10.1016/j.psj.2022.102280

Bento, C. P. M., Goossens, D., Rezaei, M., Riksen, M., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., et al. (2017). Glyphosate and AMPA distribution in wind-eroded sediment derived from loess soil. *Environ. Pollut.* 220, 1079–1089. doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.033

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* 8, 103. doi: 10.1186/s40168-020-00875-0

Bernardi, O. (2023). Etude de potentiels biomarqueurs du développement embryonnaire et de la stéatose hépatique pour la sélection génétique avicole. PhD, page 42, Université de Tours.

Bernardi, O., Estienne, A., Reverchon, M., Bigot, Y., Froment, P., and Dupont, J. (2021). Adipokines in metabolic and reproductive functions in birds: An overview of current knowns and unknowns. *Mol. Cell. Endocrinol.* 534, 111370. doi: 10.1016/j.mce.2021.111370

Blaak, E. E., Canfora, E. E., Theis, S., Frost, G., Groen, A. K., Mithieux, G., et al. (2020). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef. Microbes* 11, 411–455. doi: 10.3920/BM2020.0057

Boren, J., and Brindle, K. M. (2012). Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ.* 19, 1561–1570. doi: 10.1038/cdd.2012.34

Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., and Vale, J. A. (2004). Glyphosate Poisoning: *Toxicol. Rev.* 23, 159–167. doi: 10.2165/00139709-200423030-00003

Briere, S., Brillard, J. P., Panheleux, M., and Froment, P. (2011). Alimentation, fertilité et bien-être des oiseaux reproducteurs domestiques : des liens complexes. *INRAE Prod. Anim.* 24, 171–180. doi: 10.20870/productions-animales.2011.24.2.3251

Brown, E. M., Clardy, J., and Xavier, R. J. (2023). Gut microbiome lipid metabolism and its impact on host physiology. *Cell Host Microbe* 31, 173–186. doi: 10.1016/j.chom.2023.01.009

Brubaker, P. L. (2018). Linking the Gut Microbiome to Metabolism Through Endocrine Hormones. *Endocrinology* 159, 2978–2979. doi: 10.1210/en.2018-00577

Burns, F., Eaton, M. A., Burfield, I. J., Klvaňová, A., Šilarová, E., Staneva, A., et al. (2021). Abundance decline in the avifauna of the European Union reveals cross-continental similarities in biodiversity change. *Ecol. Evol.* 11, 16647–16660. doi: 10.1002/ece3.8282

Burt, D. W. (2007). Emergence of the Chicken as a Model Organism: Implications for Agriculture and Biology. *Poult. Sci.* 86, 1460–1471. doi: 10.1093/ps/86.7.1460

Sylvie Canepa, Anne-Lyse Lainé, Aurelie Bluteau, Claudette Fagu, Chantal Flon, et al.. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. Cahier des Techniques de l'INRA, 2008, 64, pp.19-30. ⟨hal-02667281⟩

Casarett, L. J., Doull, J., and Klaassen, C. D. eds. (2008). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*., 7th ed. New York: McGraw-Hill.

Casassus, B. (2023). EU allows use of controversial weedkiller glyphosate for 10 more years. *Nature*, d41586-023-03589-z. doi: 10.1038/d41586-023-03589-z

Cattani, D., Cesconetto, P. A., Tavares, M. K., Parisotto, E. B., De Oliveira, P. A., Rieg, C. E. H., et al. (2017). Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology* 387, 67–80. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.001

Ceballos, G., Ehrlich, P. R., and Dirzo, R. (2017). Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114. doi: 10.1073/pnas.1704949114

Cedergreen, N. (2014). Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS ONE* 9, e96580. doi: 10.1371/journal.pone.0096580

CERTARA (2014). Extrapolating AUC to Infinity. Available at: https://www.certara.com/knowledge-base/extrapolating-auc-to-infinity/

Chaussé, A.-M., Roche, S. M., Moroldo, M., Hennequet-Antier, C., Holbert, S., Kempf, F., et al. (2023). Epithelial cell invasion by *salmonella* typhimurium induces modulation of genes controlled by aryl hydrocarbon receptor signaling and involved in extracellular matrix biogenesis. *Virulence* 14, 2158663. doi: 10.1080/21505594.2022.2158663

Chevillard, P.-M. (2022). Régulation saisonnière de la plasticité cellulaire de l'hypothalamus mediobasal chez la brebis. Université de Tours.

Cline, M., Nandar, W., Prall, B., Bowden, C., and Denbow, D. (2008). Central visfatin causes orexigenic effects in chicks. *Behav. Brain Res.* 186, 293–297. doi: 10.1016/j.bbr.2007.08.016

Comai, L., Sen, L. C., and Stalker, D. M. (1983). An Altered aroA Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate. *Science* 221, 370–371. doi: 10.1126/science.221.4608.370

Conway Morris, S. (2003). *Life's Solution: Inevitable Humans in a Lonely Universe*., 1st Edn. Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511535499

Cothran, R. D., Brown, J. M., and Relyea, R. A. (2013). Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evol. Appl.* 6, 832–841. doi: 10.1111/eva.12069

Crespo, N., and Esteve-Garcia, E. (2001). Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poult. Sci.* 80, 71–78. doi: 10.1093/ps/80.1.71

Davey, M. G., and Tickle, C. (2007). The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenet. Genome Res.* 117, 231–239. doi: 10.1159/000103184

Dechartres, J., Pawluski, J. L., Gueguen, M., Jablaoui, A., Maguin, E., Rhimi, M., et al. (2019). Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. *J. Neuroendocrinol.* 31. doi: 10.1111/jne.12731

Dunkley, K. D., Dunkley, C. S., Njongmeta, N. L., Callaway, T. R., Hume, M. E., Kubena, L. F., et al. (2007). Comparison of In Vitro Fermentation and Molecular Microbial Profiles of High-Fiber Feed Substrates Incubated with Chicken Cecal Inocula. *Poult. Sci.* 86, 801–810. doi: 10.1093/ps/86.5.801

EFSA (2023). L'EFSA explique l'évaluation scientifique du glyphosate.

Estienne, A., Brossaud, A., Reverchon, M., Ramé, C., Froment, P., and Dupont, J. (2020). Adipokines Expression and Effects in Oocyte Maturation, Fertilization and Early Embryo Development: Lessons from Mammals and Birds. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3581. doi: 10.3390/ijms21103581

Estienne, A., Fréville, M., Bernardi, O., Ramé, C., Calandreau, L., Cornilleau, F., et al. (2023). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide in broiler hens has long-term impacts on the progeny metabolism. *Poult. Sci.*, 102877. doi: 10.1016/j.psj.2023.102877

Estienne, A., Fréville, M., Bourdon, G., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., et al. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 241, 113741. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113741

Estienne, A., Ramé, C., Ganier, P., Chahnamian, M., Barbe, A., Grandhaye, J., et al. (2021). Chemerin impairs food intake and body weight in chicken: Focus on hypothalamic neuropeptides gene expression and AMPK signaling pathway. *Gen. Comp. Endocrinol.* 304, 113721. doi: 10.1016/j.ygcen.2021.113721

European Food Safety Authority (EFSA) (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 13. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4302

European Food Safety Authority (EFSA) (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine disrupting properties of glyphosate. *EFSA J.* 15. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4979

European Food Safety Authority (EFSA) (2018a). Evaluation of the impact of glyphosate and its residues in feed on animal health. *EFSA J.* 16. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5283

European Food Safety Authority (EFSA) (2018b). Review of the existing maximum residue levels for glyphosate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA J.* 16. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5263

European Food Safety Authority (EFSA), Álvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Binaglia, M., Castoldi, A. F., et al. (2023). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 21. doi: 10.2903/j.efsa.2023.8164

European red list of birds 2021 (2022). Brussels: European Commission.

Evans, D. D., and Batty, M. J. (1986). Effects of high dietary concentrations of glyphosate (roundup®) on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 399–401. doi: 10.1002/etc.5620050410

Fathi, M. A., Dan, S., Abdelsalam, A. M., and Chunmei, L. (2023). Involvement of glyphosate in disruption of biotransformation P450 enzymes and hepatic lipid metabolism in chicken. *Anim. Biotechnol.* 34, 4957–4967. doi: 10.1080/10495398.2023.2214601

Fathi, M. A., Han, G., Kang, R., Shen, D., Shen, J., and Li, C. (2020). Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 16865–16875. doi: 10.1007/s11356-020-08269-3

Foley, S. L., Johnson, T. J., Ricke, S. C., Nayak, R., and Danzeisen, J. (2013). Salmonella Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 582–607. doi: 10.1128/MMBR.00015-13

Fontaine, R. (2014). Etude du système dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre. PhD, page 14, Université Paris SUD

Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Chahnamian, M., Staub, C., et al. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. *Front. Physiol.* 13, 974688. doi: 10.3389/fphys.2022.974688

Fréville, M., Henri, J., Estienne, A., Serra, L., Ramé, C., Ganier, P., et al. (2023). Determination of the elimination half-life of Glyphosate and its main metabolite, AMPA, in chicken plasma. *Toxicol. Lett.* 389, 19–25. doi: 10.1016/j.toxlet.2023.10.009

Fréville, M., Bernardi, O., Ramé, C., Froment, P., and Dupont, J. (2024). Vitamin E alleviates Glyphosate-based herbicide-induced progesterone secretion inhibition and oxidative stress increase in chicken primary granulosa cells. *Poultry Science*, 104194. doi: 10.1016/j.psj.2024.104194

Fréville, M., Bernardi, O., Ramé, C., Froment, P., and Dupont, J. (2024). Vitamin E alleviates Glyphosate-based herbicide-induced progesterone secretion inhibition and oxidative stress increase in chicken primary granulosa cells. *Poultry Science*, 104194. doi: 10.1016/j.psj.2024.104194

Fu, H., Gao, F., Wang, X., Tan, P., Qiu, S., Shi, B., et al. (2021). Effects of glyphosate-based herbicide-contaminated diets on reproductive organ toxicity and hypothalamic-pituitary-ovarian axis hormones in weaned piglets. *Environ. Pollut.* 272, 115596. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115596

Gélinas, P., Gagnon, F., and McKinnon, C. (2018). Wheat preharvest herbicide application, whole-grain flour properties, yeast activity and the degradation of glyphosate in bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* 53, 1597–1602. doi: 10.1111/ijfs.13741

Geng, Y., Jiang, L., Zhang, D., Liu, B., Zhang, J., Cheng, H., et al. (2021). Glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium in agricultural groundwater and surface water in China from 2017 to 2018: Occurrence, main drivers, and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 769, 144396. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144396

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. doi: 10.1093/jn/125.6.1401

Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., and Girdhar, M. (2018a). Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–426. doi: 10.1007/s10311-017-0689-0

Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., and Girdhar, M. (2018b). Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–426. doi: 10.1007/s10311-017-0689-0

Givisiez, P. E. N., Moreira Filho, A. L. B., Santos, M. R. B., Oliveira, H. B., Ferket, P. R., Oliveira, C. J. B., et al. (2020). Chicken embryo development: metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. *Poult. Sci.* 99, 6774–6782. doi: 10.1016/j.psj.2020.09.074

Grotto, D., Santa Maria, L. D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M. F., Moro, A. M., et al. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 619–624. doi: 10.1016/j.jpba.2006.07.030

Grue, C. E. (1982). Response of common grackles to dietary concentrations of four organophosphate pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 617–626. doi: 10.1007/BF01056371

Grue, C. E., Gibert, P. L., and Seeley, M. E. (1997). Neurophysiological and Behavioral Changes in Non-Target Wildlife Exposed to Organophosphate and Carbamate Pesticides: Thermoregulation, Food Consumption, and Reproduction. *Am. Zool.* 37, 369–388. doi:

Catherine Guérin-Dubiard, M. Anton, Joël Gautron, Y. Nys, Francoise Nau. Composition de l'oeuf. Nau, Françoise. Science et technologie de l'oeuf Volume 2 De l'oeuf aux ovoproduits, Lavoisier Tec et Doc, pp.1-176, 2010, 978-2-7430-1224-3. ⟨hal-00729464⟩

Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., et al. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE* 12, e0185809. doi: 10.1371/journal.pone.0185809

Hamburger, V., and Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* 195, 231–272. doi: 10.1002/aja.1001950404

Hasković, E., Pekić, M., Fočak, M., Suljević, D., and Mešalić, L. (2016). Effects of Glyphosate on Enzyme Activity and Serum Glucose in Rats Rattus norvegicus. *Acta Vet. (Beogr.)* 66, 214–221. doi: 10.1515/acve-2016-0018

Helfer, G., Ross, A. W., Thomson, L. M., Mayer, C. D., Stoney, P. N., McCaffery, P. J., et al. (2016). A neuroendocrine role for chemerin in hypothalamic remodelling and photoperiodic control of energy balance. *Sci. Rep.* 6, 26830. doi: 10.1038/srep26830

Hernández, A. F., Gil, F., and Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Arch. Toxicol.* 91, 3211–3223. doi: 10.1007/s00204-017-2043-5

Hinderliter, P., and Saghir, S. A. (2014). "Pharmacokinetics," in Encyclopedia of Toxicology, (Elsevier), 849–855. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00419-X

Hua, J., Jones, D. K., Mattes, B. M., Cothran, R. D., Relyea, R. A., and Hoverman, J. T. (2015). Evolved pesticide tolerance in amphibians: Predicting mechanisms based on pesticide novelty and mode of action. *Environ. Pollut.* 206, 56–63. doi: 10.1016/j.envpol.2015.06.030

Hussain, R. (2019). Exposure to Sub-Acute Concentrations of Glyphosate Induce Clinico-Hematological, Serum Biochemical and Genotoxic Damage in Adult Cockerels. *Pak. Vet. J.* 39, 181–186. doi: 10.29261/pakvetj/2019.064

Inan, M. S., Rasoulpour, R. J., Yin, L., Hubbard, A. K., Rosenberg, D. W., and Giardina, C. (2000). The Luminal Short-Chain Fatty Acid Butyrate Modulates NF-□B Activity in a Human Colonic Epithelial Cell Line. 118.

Inger, R., Gregory, R., Duffy, J. P., Stott, I., Voříšek, P., and Gaston, K. J. (2015). Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. *Ecol. Lett.* 18, 28–36. doi: 10.1111/ele.12387

International Programme on Chemical Safety (2002). Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors. Available at: https://iris.who.int/handle/10665/67357

Jansen, M., Coors, A., Stoks, R., and De Meester, L. (2011). Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: a case study in Daphnia. *Ecotoxicology* 20, 543–551. doi: 10.1007/s10646-011-0627-z

Jarrell, Z. R., Ahammad, M. U., and Benson, A. P. (2020). Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. *Vet. Anim. Sci.* 10, 100126. doi: 10.1016/j.vas.2020.100126

Jasper, R., Locatelli, G. O., Pilati, C., and Locatelli, C. (2012). Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 133–140. doi: 10.2478/v10102-012-0022-5

JMPR (2004). *Pesticide residues in food. 2004: Report*.

Kalofiri, P., Balias, G., and Tekos, F. (2021). The EU endocrine disruptors' regulation and the glyphosate controversy. *Toxicol. Rep.* 8, 1193–1199. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.05.013

Kanda, S. (2019). Evolution of the regulatory mechanisms for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrates–hypothesis from a comparative view. *Gen. Comp. Endocrinol.*

Klasing, K. C. (1999). Avian gastrointestinal anatomy and physiology. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 8, 42–50. doi: 10.1016/S1055-937X(99)80036-X

Knights, A. J., Funnell, A. P., Pearson, R. C., Crossley, M., and Bell-Anderson, K. S. (2014). Adipokines and insulin action: A sensitive issue. *Adipocyte* 3, 88–96. doi: 10.4161/adip.27552

Kohsuwan, K., Intayoung, U., Khacha-ananda, S., Sapbamrer, R., Koonrungsesomboon, N., Techatoei, S., et al. (2022). Urinary glyphosate kinetics after occupational exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 245, 114021. doi: 10.1016/j.ijheh.2022.114021

Kuan, I. H. S., Wright, D. F. B., and Duffull, S. B. (2023). The influence of flip-flop in population pharmacokinetic analyses. *CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol.* 12, 285–287. doi: 10.1002/psp4.12909

Kubena, L. F., Smalley, H. E., and Farr, F. M. (1981). Influence of Glyphosate (N-(Phosphonomethyl)Glycine) on Performance and Selected Parameters in Broilers ,. *Poult. Sci.* 60, 132–136. doi: 10.3382/ps.0600132

Kudsk, P., and Mathiassen, S. K. (2020). Pesticide regulation in the European Union and the glyphosate controversy. *Weed Sci.* 68, 214–222. doi: 10.1017/wsc.2019.59

La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., et al. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57. doi: 10.1038/s41574-019-0273-8

Lakshmi Namratha, M., Lakshman, M., Jeeva, M., Tha, N., and Kumar, B. A. (2019). Effect of Glyphosate (GLP) Induced Toxicity on Body Weights and Gross Pathology: Ameliorative Effect of Ascorbic Acid (AA) in Wistar Rats. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 8, 1486–1493. doi: 10.20546/ijcmas.2019.810.174

Lautenschlager, R. A. (1993). Response of wildlife to forest herbicide applications in northern coniferous ecosystems. *Can. J. For. Res.* 23, 2286–2299. doi: 10.1139/x93-283

Leska, A., and Dusza, L. (n.d.). Seasonal changes in the hypothalamo-pituitary- gonadal axis in birds.

Limon, I., Pouzet, H., and Serradas, P. (2018). Physiologie des signalisations neuronales et hormonales.

Linz, G. M., Blixt, D. C., Bergman, D. L., and Bleier, W. J. (1996). Responses of Red-Winged Blackbirds, Yellow-Headed Blackbirds and Marsh Wrens to Glyphosate-Induced Alterations in Cattail Density (Respuesta de Agelaius phoeniceus, Xanthocephalus xanthocephalus y Cistothorus palustris a Alteración en la Densidad de Eneas Tratadas con Yerbicidas. *J. Field Ornithol.* 67, 167–176.

Liu, J.-B., Chen, K., Li, Z.-F., Wang, Z.-Y., and Wang, L. (2022). Glyphosate-induced gut microbiota dysbiosis facilitates male reproductive toxicity in rats. *Sci. Total Environ.* 805, 150368. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150368

Maïbèche, M. (2020). Biotransformation des Xénobiotiques Adaptation et Résistance.

Malalgoda, M., and Simsek, S. (2021). Pesticide residue in grain-based food: Effects on health, grain quality, and chemical properties of biomacromolecules. *Cereal Chem.* 98, 8–16. doi: 10.1002/cche.10355

Mamy, L., Barriuso, E., and Gabrielle, B. (2005). Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 61, 905–916. doi: 10.1002/ps.1108

Manikandan, P., and Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* 19. doi: 10.2174/1389450118666170125144557

Martins-Gomes, C., Silva, T. L., Andreani, T., and Silva, A. M. (2022). Glyphosate vs. Glyphosate-Based Herbicides Exposure: A Review on Their Toxicity. *J. Xenobiotics* 12, 21–40. doi: 10.3390/jox12010003

Maxwell, S. L., Fuller, R. A., Brooks, T. M., and Watson, J. E. M. (2016). Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature* 536, 143–145. doi: 10.1038/536143a

Mellouk, N., Ramé, C., Barbe, A., Grandhaye, J., Froment, P., and Dupont, J. (2018). Chicken Is a Useful Model to Investigate the Role of Adipokines in Metabolic and Reproductive Diseases. *Int. J. Endocrinol.* 2018, 1–19. doi: 10.1155/2018/4579734

Mesnage, R., and Antoniou, M. N. (2020). Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. *Curr. Res. Toxicol.* 1, 25–33. doi: 10.1016/j.crtox.2020.04.001

Mesnage, R., Panzacchi, S., Bourne, E., Mein, C. A., Perry, M. J., Hu, J., et al. (2021a). Glyphosate and its formulations Roundup Bioflow and RangerPro alter bacterial and fungal community composition in the rat caecum microbiome. Pharmacology and Toxicology. doi: 10.1101/2021.11.19.468976

Mesnage, R., Phedonos, A., Biserni, M., Arno, M., Balu, S., Corton, J. C., et al. (2017). Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem. Toxicol.* 108, 30–42. doi: 10.1016/j.fct.2017.07.025

Mesnage, R., Teixeira, M., Mandrioli, D., Falcioni, L., Ducarmon, Q. R., Zwittink, R. D., et al. (2021b). Use of Shotgun Metagenomics and Metabolomics to Evaluate the Impact of Glyphosate or Roundup MON 52276 on the Gut Microbiota and Serum Metabolome of Sprague-Dawley Rats. *Environ. Health Perspect.* 129, 017005. doi: 10.1289/EHP6990

Mineau, P. (2002). Estimating the probability of bird mortality from pesticide sprays on the basis of the field study record. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1497–1506. doi: 10.1002/etc.5620210723

MKay, H. V., Prosser, P. J., Hart, A. D. M., Langton, S. D., Jones, A., MCoy, C., et al. (1999). Do wood-pigeons avoid pesticide-treated cereal seed? *J. Appl. Ecol.* 36, 283–296. doi: 10.1046/j.1365-2664.1999.00398.x

Møller, A. P. (2019). Parallel declines in abundance of insects and insectivorous birds in Denmark over 22 years. *Ecol. Evol.* 9, 6581–6587. doi: 10.1002/ece3.5236

Moreau, J., Rabdeau, J., Badenhausser, I., Giraudeau, M., Sepp, T., Crépin, M., et al. (2022). Pesticide impacts on avian species with special reference to farmland birds: a review. *Environ. Monit. Assess.* 194, 790. doi: 10.1007/s10661-022-10394-0

Morgan, E. W., Perdew, G. H., and Patterson, A. D. (2022). Multi-Omics Strategies for Investigating the Microbiome in Toxicology Research. *Toxicol. Sci.* 187, 189–213. doi: 10.1093/toxsci/kfac029

Morrison, D. J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082

Muñoz, J. P., Araya-Osorio, R., Mera-Adasme, R., and Calaf, G. M. (2023). Glyphosate mimics 17β-estradiol effects promoting estrogen receptor alpha activity in breast cancer cells. *Chemosphere* 313, 137201. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.137201

Muñoz, J. P., Bleak, T. C., and Calaf, G. M. (2021). Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere* 270, 128619. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128619

Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., et al. (1987). The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA* 6, 1–11. doi: 10.1089/dna.1987.6.1

Nisbet, D. (n.d.). Defined competitive exclusion cultures in the prevention of enteropathogen colonisation in poultry and swine.

Nosanchuk, J. D., Ovalle, R., and Casadevall, A. (2001). Glyphosate Inhibits Melanization of *Cryptococcus neoformans* and Prolongs Survival of Mice after Systemic Infection. *J. Infect. Dis.* 183, 1093–1099. doi: 10.1086/319272

Nys, Y., and Guyot, N. (2011). "Egg formation and chemistry," in *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products*, (Elsevier), 83–132. doi: 10.1533/9780857093912.2.83

Oakley, B. B., Lillehoj, H. S., Kogut, M. H., Kim, W. K., Maurer, J. J., Pedroso, A., et al. (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 360, 100–112. doi: 10.1111/1574-6968.12608

Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., et al. (2003). Structure-Function Studies of the Adipocyte-secreted Hormone Acrp30/Adiponectin. *J. Biol. Chem.* 278, 9073–9085. doi: 10.1074/jbc.M207198200

Panzacchi, S., Mandrioli, D., Manservisi, F., Bua, L., Falcioni, L., Spinaci, M., et al. (2018). The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. *Environ. Health* 17, 52. doi: 10.1186/s12940-018-0393-y

PECBMS (2024). Pan-European Common Bird Monitoring Scheme (PECBMS). Available at: https://pecbms.info/#:~:text=The%20Pan%2DEuropean%20Common%20Bird,Read%20more%20about%20us.

Perego, M. C., Caloni, F., Cortinovis, C., Schutz, L. F., Albonico, M., Tsuzukibashi, D., et al. (2017). Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Chemosphere* 188, 274–279. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.007

Popoola, S. O., and Sakpa, C. L. (2018). Hormones of Pituitary-Gonadal Axis and Histology of Pituitary Gland Following Oral Treatment of Male Wistar Rats with Glyphosate. *J. Biomed. Res. Clin. Pract.* 1, 164–169. doi: 10.46912/jbrcp.57

Pöppe, J., Bote, K., Merle, R., Makarova, O., and Roesler, U. (2019). Minimum inhibitory concentration of glyphosate and a glyphosate-containing herbicide in salmonella enterica isolates originating from different time periods, hosts, and serovars. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 9, 35–41. doi: 10.1556/1886.2019.00005

Prado, I. S., Da Rocha, A. A., Silva, L. A., and Gonzalez, V. C. (2023). Glyphosate-based formulation affects Tetragonisca angustula worker's locomotion, behavior and biology. *Ecotoxicology* 32, 513–524. doi: 10.1007/s10646-023-02658-3

PubChem (n.d.). National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Retrieved May 31, 2024 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate.

Qin, C., Li, J., and Tang, K. (2018). The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* 159, 3458–3472. doi: 10.1210/en.2018-00453

Ramachandran, R., Maddineni, S., Ocón-Grove, O., Hendricks, G., Vasilatos-Younken, R., and Hadley, J. A. (2013). Expression of adiponectin and its receptors in avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 88–95. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.05.004

Ramachandran, R., Ocón-Grove, O. M., and Metzger, S. L. (2007). Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 19–31. doi: 10.1016/j.domaniend.2006.04.004

Ramirez Haberkon, N. B., Aparicio, V. C., and Mendez, M. J. (2021). First evidence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in the respirable dust (PM10) emitted from unpaved rural roads of Argentina. *Sci. Total Environ.* 773, 145055. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145055

Regar, M. N., Tulung, B., Londok, J. J. M. R., Moningkey, S. A. E., and Tulung, Y. R. L. (2019). Blood lipid profile of broiler chicken as affected by a combination of Feed restriction and different crude fiber sources. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 387, 012053. doi: 10.1088/1755-1315/387/1/012053

Réhault-Godbert, S., Guyot, N., and Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients* 11, 684. doi: 10.3390/nu11030684

Rehman, H. U., Vahjen, W., Awad, W. A., and Zentek, J. (2007). Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 61, 319–335. doi: 10.1080/17450390701556817

Ren, X., Li, R., Liu, J., Huang, K., Wu, S., Li, Y., et al. (2018). Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. *Environ. Pollut.* 243, 833–841. doi: 10.1016/j.envpol.2018.09.049

Rigal, S., Dakos, V., Alonso, H., Auniņš, A., Benkő, Z., Brotons, L., et al. (2023a). Farmland practices are driving bird population decline across Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2216573120. doi: 10.1073/pnas.2216573120

Rizzoti, K., and Lovell-Badge, R. (2017). Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 445, 7–13. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.020

Roustan, A., Aye, M., De Meo, M., and Di Giorgio, C. (2014). Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and

after photoactivation. *Chemosphere* 108, 93–100. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.079

Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Gómez-Gallego, C., Selenius, O., Salminen, S., Collado, M. C., et al. (2020a). Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. *Environ. Pollut.* 266, 115108. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115108

Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Uusitalo, M., Saikkonen, K., and Helander, M. (2020b). Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model. *Sci. Rep.* 10, 6349. doi: 10.1038/s41598-020-63365-1

Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., et al. (2018). Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20181297. doi: 10.1098/rspb.2018.1297

Salinas, A. E., and Wong, M. G. (1999). Glutathione S-Transferases - A Review. *Curr. Med. Chem.* 6, 279–309. doi: 10.2174/092986730666220208213032

Samsel, A., and Seneff, S. (2013a). Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy* 15, 1416–1463. doi: 10.3390/e15041416

Samsel, A., and Seneff, S. (2013b). Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy* 15, 1416–1463. doi: 10.3390/e15041416

Sanz, M., Lopez-Bote, C. J., Menoyo, D., and Bautista, J. M. (2000). Abdominal Fat Deposition and Fatty Acid Synthesis Are Lower and β-Oxidation Is Higher in Broiler Chickens Fed Diets Containing Unsaturated Rather than Saturated Fat. *J. Nutr.* 130, 3034–3037. doi: 10.1093/jn/130.12.3034

Sarrazin, F. (2012). CONSERVATION DE LA BIODIVERSITÉ ETHIQUE ENVIRONNEMENTALE.

Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., et al. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1376–1380. doi: 10.1073/pnas.98.4.1376

Schummer, B. (2022). Le glyphosate et les journalistes en France: La construction sociale d'un problème public médiatisé (2000-2020). *Sur Journal. Journal. Sobre J.* 11, 44–61. doi: 10.25200/SLJ.v11.n2.2022.493

Schwab, M., Reynders, V., Loitsch, S., Steinhilber, D., Stein, J., and Schröder, O. (2007). Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NFκB signalling. *Mol. Immunol.* 44, 3625–3632. doi: 10.1016/j.molimm.2007.04.010

Şekercioğlu, Ç. H., Daily, G. C., and Ehrlich, P. R. (2004). Ecosystem consequences of bird declines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 18042–18047. doi: 10.1073/pnas.0408049101

Serra, L., Estienne, A., Bourdon, G., Ramé, C., Chevaleyre, C., Didier, P., et al. (2021a). Chronic Dietary Exposure of Roosters to a Glyphosate-Based Herbicide Increases Seminal Plasma Glyphosate and AMPA Concentrations, Alters Sperm Parameters, and Induces Metabolic Disorders in the Progeny. *Toxics* 9, 318. doi: 10.3390/toxics9120318

Serra, L., Estienne, A., Vasseur, C., Froment, P., and Dupont, J. (2021b). Review: Mechanisms of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides Action in Female and Male Fertility in Humans and Animal Models. *Cells* 10, 3079. doi: 10.3390/cells10113079

Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, Alaa. A., Hafez, H. M., and Krüger, M. (2013a). The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro. *Curr. Microbiol.* 66, 350–358. doi: 10.1007/s00284-012-0277-2

Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, Alaa. A., Hafez, H. M., and Krüger, M. (2013b). The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro. *Curr. Microbiol.* 66, 350–358. doi: 10.1007/s00284-012-0277-2

Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., and Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Sci. Total Environ.* 653, 1532–1545. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.441

Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., et al. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Sci. Total Environ.* 621, 1352–1359. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.093

Silver, R. J., Paczosa, M. K., McCabe, A. L., Balada-Llasat, J.-M., Baleja, J. D., and Mecsas, J. (2019). Amino Acid Biosynthetic Pathways Are Required for *Klebsiella pneumoniae* Growth in Immunocompromised Lungs and Are Druggable Targets during Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e02674-18. doi: 10.1128/AAC.02674-18

Some organophosphate insecticides and herbicides (2017). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.

Spinaci, M., Bucci, D., Muccilli, V., Cardullo, N., Nerozzi, C., and Galeati, G. (2019). A polyphenol-rich extract from an oenological oak-derived tannin influences in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology* 129, 82–89. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.017

Stahlschmidt, Z. R., Whitlock, J., Vo, C., Evalen, P., and D, B. (2022). Pesticides in a warmer world: Effects of glyphosate and warming across insect life stages. *Environ. Pollut.* 307, 119508. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119508

Stanton, R. L., Morrissey, C. A., and Clark, R. G. (2018). Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254. doi: 10.1016/j.agee.2017.11.028

Stark, M. R., and Ross, M. M. (2019). “The Chicken Embryo as a Model in Developmental Toxicology,” in *Developmental Toxicology*, eds. J. M. Hansen and L. M. Winn (New York, NY: Springer New York), 155–171. doi: 10.1007/978-1-4939-9182-2_11

Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., and Fryer, A. A. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 482, 21–26. doi: 10.1016/S0027-5107(01)00206-8

Sugimoto, Y., Saito, A., Kusakabe, T., Hori, K., and Koga, K. (1989). Flow of egg white ovalbumin into the yolk sac during embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 992, 400–403. doi: 10.1016/0304-4165(89)90104-9

Sun, J., Gao, Y., Yao, T., Huang, Y., He, Z., Kong, X., et al. (2016). Adiponectin potentiates the acute effects of leptin in arcuate Pomc neurons. *Mol. Metab.* 5, 882–891. doi: 10.1016/j.molmet.2016.08.007

Tang, Q., Tang, J., Ren, X., and Li, C. (2020). Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ. Pollut.* 261, 114129. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114129

Tao, C., Sifuentes, A., and Holland, W. L. (2014). Regulation of glucose and lipid homeostasis by adiponectin: Effects on hepatocytes, pancreatic β cells and adipocytes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 43–58. doi: 10.1016/j.beem.2013.11.003

Topping, D. L., and Clifton, P. M. (2001). Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81, 1031–1064. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1031

Toutain, P. L., and Bousquet-Melou, A. (2004). Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 427–439. doi: 10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x

Turk, D. E. (1982). The Anatomy of the Avian Digestive Tract as Related to Feed Utilization. *Poult. Sci.* 61, 1225–1244. doi: 10.3382/ps.0611225

UICN (2024). IUCN Red List. Available at: https://www.iucnredlist.org/fr

Union of Concerned Scientists (1992). 1992 World Scientists’ Warning to Humanity.

Van Der Wielen, P. W. J. J., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B. A. P., and Van Knapen, F. (2000). Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2536–2540. doi: 10.1128/AEM.66.6.2536-2540.2000

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., et al. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455. doi: 10.1210/er.2011-1050

Vázquez, D. E., Balbuena, M. S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., and Farina, W. M. (2020). Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Sci. Rep.* 10, 10516. doi: 10.1038/s41598-020-67477-6

Vucetich, J. A., Nelson, M. P., and Bruskotter, J. T. (2017). Conservation Triage Falls Short Because Conservation Is Not Like Emergency Medicine. *Front. Ecol. Evol.* 5, 45. doi: 10.3389/fevo.2017.00045

Walsh, L. P., McCormick, C., Martin, C., and Stocco, D. M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* 108, 8.

Walsky, R. L., and Obach, R. S. (2004). VALIDATED ASSAYS FOR HUMAN CYTOCHROME P450 ACTIVITIES. *Drug Metab. Dispos.* 32, 647–660. doi: 10.1124/dmd.32.6.647

Wang, M., Zhang, S., Zhong, R., Wan, F., Chen, L., Liu, L., et al. (2021). Olive Fruit Extracts Supplement Improve Antioxidant Capacity via Altering Colonic Microbiota Composition in Mice. *Front. Nutr.* 8, 645099. doi: 10.3389/fnut.2021.645099

Wang, X., Lu, Q., Guo, J., Ares, I., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.-R., et al. (2022). Oxidative Stress and Metabolism: A Mechanistic Insight for Glyphosate Toxicology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 62, 617–639. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-020821-111552

White, D. H., Mitchell, C. A., and Hill, E. F. (1983). Parathion alters incubation behavior of laughing gulls. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 93–97. doi: 10.1007/BF01608772

White, R. E. (2017). "Role of ADME/PK in Drug Discovery, Safety Assessment, and Clinical Development," in *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, (Elsevier), 1–33. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12364-9

Williams, G. M., Kroes, R., and Munro, I. C. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165. doi: 10.1006/rtph.1999.1371

Winnick, B., and Dzialowski, E. M. (2013). The Effects of Glyphosate Based Herbicides on Chick Embryo Morphology during Development. *FASEB J.* 27. doi: 10.1096/fasebj.27.1_supplement.874.12

Wirtshafter, H. S., and Wilson, M. A. (2021). Lateral septum as a nexus for mood, motivation, and movement. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 126, 544–559. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.03.029

Wong, A. C.-N., Holmes, A., Ponton, F., Lihoreau, M., Wilson, K., Raubenheimer, D., et al. (2015). Behavioral Microbiomics: A Multi-Dimensional Approach to Microbial Influence on Behavior. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01359

Wrobel, M. H. (2018). Glyphosate affects the secretion of regulators of uterine contractions in cows while it does not directly impair the motoric function of myometrium in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 349, 55–61. doi: 10.1016/j.taap.2018.04.031

Xu, J., Smith, S., Smith, G., Wang, W., and Li, Y. (2019). Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. *Food Control* 106, 106710. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106710

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769. doi: 10.1038/nature01705

Yan, J., Yang, H., Gan, L., and Sun, C. (2014). Adiponectin-impaired adipocyte differentiation negatively regulates fat deposition in chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98, 530–537. doi: 10.1111/jpn.12107

Yeoman, C. J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N. D., and White, B. A. (2012). The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim. Health Res. Rev.* 13, 89–99. doi: 10.1017/S1466252312000138

Zereini, F., Wiseman, C. L. S., Vang, M., Albers, P., Schneider, W., Schindl, R., et al. (2016). Geochemical behaviour of palladium in soils and Pd/PdO model substances in the presence of the organic complexing agents L -methionine and citric acid. *Environ. Sci. Process. Impacts* 18, 22–31. doi: 10.1039/C5EM00521C

Zhang, F., Zhang, Q., Liu, X., Gao, M., Li, X., Wang, Y., et al. (2023). Human serum lipidomics analysis revealed glyphosate may lead to lipid metabolism disorders and health risks. *Environ. Int.* 171, 107682. doi: 10.1016/j.envint.2022.107682

Zhang, Q., Liu, X., Gao, M., Li, X., Wang, Y., Chang, Y., et al. (2022). The study of human serum metabolome on the health effects of glyphosate and early warning of potential damage. *Chemosphere* 298, 134308. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134308

Ziprin, R. L., Corrier, D. E., and DeLoach, J. R. (1993). Control of Established Salmonella typhimurium Intestinal Colonization with in vivo-Passaged Anaerobes. *Avian Dis.* 37, 183. doi: 10.2307/1591472

Principaux articles publiés au cours de la thèse

I. Fréville et al., 2023

Fréville, M., Henri, J., Estienne, A., Serra, L., Ramé, C., Ganier, P., et al. (2023). Determination of the elimination half-life of Glyphosate and its main metabolite, AMPA, in chicken plasma. *Toxicology Letters* 389, 19–25. doi: 10.1016/j.toxlet.2023.10.009

Toxicology Letters 389 (2023) 19–25

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.journals.elsevier.com/toxicology-letters

Determination of the elimination half-life of Glyphosate and its main metabolite, AMPA, in chicken plasma

Mathias Fréville [a], Jérôme Henri [b], Anthony Estienne [a], Loïse Serra [a], Christelle Ramé [a], Patrice Ganier [c], Marine Chahnamian [c], Pascal Froment [a], Joëlle Dupont [a,*]

[a] CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, F-37380 Nouzilly, France
[b] Fougères Laboratory, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), 10B rue Claude Bourgelat, Fougères 35306, France
[c] INRAE - Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT 1295, F-37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Editor: Dr. Angela Mally

Keywords:
Glyphosate-based Herbicides
Half-life
Poultry
Dietary exposure
Intravenous injection

ABSTRACT

Glyphosate-based herbicides (GBHs) are the most-used herbicides worldwide. Concerns about their toxicity and ecotoxicity have motivated scientists to assess their potential effects on animals, as well as their toxicokinetic parameters in rats and humans. However, to our knowledge, such data have not been produced for avian models. In this study, toxicokinetic parameters for glyphosate and AMPA were calculated after one unique dietary exposure (40 mg of glyphosate equivalent per kg) and one unique intravenous injection of a GBH, in hens and roosters respectively. Non compartmental analysis was used to show the evolution of glyphosate and AMPA plasma concentrations over time. After one unique intravenous injection of a glyphosate-based herbicide, glyphosate and AMPA were quickly eliminated from plasma and were poorly distributed ($Vss_{glyphosate}$ = 0.30 L/kg). Their terminal half-lives are 4.7 h and 8.10 h, respectively. After dietary exposure, glyphosate and AMPA followed a 6 h absorption phase followed by a 42 h elimination phase. They were poorly distributed ($Vss_{glyphosate}$ = 0.00562 L/kg), and their maximum concentrations (Cmax) were 21285 μg/L and 108 μg/L, respectively. Their terminal elimination half-lives were 8.94 h and 6.93 h, respectively. Taken together, this study provides new data on the elimination rate and approximate biological half-life range of glyphosate in birds.

1. Introduction

Growing populations and the resulting increases in food demand have led farmers to look for strategies to increase their productivity (Gill et al., 2018). The use of fertilizer increases the growth of crops, which can then be effectively harvested using mechanical harvesting machines. Unwanted weeds can be removed with powerful herbicides. The most commonly used of these is glyphosate, or N-(phosphonomethyl)glycine (Gill et al., 2018). This broad-spectrum herbicide owes its effectiveness to its ability to inhibit EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), an enzyme from the shikimate pathway exclusively expressed in plants and in some microorganisms (Schönbrunn et al., 2001). The resulting cancellation of the shikimate pathway leads to a default in an aromatic amino acid and, more generally, a dysregulation of various metabolic pathways in the plant, which eventually dies (Bradberry et al., 2004). When spread in the environment, glyphosate has two main fates. The vast majority of it is degraded by soil microbial communities into aminomethyl phosphonic acid (AMPA), its main metabolite. Some is also turned into sarcosine, then glycine. Both pathways ultimately end with mineralization into CO_2, phosphonic acid, and NH_4^+ (Bai and Ogbourne, 2016). It is worth noticing that the European Food Safety Authority (EFSA) warns of the high persistence of glyphosate and AMPA, which have a DT50 (time required for the chemical concentration under defined conditions to decline to 50% of the amount at application) reaching hundreds of days and being variable depending on the aerobic/anaerobic status of the soil (Martins-Gomes et al., 2022).

Confusion between glyphosate and glyphosate-based herbicide (GBH) must be avoided. Indeed, glyphosate needs wetting agent to better penetrate plant systems (Bradberry et al., 2004). The addition of organic co-formulants (such as surfactants) is therefore essential to allow glyphosate to exert its full herbicide power (Bradberry et al., 2004; Kim et al., 2013; Mesnage et al., 2019). The resulting formulation is called a GBH; this is the actual product spread on fields. Studying the impact of GBHs on animal systems is therefore more relevant than studying glyphosate alone, but it does not affirm that the observed effects are due to the action of glyphosate, since they are likely caused by

* Correspondence to: INRAE UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France.
E-mail address: joelle.dupont@inrae.fr (J. Dupont).

https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.10.009
Received 20 June 2023; Received in revised form 18 September 2023; Accepted 9 October 2023
Available online 20 October 2023
0378-4274/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

the co-formulants or by their combination.

Previous studies performed in our laboratory on broiler hens show that dietary GBH intake results in a significant increase in embryo mortality and developmental defects (Estienne et al., 2022). These data are in good agreement with a recent study showing that pesticide use is one of main causes for the decline of most bird populations (Rigal et al., 2023). We also confirmed that glyphosate is poorly biotransformed in this model, as in previous studies using other animal models (Williams et al., 2000). Still, we observed a disturbance in cecal bacteria populations, with possible metabolic repercussions (Fréville et al., 2022). However, to our knowledge, data about the toxicokinetics (TK) of glyphosate and AMPA in birds have not been yet obtained. Such data have been produced in rats after a single oral administration, showing a poor oral bioavailability of glyphosate (about 23%), which is still distributed in the organism via blood circulation (Anadón et al., 2009). Glyphosate was biotransformed to AMPA in rats, and AMPA represented 6.5% of the parent compound plasma concentrations.

The present study therefore aims to determine toxicokinetic parameters such as absorption, half-life, or clearance for glyphosate and AMPA in hens and roosters, after unique oral and intravenous administration of GBH.

2. Material and methods

2.1. Ethical issues

All experimental procedures were performed in accordance with the French national guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals APAFIS number 21549–2019071809504554v3, Approval Date: 6 November 2021, Ministry of Agriculture and Fish Products; notice of ethics committee of Val de Loire N◦19).

2.2. Animals

Animals were divided into two experiments: Experiment 1 involved a single dietary exposure to a GBH in adult hens and monitoring of plasma glyphosate concentration for 48 h, and Experiment 2 involved a single intravenous injection of GBH into adult roosters and monitoring of plasma glyphosate concentration for 24 h. The GBH concentration used for both experiments was chosen to correspond to 40 mg of glyphosate equivalent per kg of body weight, corresponding to approximatively half the NOAEL (no-observed adverse-effect level; 100 mg glyphosate/kg body weight/day) reported by the European Food Safety Authority (EFSA). In studies previously performed in our laboratory, several adverse effects were detected in chicken after exposure to a similar dose (Estienne et al., 2022; Fréville et al., 2022). The experimental design is summarized in Fig. 1.

For Experiment 1, 4 ROSS 308 roosters were obtained at 1 day of age from a local hatchery (Boye Accouvage La Villonniere, 79310 La Boissière en Gatine, France) and reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) under traditional breeding conditions. At 36 weeks old, the roosters were given a single intravenous injection of a solution of GBH diluted in physiological serum (a GBH dose equivalent to 40 mg glyphosate/kg body weight) through the left alar vein and fasted for the following 48 h. GBH was totally dissolved in the resulting solution. Plasma samples were collected from the occipital venous sinus before injection and several times after (0, 15, and 30 min; 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 24 h) during the following 24 h.

For Experiment 2, 20 ROSS 308 hens were obtained at 1 day of age from a local hatchery (Boye Accouvage La Villonniere, 79310 La Boissière en Gatine, France) and reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) under traditional breeding conditions. At 36 weeks old, 10 hens were exposed to GBH via their feed (a GBH dose equivalent to 40 mg glyphosate/kg body weight), and 10 hens were fed a regular diet without GBH exposure. Animals in the first group had free access to the GBH-enriched food for 30 min, the time needed for all the feed to be eaten. After that, the animals no longer had access to food. Plasma samples were collected several times from the occipital venous sinus before and after the end of feed access (0 and 30 min; 4, 8, 12, 24, 30, and 48 h).

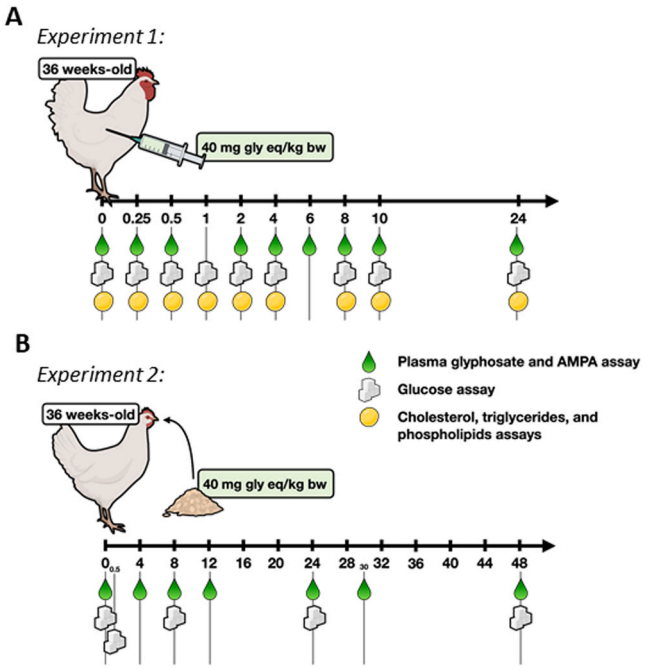


Fig. 1. Experimental design applied to the animals. For experiment 1 (A), ROSS 308 roosters (36 weeks-old; n = 4) were injected with a single dose of GBH (Glyphosate-Based Herbicide; 40 mg glyphosate/kg body weight). For experiment 2 (B), ROSS 308 hens (36 weeks-old; n = 10) were exposed a single time to GBH via their feed (GBH hens; 40 mg glyphosate/kg body weight). Their controls (36 weeks old; n = 10) were fed with a regular diet without exposure to GBH (CT hens). Blood plasma from the animals from experiment 1 and experiment 2 were regularly sampled for glyphosate, AMPA, glucose and cholesterol, triglycerides and phospholipids assays during the following 24 h and 48 h respectively.

2.3. Chemicals

Gallup Super 360, called GBH within this text, was obtained from Axereal (Monnaie, France); it contained 360 g/L Gly (485.8 g/L isopropylamine salt). It was mixed with the diet (whose composition is shown in Supplementary Table 1), which contains low measurable glyphosate and AMPA (0.21 mg/kg feed for Gly and undetectable levels for AMPA as determined by Phytocontrol, Nimes, France). The mix was done in accordance with the directives of the Departmental Directorate for the Protection of Populations. Mixing was carried out by a technician with a "Certiphyto" certification for the handling of phytosanitary products, as recommended by French law.

2.4. Plasma samples

In Experiment 1, blood samples (1 mL) were collected from the occipital sinuses of 4 injected roosters into heparinized tubes at 0, 15, and 30 min and 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 24 h after the GBH intravenous injection. Blood plasma was recovered after centrifugation at 5000 g for 10 min at 4 °C and stored at −20 °C until use.

In Experiment 2, blood samples (1 mL) were collected from the occipital sinuses of 10 dietary exposed hens and 10 non-exposed animals into heparinized tubes at 0 and 30 min and 4, 8, 12, 24, 30, and 48 h after feeding.

2.5. Glyphosate and AMPA assays in plasma

Glyphosate and AMPA concentrations were measured in the plasma from 20 hens and 4 roosters after a derivatization reaction using FMOC-Cl (9- fluorenylmethyl chloroformate), in collaboration with Dr. S El Balkhi (Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Limoges, France), as previously described (Serra et al., 2021). Higher and lower limits of quantification (LOQ) were 0.1 and 10 µg/L, respectively. 100 µL of blood plasma per sample was necessary to perform the analysis. Quality controls for both glyphosate and AMPA were systematically prepared and analyzed at concentrations of 0.5 and 5 µg/L. These controls were examined after the calibration points and after every set of 10 samples. For glyphosate, the average bias was 87%, with a standard deviation of 9% and a coefficient of variation of 10%. For AMPA, the average bias stood at 99%, accompanied by a standard deviation and coefficient of variation both at 19%.

2.6. Plasma glucose, triglycerides, phospholipids, and cholesterol assays

Plasma concentrations of glucose, triglycerides, phospholipids, and cholesterol were determined by enzymatic assay using specific kits (glucose: GOD-POD, reference MG981780, ThermoScientific, Asnières sur Seine, France; triglycerides: reference LP80519, Biolabo SAS, Maizy, France; phospholipids: reference 99105, Biolabo SAS, Maizy, France; cholesterol: reference 80106, Biolabo SAS, Maizy, France). Measurements were performed according to the manufacturers' protocols. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) for each assay averaged $< 15\%$.

2.7. Cortisol assay in roosters' plasma

Plasma cortisol levels were measured using an IBL Cortisol ELISA kit (Immuno-Biological Laboratories, Germany), and absorbance was measured at 450 nm, with 630 nm as the reference wavelength. The lower detection limit for cortisol was 0.05 ng/mL, and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) for each assay averaged $< 10\%$.

2.8. Testosterone assay in roosters' plasma

Testosterone concentrations in blood plasma were determined using commercial ELISA assays from Cayman Chemicals, following the manufacturer's instructions. The sensitivity of this assay was 0.01 ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) for each assay averaged $< 10\%$.

2.9. Data analyses

GraphPad Prism® software (Version 8) was used for all analyses, except for pharmacokinetic analyses. Data were tested for homogeneity of variance by Bartlett's test and for normal distribution by Shapiro-Wilk test. GraphPad Prism® software (Version 8) was used to create all histogram graphs, and Rstudio was used to create all curve graphs. One-way ANOVA was performed with Tukey-Kramer multiple comparisons tests or Dunnett's multiple comparisons tests as appropriate. Data were presented as means ± SD, with $p < 0.05$ considered significant. Pharmacokinetic non-compartmental analyses were done using PKanalix (Version 2020R1; Antony, France: Lixoft SAS, 2020, http://lixoft.com/products/PKanalix/). Integrals were realized using the linear log trapezoidal method. Terminal half-lives (from final slope) were calculated on the last three time points.

3. Results

There were no clinical signs of adverse effects from GBH administration noted in this study.

3.1. Experiment 1: Glyphosate and AMPA plasma concentrations rapidly decrease after intravenous GBH injection

Glyphosate and AMPA plasma concentrations (µg/L) after a single intravenous (IV) GBH injection (40 mg of glyphosate equivalent/kg of bodyweight) are shown in Figs. 2-A and 2-B, respectively. Fifteen minutes after IV injection, the concentration of glyphosate ranges between $1.3*10^4$ and $1.7*10^4$ µg/L. It quickly drops during the first eight hours of the experiment, then declines slowly. AMPA follows a similar pattern, with a rapid decrease during the six first hours after IV injection of GBH, followed by a slow decline. Nevertheless, the two molecules, on a logarithmic scale (not shown), do not rigorously describe a bi- (or even a tri-) exponential decay; therefore, the data were analyzed using the non-compartmental approach (Bulitta, n.d.). Glyphosate's and AMPA's area under the curve extrapolated to infinity (AUCinf), total clearance (CLt), volume of distribution at steady state (Vss) and terminal half-life ($T_{1/2}$) are given in Table 1 for each individual and its mean with coefficient of variation (CV). Mean glyphosate AUCinf is 49,333 µg.h/L (for the tested dose of 40 mg/kg). Mean glyphosate total clearance is 0.081 L/h/kg bw. Glyphosate volume of distribution at steady state (Vss) is 0.30 L/kg bw. Terminal glyphosate half-life ($T_{1/2}$) is 4.7 h. AMPA AUC infinite (AUCinf) is 104 µg.h/L. AMPA represents 0.32% of the parent compound plasma concentrations (based on their AUCinf corrected by their molecular weights). AMPA terminal half-life ($T_{1/2}$) is 8.10 h in mean.

3.2. Experiment 2: Glyphosate and AMPA concentrations in plasma peak 6 h after dietary administration

Glyphosate and AMPA plasma concentrations (µg/L) after a unique oral GBH administration (40 mg of glyphosate equivalent/kg of bodyweight) are given in Figs. 3-A and 3-B. Plasma concentrations of glyphosate and AMPA peak 6 h after glyphosate administration. Glyphosate concentrations quickly drop from the 6th hour to the 24th hour, when they return to almost zero (Fig. 3-A). AMPA concentrations peak 6 h after administration and immediately return to near zero from the 12th hour to the end of the experiment. Glyphosate's and AMPA's main toxicokinetic parameters are given in Table 2. After oral administration (40 mg/kg), glyphosate Cmax is 21285 µg/L, glyphosate AUCinf is 366760 h.µg/L, apparent glyphosate total clearance (CLt/F) is 0.000436 L/h/kg bw, apparent glyphosate volume of distribution at steady state (Vss/F) is 0.00562 L/kg bw, and glyphosate oral terminal half-life ($T_{1/2}$) is 8.94 h. On the other hand, AMPA Cmax is 108 µg/L, and AMPA AUCinf is 582 h.µg/L. AMPA represents 0.24% of the parent compound, and its terminal half-life ($T_{1/2}$) is 6.93 h.

3.3. Blood glucose levels increase after intravenous GBH injection

Cholesterol, triglycerides, phospholipids, and glucose levels were measured in the animals that were injected with one unique intravenous GBH injection (40 mg of glyphosate equivalent/kg of bodyweight). Results are given in Figs. 4-A, 4-B, 4-C, and 4-D, respectively. Glucose concentrations continuously increased ($P < 0.05$) for the first 10 h after the injection, then stabilized 24 h after the injection. Triglycerides levels were stable until the 4th hour after injection, after which levels dropped slightly ($P < 0.05$) until the 10th hour after injection. Cholesterol and phospholipids levels remained unaffected during the 24 h after injection ($P > 0.05$). Cortisol concentration over time was measured to ensure that the aforementioned variations did not result from stress induced by puncture. Results are shown in Fig. 4-E. Cortisol levels were stable ($P > 0.005$). Testosterone levels over time are given in Fig. 4-F. Mean testosterone level is higher during the 24th hour after injection.

3.4. Blood glucose levels increase after dietary GBH exposure

Glucose levels were measured in the plasma from animals that were

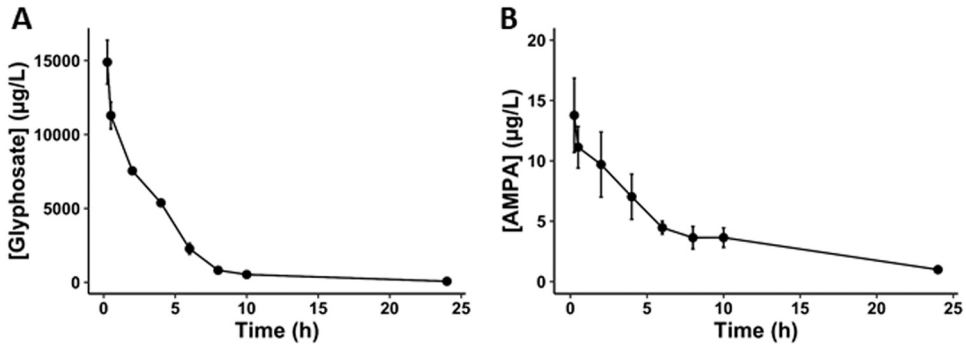


Fig. 2. Glyphosate (A) and AMPA (B) plasma concentration in roosters after a single GBH intravenous injection (40 mg glyphosate/kg body weight; n = 4). Results are represented as mean ± SD.

Table 1
Non compartmental analysis of plasma Glyphosate and AMPA concentrations after unique intravenous injection of 40,000 µg/kg of bodyweight of GBH in 4 roosters.

Parameter	Unit	Rooster 1	Rooster 2	Rooster 3	Rooster 4	Mean (CV in %)
Body weight	kg	4.37	4.81	4.27	4.32	4.44 (5.6%)
Glyphosate AUC infinite (AUCinf)	µg.h/L	46136	54851	47282	49035	49333 (7.8%)
Glyphosate Total clearance (CLt)	L/h/kg bw	0.087	0.073	0.084	0.082	0.081 (7.4%)
Glyphosate Volume of distribution at steady-state (Vss)	L/kg bw	0.32	0.30	0.30	0.28	0.30 (5.5%)
Glyphosate Terminal half-life (T1/2)	h	5.1	4.7	4.5	4.3	4.7 (7.7%)
AMPA AUC infinite (AUCinf)	µg.h/L	110	118	95	92	104 (12.1%)
AMPA percentage (on AUCinf)	%	0.36	0.33	0.31	0.28	0.32 (10.4%)
AMPA Terminal half-life (T1/2)	h	9.4	7.8	8.6	6.6	8.10 (14.7%)

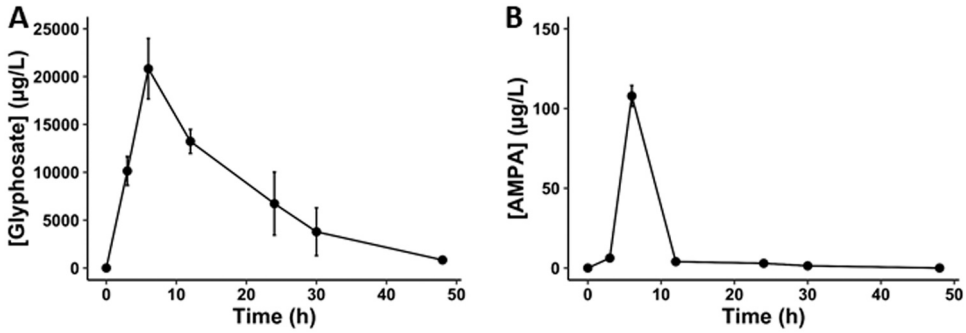


Fig. 3. Glyphosate (A) and AMPA (B) plasma concentration in hens after a single dietary GBH exposure (40 mg glyphosate/kg body weight; n = 10). Results are represented as mean ± SD.

orally exposed to GBH (40 mg of glyphosate equivalent/kg of body weight). Results are shown in Fig. 5. Glucose concentrations continuously increased during the 48 h of monitoring and were significantly higher ($P < 0.0001$) in GBH-exposed animals than in control animals.

4. Discussion

Glyphosate-based herbicides, and by extension glyphosate itself, are not supposed to adversely affect humans and animals in any way, since the target of glyphosate is an enzyme expressed only in plants and some microorganisms (Schönbrunn et al., 2001). However, some studies show possible adverse effects after GBH administration in various models (Gill et al., 2018). Furthermore, some data show that human populations are widely exposed, mainly via their diet, as well as through the respiratory tract for occupational populations (Grau et al., 2022). Zhang et al. (2020) measured various concentrations of urinary glyphosate in occupational and non-occupational populations. Although other recent studies claim that non-occupational populations are weakly exposed, they still show non-negligible levels of contamination in horticulture, farm, and glyphosate production workers (Connolly et al., 2017; Zhang et al., 2020; Faniband et al., 2021; Kohsuwan et al., 2022).

Concerns about animals exposure have also grown, as animals are very likely to be exposed via their feed (Van Eenennaam & Young, 2017). Previous works in our laboratory have identified several toxic outcomes following dietary GBH exposure in chickens, including embryo mortality, oxidative stress induction, and microbiome disruptions (Estienne et al., 2022; Fréville et al., 2022). Information about the behavior of glyphosate inside the body should therefore allow a better understanding of the mechanisms behind these effects. Such data are already available for rats as laboratory animals for human risk assessment (Anadón et al., 2009), but as far as we know, they were not explored yet for chickens. We chose to work with a dose of 40 mg of glyphosate equivalent per kg bw, corresponding to approximately half the NOAEL (no-observed-adverse-effect level; 100 mg glyphosate/kg body weight/day) reported by the European Food Safety Authority (EFSA). After IV injection of 40 mg of glyphosate equivalent in GBH, glyphosate and AMPA are rapidly eliminated from the plasma. Glyphosate and AMPA concentrations decrease rapidly during the minutes

Table 2
Non compartmental analysis of plasma Glyphosate and AMPA concentrations after unique GBH oral ingestion via the feed of 40 mg/kg of body weight in 10 laying hens.

Parameter	Unit	Hen A	Hen B	Hen C	Hen D	Hen E	Hen F	Hen G	Hen H	Hen I	Hen J	Mean (CV in %)
Bodyweight	kg	4.115	4.810	4.270	3.660	2.825	3.795	3.855	3.210	4.350	3.915	3.880 (14.7%)
Glyphosate Cmax	µg/L	25432	15954	23456	22341	19745	16578	18764	22546	24576	23456	21285 (15.6%)
Glyphosate AUC infinite (AUCinf)	h.µg/L	453726	423031	329965	313185	320841	358321	383898	353551	345160	385921	366760 (12.3%)
Apparent Glyphosate Total clearance (CLt/F)	L/h/kg bw	0.00035	0.0004	0.00051	0.00047	0.00054	0.00042	0.0004	0.00036	0.0005	0.00041	0.000436 (14.9%)
Apparent Glyphosate Volume of distribution at steady-state (Vss/F)	L/kg bw	0.0052	0.0039	0.0064	0.0052	0.0079	0.0053	0.0051	0.0062	0.0062	0.0048	0.00562 (19.5%)
Glyphosate Terminal half-life (T1/2)	h	10.19	6.71	8.66	7.67	10.09	8.72	8.77	11.93	8.52	8.22	8.94 (16.3%)
AMPA Cmax	µg/L	118	106	103	109	110	98	100	105	118	109	108 (4.4%)
AMPA AUC infinite (AUCinf)	h.µg/L	630	566	568	557	595	547	595	566	617	577	582 (4.6%)
AMPA percentage (on AUCinf)	%	0.21	0.20	0.26	0.27	0.28	0.23	0.23	0.24	0.27	0.22	0.24 (10.9%)
AMPA Terminal half-life (T1/2)	h	10.32	16.17	5.25	4.58	5.12	5.46	2.96	4.21	11.29	3.97	6.93 (61.1%)

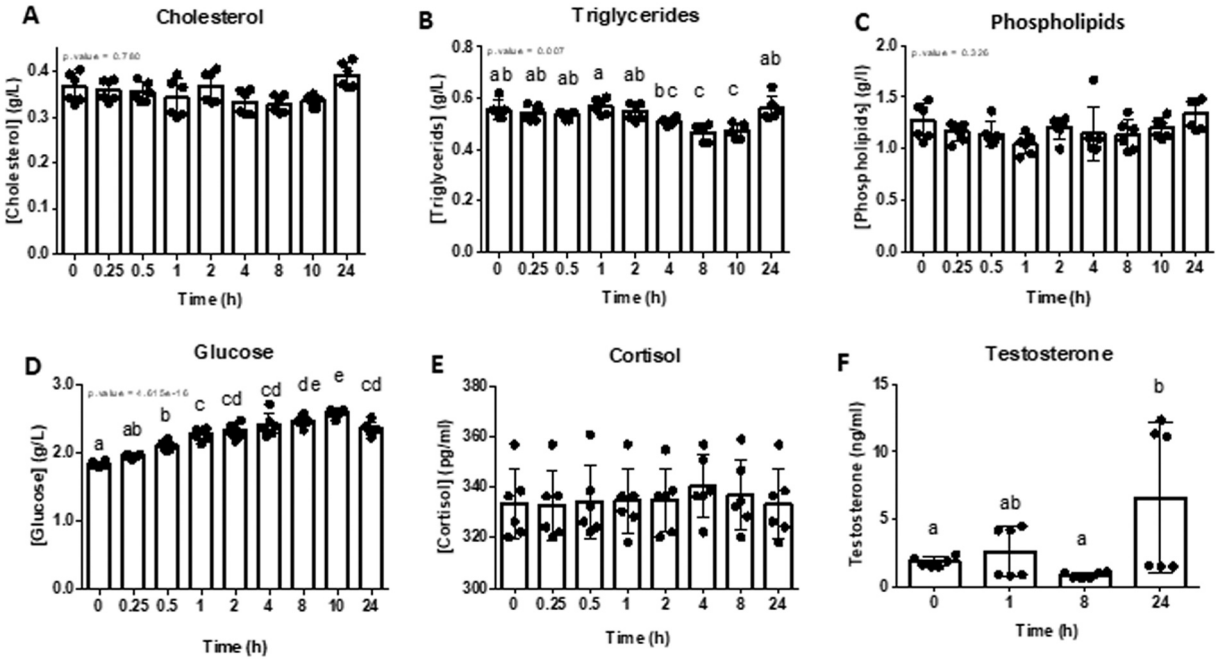


Fig. 4. Cholesterol (A), triglycerides (B), phospholipids (C) and glucose (D), cortisol (E) and testosterone (F) concentrations in roosters plasma after a single GBH intravenous injection (40 mg glyphosate/kg body weight; n = 4). Results are represented as mean ± SD. Letters indicate statistical significance after one-way ANOVA ($p < 0.05$).

following the injection, which suggest the possibility of fast distribution. However, the volume of distribution at steady state is pretty low (Vss = 0.30 L/kg) compared to that observed in rats (Vss = 2.99 L/kg, after IV injection of 100 mg/kg of glyphosate 95% v/v). Glyphosate and AMPA should therefore be more weakly distributed in the peripheral tissues (Anadón et al., 2009) of chickens [as Vss gives an estimate of glyphosate distribution in tissues (White, 2017)]. We measured the half-life values after IV injection for glyphosate ($T_{1/2}$ = 4.7 h) and AMPA ($T_{1/2}$ = 8.10 h). The half-life value for glyphosate after IV injection ($T_{1/2}$ = 4.7 h) is much shorter than that measured in rats [9.99 h for glyphosate, (Anadón et al., 2009)] and shorter than what we measured after oral administration of the same dose of GBH ($T_{1/2}$ = 8.40 h). Half-life value for AMPA after IV injection is greater than the value after oral administration ($T_{1/2}$ = 6.93 h).

Species, dosage, and mode of administration strongly influence toxicokinetic parameters (Zhang et al., 2020). The AMPA metabolite represented 6.49% of the parent compound after oral administration in rats (Anadón et al., 2009); this proportion was further reduced here in chickens to 0.24%. This extremely low metabolism of glyphosate to AMPA was also found in our intravenous study, at a similar rate of 0.32%. It is interesting that this biotransformation, usually attributed to the microbiota (Rueppel et al., 1977), is found at the same level after an intravenous treatment, i.e. without passing through the microbiota. However, Rueppel et al. refers to a microbial biotransformation in soil and in animals, but enzyme responsible of this biotransformation has never been identified. This could be an important gap to fill in future investigations for interspecies comparisons. Although this metabolite appears to be minor in mammals and birds, little is known about the



Fig. 5. Glucose concentration in hens plasma after a single dietary GBH exposure (GBH; 40 mg glyphosate/kg body weight; n = 10) or after exposure to the same diet without glyphosate (CT; n = 10). Results are represented as mean ± SD. Two-way ANOVA; ****$p < 0.0001$.

clearance of glyphosate in animals. This makes inter-species comparisons difficult for this parameter, which is 0.995 L/h/kg in rats (Anadón et al., 2009) and more than ten times lower in chickens (0.081 L/h/kg). Inter-species differences are more difficult to interpret, as details of elimination mechanisms (hepatic, renal, and others) are unknown. However, the hydrophilicity of glyphosate suggests that renal filtration is a major route of elimination, which could be attenuated by binding to plasma proteins.

Glyphosate is poorly bioavailable and poorly absorbed in chicken and other models, as up to 80% of the administered glyphosate is found in feces (JMPR 2004). Furthermore, with the oral absorption rate being low, the elimination rate could be faster, making the absorption rate the limiting factor in the kinetics and thus influencing the half-life of the molecule (Kuan et al., 2023). This phenomenon is called flip-flop in pharmacokinetics (Toutain and Bousquet-Melou, 2004). Glyphosate and AMPA display a rapid distribution phase which peaks at 6 h, after which glyphosate displays a longer elimination phase, consistent with that observed in rats (Anadón et al., 2009). However, the glyphosate maximum concentration (Cmax) in chickens was 21,290 μg/L. This is four times the Cmax measured in rats (4.62 μg/mL), while the oral dose administered is ten times lower (Anadón et al., 2009). We can hypothesize that the surfactants present in the GBH formulation we used influence the toxicokinetic parameters of glyphosate. This variation could also be explained by inter-species differences.

To further complete the above-mentioned observations, we decided to perform several metabolic and endocrinologic dosages. It has been shown that oral administration of glyphosate in rats results in increased blood glucose levels, which are linked to insulin resistance and elevated insulin levels (Prasad et al., 2022). Glycemia increases in dietary exposed animals from the first half hour after exposure, and its difference from the control value continues growing throughout the 48 h of glycemia monitoring. Injected animals showcase a constant and significant increase in circulating blood glucose levels during the 10 first hours of exposure (while the animals are fasting), which seems to start restoring after 24 h of exposure. Measurements of insulin levels in plasma could help identify the process leading to this increase, but in the absence of a real control, we cannot confirm that the link between the GBH injection and the glucose rise is not merely correlational. GBHs have also been linked to endocrine disorders (Muñoz et al., 2021). Previous works in our laboratory showed that dietary exposure to GBH increases testosterone and estradiol levels in roosters' plasma (Serra et al., 2021). We measured plasma testosterone levels in the hours after injection and observed an increase 24 h later. Though this increase is statistically significant, testosterone levels increased in only three out of the six tested animals. The question arises as to why testosterone levels are stable in some animals and not in others. It could be explained by a disruption of testosterone producing cells, though this more likely would have led to reduced plasma levels (Muñoz et al., 2021). We are again unable to confirm that this observation is not simply correlational.

5. Conclusion

This study characterizes the main toxicokinetic parameters related to glyphosate and AMPA after GBH administration in chickens. The data show that dietary glyphosate and AMPA are quickly absorbed and eliminated. Their concentrations in plasma are almost zero 48 h after ingestion, and their low volume of distribution at steady state indicates that they are poorly distributed in peripheral tissues. Considering that co-formulants are suspected to be more toxic that glyphosate itself, it might be useful to assess their toxicokinetic parameters. However, the lack of available information about the exact composition of most GBHs makes it difficult to study those parameters. Experimental protocols including models of different ages and sexes would also be helpful, as most mortal poisoning cases involve older men (Roberts et al., 2010).

Declaration of Competing Interest

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

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank the Région Centre Val de loire for the HAPOFERTI funding Number 32000858.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.toxlet.2023.10.009.

References

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Castellano, V.J., Martínez, M., Martin, M.T., et al., 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. Toxicol. Lett. 190, 91–95. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.008.

Bai, S.H., Ogbourne, S.M., 2016. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 18988–19001. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7425-3.

Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T., Vale, J.A., 2004. Glyphosate poisoning. Toxicol. Rev. 23, 159–167. https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00003.

Connolly, A., Jones, K., Galea, K.S., Basinas, I., Kenny, L., McGowan, P., et al., 2017. Exposure assessment using human biomonitoring for glyphosate and fluroxypyr users in amenity horticulture. Int. J. Hyg. Environ. Health 220, 1064–1073. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.06.008.

Estienne, A., Fréville, M., Bourdon, G., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., et al., 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. Ecotoxicol. Environ. Saf. 241, 113741 https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113741.

Faniband, M.H., Norén, E., Littorin, M., Lindh, C.H., 2021. Human experimental exposure to glyphosate and biomonitoring of young Swedish adults. Int. J. Hyg. Environ. Health 231, 113657. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113657.

Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Chahnamian, M., Staub, C., et al., 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. Front. Physiol. 13, 974688 https://doi.org/10.3389/fphys.2022.974688.

Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M., 2018. Glyphosate toxicity for animals. Environ. Chem. Lett. 16, 401–426. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0.

Grau, D., Grau, N., Gascuel, Q., Paroissin, C., Stratonovitch, C., Lairon, D., et al., 2022. Quantifiable urine glyphosate levels detected in 99% of the French population, with

higher values in men, in younger people, and in farmers. Environ. Sci. Pollut. Res. https://doi.org/10.1007/s11356-021-18110-0.
, 2004J. Vet. Pharmacol. Ther. 27 2004 427 439 doi: 10.1111/j.1365-2885.2004.00600.x.
Kim, Y., Hong, J., Gil, H., Song, H., Hong, S., 2013. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. Toxicol. Vitr. 27, 191–197. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.09.021.
Kohsuwan, K., Intayoung, U., Khacha-ananda, S., Sapbamrer, R., Koonrungsesomboon, N., Techatoei, S., et al., 2022. Urinary glyphosate kinetics after occupational exposure. Int. J. Hyg. Environ. Health 245, 114021. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114021.
Kuan, I.H.S., Wright, D.F.B., Duffull, S.B., 2023. The influence of flip-flop in population pharmacokinetic analyses. CPT Pharmacomet. Syst. Pharmacol. 12, 285–287. https://doi.org/10.1002/psp4.12909.
Martins-Gomes, C., Silva, T.L., Andreani, T., Silva, A.M., 2022. Glyphosate vs. Glyphosate-based herbicides exposure: a review on their toxicity. J. Xenobiotics 12, 21–40. https://doi.org/10.3390/jox12010003.
Mesnage, R., Benbrook, C., Antoniou, M.N., 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. Food Chem. Toxicol. 128, 137–145. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053.
Muñoz, J.P., Bleak, T.C., Calaf, G.M., 2021. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: a review. Chemosphere 270, 128619. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619.
Prasad, M., Gatasheh, M.K., Alshuniaber, M.A., Krishnamoorthy, R., Rajagopal, P., Krishnamoorthy, K., et al., 2022. Impact of Glyphosate on the development of Insulin resistance in experimental diabetic rats: role of NFκB signalling pathways. Antioxidants 11, 2436. https://doi.org/10.3390/antiox11122436.
Roberts, D.M., Buckley, N.A., Mohamed, F., Eddleston, M., Goldstein, D.A., Mehrsheikh, A., et al., 2010. A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. Clin. Toxicol. 48, 129–136. https://doi.org/10.3109/15563650903476491.
Rueppel, M.L., Brightwell, B.B., Schaefer, J., Marvel, J.T., 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food Chem. 25, 517–528. https://doi.org/10.1021/jf60211a018.
Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J. N.S., et al., 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 1376–1380. https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376.
Serra, L., Estienne, A., Bourdon, G., Ramé, C., Chevaleyre, C., Didier, P., et al., 2021. Chronic dietary exposure of roosters to a glyphosate-based herbicide increases seminal plasma glyphosate and AMPA concentrations, alters sperm parameters, and induces metabolic disorders in the progeny. Toxics 9, 318. https://doi.org/10.3390/toxics9120318.
Van Eenennaam, A.L., Young, A.E., 2017. Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs. J. Anim. Sci. 95, 3247. https://doi.org/10.2527/jas2016.1346.
White, R.E., 2017. Role of ADME/PK in Drug Discovery, Safety Assessment, and Clinical Development. in *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier,, pp. 1–33. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12364-9.
Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. 31, 117–165. https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371.
Zhang, F., Xu, Y., Liu, X., Pan, L., Ding, E., Dou, J., et al., 2020. Concentration distribution and analysis of urinary glyphosate and its metabolites in occupationally exposed workers in Eastern China. Int. J. Environ. Res. Public. Health 17, 2943. https://doi.org/10.3390/ijerph17082943.

II. Fréville et al., 2022

Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Chahnamian, M., Staub, C., et al. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. Front. Physiol. 13, 974688. doi: 10.3389/fphys.2022.974688.

frontiers | Frontiers in Physiology

TYPE Original Research
PUBLISHED 12 September 2022
DOI 10.3389/fphys.2022.974688

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Gregory Fraley,
Purdue University, United States

REVIEWED BY
Robin Mesnage,
King's College London, United Kingdom
Ariane Zamoner,
Federal University of Santa Catarina, Brazil

*CORRESPONDENCE
Joëlle Dupont,
joelle.dupont@inrae.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Avian Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

RECEIVED 21 June 2022
ACCEPTED 22 August 2022
PUBLISHED 12 September 2022

CITATION
Fréville M, Estienne A, Ramé C, Lefort G, Chahnamian M, Staub C, Venturi E, Lemarchand J, Maximin E, Hondelatte A, Zemb O, Canlet C, Guabiraba R, Froment P and Dupont J (2022), Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. *Front. Physiol.* 13:974688. doi: 10.3389/fphys.2022.974688

COPYRIGHT
© 2022 Fréville, Estienne, Ramé, Lefort, Chahnamian, Staub, Venturi, Lemarchand, Maximin, Hondelatte, Zemb, Canlet, Guabiraba, Froment and Dupont. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens

Mathias Fréville[1], Anthony Estienne[1], Christelle Ramé[1], Gaëlle Lefort[1], Marine Chahnamian[2], Christophe Staub[3], Eric Venturi[3], Julie Lemarchand[1], Elise Maximin[4], Alice Hondelatte[5], Olivier Zemb[6], Cécile Canlet[7], Rodrigo Guabiraba[8], Pascal Froment[1] and Joëlle Dupont[1]*

[1]Centre National de La Recherche Scientifique, Institut Français du Cheval et de L'Equitation, Institut National de Recherche pour L'Agriculture, L'Alimentation et L'Environnement (INRAE), Université de Tours, Physiologie de La Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, [2]INRAE—Unité Expérimentale Pôle D'expérimentation Avicole de Tours, Nouzilly, France, [3]INRAE—Unité Expérimentale de Physiologie Animale de L'Orfrasière (UEPAO), Nouzilly, France, [4]Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France, [5]INRAE-—Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques (EASM), Surgères, France, [6]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France, [7]Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France, [8]ISP, INRAE, Université de Tours, Nouzilly, France

Glyphosate-based herbicides (GBHs) are massively used in agriculture. However, few studies have investigated the effects of glyphosate-based herbicides on avian species although they are largely exposed via their food. Here, we investigated the potential reversibility of the effects of chronic dietary exposure to glyphosate-based herbicides in broiler hens. For 42 days, we exposed 32-week-old hens to glyphosate-based herbicides via their food (47 mg/kg/day glyphosate equivalent, glyphosate-based herbicides, n = 75) corresponding to half glyphosate's no-observed-adverse-effect-level in birds. We compared their performance to that of 75 control animals (CT). Both groups (glyphosate-based herbicides and control animals) were then fed for 28 additional days without glyphosate-based herbicides exposure (Ex-glyphosate-based herbicides and Ex-control animals). Glyphosate-based herbicides temporarily increased the plasma glyphosate and AMPA (aminomethylphosphonic acid) concentrations. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid mostly accumulated in the liver and to a lesser extent in the leg muscle and abdominal adipose tissue. Glyphosate-based herbicides also temporarily increased the gizzard weight and plasma oxidative stress monitored by TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Glyphosate-based herbicides temporarily decreased the cecal

concentrations of propionate, isobutyrate and propionate but acetate and valerate were durably reduced. The cecal microbiome was also durably affected since glyphosate-based herbicides inhibited *Barnesiella* and favored *Alloprevotella*. Body weight, fattening, food intake and feeding behavior as well as plasma lipid and uric acid were unaffected by glyphosate-based herbicides. Taken together, our results show possible disturbances of the cecal microbiota associated with plasma oxidative stress and accumulation of glyphosate in metabolic tissues in response to dietary glyphosate-based herbicides exposure in broiler hens. Luckily, glyphosate-based herbicides at this concentration does not hamper growth and most of the effects on the phenotypes are reversible.

KEYWORDS

birds, glyphosate, metabolism, cecal microbiome, oxidative stress

Introduction

Glyphosate (Gly) is the most widely used herbicide in agriculture worldwide. It is a broad-spectrum herbicide with a generalized effect on all types of crops. Since it is a non-selective product, its commercialization is often coupled with that of genetically modified crops designed to resist the action of the herbicide, enabling farmers to spread increasingly large amounts on their fields without destroying their own crops (Martins-Gomes et al., 2022), while wild plants start to develop natural resistances to it. In animals and plants, Gly is metabolized into CO_2 and aminomethylphosphonic acid (AMPA) by the enzyme glyphosate oxidoreductase (Mesnage et al., 2015). Gly's herbicidal effect is due to disruption of the shikimate pathway, which produces aromatic amino acids in plants and in some microorganisms (Schönbrunn et al., 2001). Since humans and animals do not use the shikimate pathway to produce amino acids, Gly is not supposed to have any adverse effect on their health. However, several studies have shown that glyphosate-based herbicide (GBH) formulations can induce tissue damage (Jasper et al., 2012; Larsen et al., 2014), act as endocrine disruptors in various models (Walsh et al., 2000; Romano et al., 2010; Gill et al., 2018), and induce developmental issues in rats brain (Cattani et al., 2021). The use of GBHs is therefore very controversial, since scientific organizations have drawn contrasting conclusions about its dangerousness and recent studies have shown that populations are widely exposed to it (Grau et al., 2022).

Beside their controversial hypothetic effects on human health, GBHs are suspected to have ecotoxicological effects and to be part of the numerous factors leading to the current biodiversity crash. The fate of bird populations is of particular concern. European wild birds are going through a massive decline (Inger et al., 2015) and pesticides (with Gly as the prime representative) are suspected to be major actors of this loss. Gly residues are detectable in soil, water and food (Gill et al., 2018; Fogliatto et al., 2020) which allows them to threaten non-target species. Moreover, it is now established that, like for many pesticides, GBH's toxicity is enhanced by (if not conditioned to) the presence of other components such as coformulants in herbicide formulations (Bradberry et al., 2004; Kim et al., 2013; Mesnage et al., 2019). Some of them are designed to reduce leaf surface tension and thus to allow penetration of the water-soluble Gly into the plant system first, and then into its cell's membranes (Mesnage et al., 2019). It is therefore more relevant to study the toxicity of GBHs, rather than that of Gly alone. Few studies of this type have been conducted on poultry, while these animals are frequently exposed to GBHs through their diet. Most studies indeed show that GBHs administered in good farming practice conditions do not have any adverse effect on birds themselves, but rather on their foods and habitats (Gill et al., 2018). However, a recent study shows that GBHs can decrease liver catalase activity and reduce testosterone levels in Japanese quail. The gut microbiome is also disrupted, with a possible suppression of beneficial microorganisms (Ruuskanen et al., 2020). The exposure doses used in this study (12–20 mg Gly/kg body weight/day) being at least five times lower than the NOAEL (no-observed-adverse-effect level; 100 mg Gly/kg body weight/day) reported by the European Food Safety Authority (EFSA), more investigations are needed to characterize the impact of Gly and GBHs on avian models. The host gut microbiome is involved in many processes other than digestion such as xenobiotic detoxication, immune system homeostasis and vitamin synthesis (Samsel and Seneff, 2013). It has been shown that diet composition can induce changes in the gut microbiome bacterial community, and that these changes could have drastic impacts on the host's biology (metabolism, immunity, behavior etc.) (Sommer and Bäckhed, 2013). Regarding GBHs, a 2013 study demonstrated a reduction of beneficial bacteria in the gastrointestinal tract microbiome after oral administration of GBHs in poultry, while highly pathogenic bacteria were found to be resistant (Shehata et al., 2013). They could therefore induce pathogenic dysbiosis in hens' gut microbiome.

Thus, the aim of our study was to investigate the effects of a GBH-enriched diet on adult hens' metabolism and on different

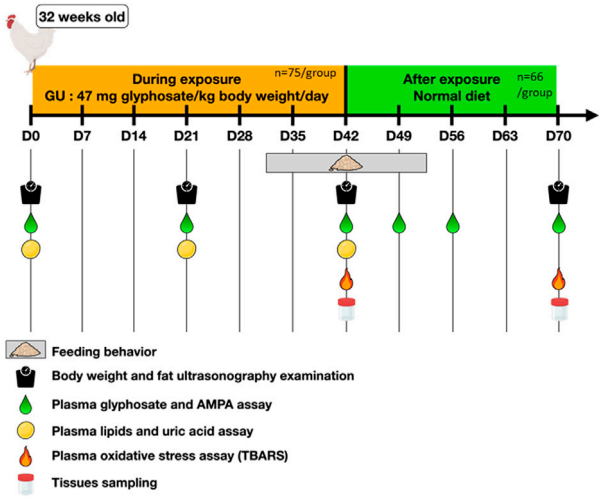


FIGURE 1
Experimental design applied to hens. Hens (32 weeks old; n = 75) were dietary exposed to GBH (Glyphosate-Based Herbicide, corresponding to a dose of 47 mg glyphosate/kg body weight/day, group named GBH) for 42 days straight, then they received a normal diet (not exposed to GBH, same diet, group named ex GBH) for the 28 following days. Their respective controls (CT, n = 75 and Ex-CT, n = 66) received a normal diet for the whole time. During these 70 days, hens were regularly weighed and ultrascanned to determine fat thickness, their feeding behavior was assayed by counting pecks at the diet and their blood was sampled for glyphosate, AMPA, lipids, uric acid and oxidative stress assays. Nine and twelve animals of both groups were euthanized at D42 and D70, respectively, for tissue sampling.

biomolecular stress markers, using a dose equivalent to 47 mg Gly/kg body weight/day, half EFSA's NOAEL, for 6 weeks. We also assessed the reversibility of the potential effects detected, by following the animals for 4 weeks after withdrawal of GBH from their diet. Meanwhile, Gly and AMPA were assayed in plasma and metabolic tissues (leg muscles, liver and abdominal adipose tissue). Detoxication processes were assayed by measuring mRNA expression of the enzymes cytochrome P450 (CYP) and GST (glutathione S-transferase) in animals' liver, which is the main tissue of biotransformation. We also studied the impact of this diet on gut microbiome composition and diversity. To our knowledge, it is the first study evaluating the potential reversibility of changes in metabolism-related parameters after chronic dietary exposure to a GBH in broiler hens.

Materials and methods

Ethical issues

All experimental procedures were performed in accordance with the French National Guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals APAFIS number 21549–2019071809504554v3, approval date: 6 November 2021, Ministry of Agriculture and Fish Products, and a notice of the ethics committee of Val de Loire No. 19).

Animals

All animals (150 female chicks of the commercial breed ROSS 308) were obtained at 1 day of age from a local hatchery (Boye Accouvage La Villonniere 79,310 La Boissière en Gatine, France) and reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) according to traditional breeding conditions. In our experiment, all 150 hens (32 weeks old) were used. They were divided into groups of five birds in 30 pens, each pen with an area of 3 m^2. The design of the experiment is summarized in Figure 1. The timeline is represented in days. Seventy-five hens (15 pens) were exposed for 42 days to GBH via their food (GBH hens, a GBH dose equivalent to 47 mg Gly/kg body weight/day), and 75 hens (15 pens) were fed with a regular diet without GBH (control animals, CT) (day 0 to day 42 of the protocol). After that, all animals were fed with a regular diet (day 43 to day 70 of the protocol, Ex-GBH and Ex-CT hens). During this protocol, blood samples were collected from hens to quantify Gly and its metabolite AMPA within their blood plasma. At day 42, exposure to GBH was stopped, and nine CT hens and nine GBH hens were slaughtered to recover biological samples. At day 70, 12 Ex-CT hens and 12 Ex-GBH hens were slaughtered to recover biological samples. All animals were killed by electrical stunning and bled out, as recommended by the ethical committee.

Diet composition

Hens (32 weeks old) received a restricted laying diet according to Hendrix Genetics recommendation. The composition of the diet is shown in Supplemental Table 1. For the GBH animals, this diet was mixed with Gallup super 360 in our laboratory in accordance with the directives of the Directions Départementales de la Protection des Populations (Departmental Directorate for the Protection of Populations). Mixing was carried out by a technician with "Certiphyto" certification for the handling of phytosanitary products, as recommended by French law. Gallup super 360, named GBH within the text, was obtained from Axereal (Monnaie, France); it contained 360 g/L Gly (485.8 g/L isopropylamine salt). Animals were fed with either feed containing GBH (n = 75) or control feed (n = 75) from the first week of the protocol to week 6 (Figure 1). The control feed contained low measurable Gly and AMPA concentrations (0.21 mg/kg feed for Gly and undetectable levels for AMPA as determined by Phytocontrol, Nimes,

France). The GBH feed contained 1,250 mg/kg feed of Gly and 0.30 mg/kg feed of AMPA, as determined by Phytocontrol. Hens were food-restricted as recommended by the provider, and their food consumption was 200 g/day. Thus, the concentration in the feed corresponded to a dose of 47 mg Gly equivalent/kg body weight/day. From day 43 to day 70, all hens were fed with control feed (Ex-GBH n = 63 and Ex-CT n = 63).

Count of pecks at the diet

Feeding behavior was quantified by counting pecks at the diet over the daily diet distribution. This count was carried out in three hens per pen during the 8 secondes on D31, D32, D35, D36 (during GBH exposure) and D49, D50, D51 and D52 (after exposure).

Biological samples

Blood samples from 10 hens were collected from the occipital sinus into heparin tubes on different days during the experiment (days 0, 21 and 42 during GBH exposure and days 49, 56 and 70 after exposure). Blood samples were centrifuged (5,000 × *g* for 10 min at 4°C) and stored at −20°C before use for Gly and AMPA assays (Phytocontrol, Nimes, France). Tissue samples were obtained at different points in the experiment [day 42 of the protocol during GBH exposure (n = 9 GBH and n = 9 CT) and day 70 after GBH exposure (n = 12 Ex-GBH and n = 12 Ex-CT)] by dissection after slaughtering.

Gly and aminomethylphosphonic acid assays in hen plasma

Gly and AMPA concentrations were measured in the blood plasma of hens after a derivatization reaction using FMOC-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate), in collaboration with Dr S El Balkhi (Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Limoges, France) as previously described (Serra et al., 2021).

Lipid and uric acid assays in hen plasma

Plasma concentrations of triglycerides, uric acid, phospholipids and cholesterol were determined by enzymatic assay using specific kits from Biolabo SAS (Maizy, France): triglycerides (reference: LP80519), uric acid (reference: 80,351), phospholipids (reference: 99,105) and cholesterol (reference: 80,106, Biolabo SAS, Maizy, France). The measurements were performed according to the manufacturer's protocol. For all these assays, the inter- and intra-assay coefficient variations were <15%.

Body weight gain and measurement of tissue index

Chickens were individually weighed on days 0, 21, 42 and 70. Body weight was recorded and, based on the differences, the body weight gain per day was calculated [(final body weight − initial body weight)/number of days)] for each period D0–D21, D21–D42 and D42–D70 (Figure 1). The weight of organs (liver, spleen, heart, kidney, brain, gizzard) and abdominal adipose tissue (AAT) collected on the 42nd and 70th days of the protocol was determined and the weight of the organs or AAT as a percentage of the body weight was calculated and an organ/tissues index was shown as described by Pandey et al. (2019).

Plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

Lipid peroxidation, as determined through measuring the amount of MDA (malondialdehyde) that reacts with 2-thiobarbituric acid, was used to estimate oxidative stress (Armstrong and Browne, 1994). Blood samples were collected into EDTA-treated tubes, then gently shaken and kept and handled on wet ice. The plasma was separated by centrifuging the blood samples at 1,000 × *g* for 10 min at 4°C, then transferred to 1.5 ml microcentrifuge tubes and stored at −80°C. The TBARS values of the EDTA-treated plasma were measured using the modified method of Grotto et al. (2007). A standard curve for 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used, and the concentration was expressed as nmol MDA/mL solution.

Measurement of liver ATP concentration

Liver total proteins from 9 CT, 9 GBH, 12 Ex-CT and Ex-12 GBH hens were extracted using lysis buffer (1 M Tris (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, 43–23 mM VO, 0.1 M NaF, 1% NH_2PO_4, 0.5% Triton) and an Ultra-Turrax instrument for grinding, according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Lysates were centrifuged for 20 min at 16,000 × *g* and 4°C, and the supernatants collected. Lysate protein concentrations were then measured using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Interchim, Montluçon, France). The ATP assay was performed using a Promega CellTiter® Luminescent Cell Viability Assay. Briefly, the assay buffer and the substrate were equilibrated to room temperature, then the buffer was transferred to the substrate and

10.3389/fphys.2022.974688

TABLE 1 Oligonucleotide primer sequences used for RT-qPCR.

Tissue	Gene	Primer F	Primer R	References
	GAPDH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGATCTCGC	Grandhaye et al. (2021)
	EEF1α	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TCACATGAGACAGACGGTTGC	
	β-actin	ACGGAACCACAGTTTATCATC	GTCCCAGTCTTCAACTATACC	
Liver	*CYP1A1*	AATGCTCGTTTCAGTGCCTTC	CCTCCCCTGTCCTTTTCTCC	Cong et al. (2019)
	CYP1A2	AACCCAGAGCGTTTCCTCAA	CTCCCACTTGCCTATGTTTTCC	
	CYP2C	CAAAATGGAACAGGAGAAAGAGAAC	CCCGCAAGGAACAAGTCAA	
	CYP3A	CCAAGCTATGCTCTTCACCG	TCAGGCTCCACTTACGGTCT	
	CYP2A6	CTGCAGAGAATGGCATGAAG	CCTGCAAGACTGCAAGGAA	Wang et al. (2018)
	EPHX1	GAAGATGTCAGGCGGATGTT	CAGGAGAGTCATTCAAACCACA	
	GSTA3	AGACCAGAGCCATCCTCAAC	TGCCAGTCCTTCCACATACA	
	GSTA4	GCTACATCGCAGGGAAATACA	TGGAGAGAAAGGAAACACCAA	
	FXR	AAAGCCGTTCTGTGCGTT	GGATTGGTGGGGTTCCTG	Dai et al. (2020)
	CYP3A37	AAATCAGACAGCAATGGGAGC	GGTAAGCCAGGTAACCAAGTGT	
	BSEP	TGCAAAGCAAAGGAGACT	GCAATGGATAATGGAGGG	
	CYP1A5	CTCTGCTCTGTTCDCAAAGCGTCTC	GCTCGCCTGCDCACCDCATCDCACT	
	CYP1A4	CDCAGGACGGAGGCTGACDCAAGG	GCDCAGGATGGTGGTGAGGAAGA	
	Ces1	TGACCATTCAATATCGCC	ACACTTTCTCCTCCCGCT	
	SLC O 1B3	CAGGACTCTCGCTGGGTGG	TGGCTTTCAGGGGCTTTTT	
	CYP2H1	TCATCCACGAAATCCAAAG	GATGGGAGACAGCAAAGG	
	CYP2H2	GGCCCGGATGGAGCTATT	TTGCCGCCGAGGTGACTA	
Gizzard	*Hsp27*	ACACGAGGAGAAACAGGATGAG	ACTGGATGGCTGGCTTGG	Zhao et al. (2016)
	Hsp40	GGGCATTCAACAGCATAGA	TTCACATCCCCAAGTTTAGG	
	Hsp60	AGCCAAAGGGCAGAAATG	TACAGCAACAACCTGAAGACC	
	Hsp70	CGGGCAAGTTTGACCTAA	TTGGCTCCCACCCTATCTCT	
	Hsp90	TCCTGTCCTGGCTTTAGTTT	AGGTGGCATCTCCTCGGT	
	NF-κB	TCAACGCAGGACCTAAAGACAT	GCAGATAGCCAAGTTCAGGATG	Xing et al. (2015)
	iNOS	CCTGGAGGTCCTGGAAGAGT	CCTGGGTTTCAGAAGTGGC	
	COX-2	TGTCCTTTCACTGCTTTCCAT	TTCCATTGCTGTGTTTGAGGT	
	PTGES	GTTCCTGTCATTCGCCTTCTAC	CGCATCCTCTGGGTTAGCA	
	TNF-α	GCCCTTCCTGTAACCAGATG	ACACGACAGCCAAGTCAACG	
Proventriculus	*PGA5*	TCCGTCTACCTGAGCAAGGAT	AAGCAGGCGACGTACTTGTT	Al-Khalaifah et al. (2020)
	PGC	ATCGGGATTGAGGACTTCGC	TGAAGACCTGGTTGGGAACG	
Caecum	*Chemerin*	CGCGTGGTGAAGGATGTG	CGACTGCTCCCTAAAGAGGAACT	Estienne et al. (2020)
	CMKLR1	CGGTCAACGCCATTTGGT	GGGTAGGAAGATGTTGAAGGAA	
	IgA	GTCACCGTCACCTGGACTACA	ACCGATGGTCTCCTTCACATC	Grandhaye et al. (2020)
	IFNα	CAACGACACCATCCTGGACA	GGGCTGCTGAGGATTTTGAA	Garrido et al. (2018)
	IFNβ	TCCTGCAACCATCTTCGTCA	CACGTCTTGTTGTGGGCAAG	
	IL-1β	AGGCTCAACATTGCGCTGTA	CTTGTAGCCCTTGATGCCCA	Grandhaye et al. (2020)
	IL-6	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA	Garrido et al. (2018)
	IL-8	CTGCGGTGCCAGTGCATTAG	AGCACACCTCTCTTCCATCC	
Spleen	*IFNα*	CAACGACACCATCCTGGACA	GGGCTGCTGAGGATTTTGAA	Garrido et al. (2018)
	IFNβ	TCCTGCAACCATCTTCGTCA	CACGTCTTGTTGTGGGCAAG	
	IL-1β	AGGCTCAACATTGCGCTGTA	CTTGTAGCCCTTGATGCCCA	Grandhaye et al. (2020)
	IL-8	CTGCGGTGCCAGTGCATTAG	AGCACACCTCTCTTCCATCC	Garrido et al. (2018)
	IL-22	TGTTGTTGCTGTTTCCCTCTTC	CACCCCTGTCCCTTTTGGA	

gently mixed with it to obtain a homogeneous solution. After a 30 min equilibration of the cell plate to room temperature, protein lysates (100 µL) were put into a 96-well plate and CellTiter-Glo reagent (100 µL) was added to each well. The plate was orbitally mixed for 2 min and incubated at room temperature for 10 min. The ATP concentration was then measured using a luminometer. Luminescence at the integration time 1,000 (ms) was read using an Ascent Luminoskan Luminometer (Thermo Scientific, Illkirch, France). Lysates' ATP concentration was normalized with the previously determined total protein concentration.

Measurement of the gene expression in tissues

Total RNA from 9 CT, 9 GBH, 12 Ex-CT and 12 Ex-GBH hens was extracted from hens' liver, gizzard, proventriculus, cecum and spleen using TRIzol RNA Isolation Reagents and an Ultra-Turrax instrument for grinding, according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). The purity and concentrations of the obtained RNA were checked via their A260/A280 ratios using a Nanodrop machine. cDNA was obtained by reverse transcription of 2 µg of the total RNA in 20 µL of a mix containing each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 0.5 mM), 2 M RT Buffer, 15 µg/µL oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV); the mixture was kept for 1 h at 37°C. Quantitative PCR was performed using a mix of 3 µL of cDNA and 8 µL of SYBR Green Supermix 1X Reagent (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with 250 nM of specific primers (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) given in Table 1. Samples were set up in duplicate in a 384-well plate and a MyiQ Cycle Device (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used to apply the following procedure: incubation (2 min at 50°C), denaturation (10 min at 95°C) and 40 PCR cycles (30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C). Relative expression of genes was related to the geometric mean of the expression of three reference genes (*GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *ACTB* (*actin B*) and *EEF1α* (*eukaryotic elongation factor 1 alpha*)). For each target gene, expression was calculated according to primer efficiency (E) and quantification cycle (Cq), where expression = E − Cq. Then, relative expression of the target gene to the three reference genes was analyzed.

Nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics

^{1}H NMR spectra for the metabolic fingerprinting of plasma samples were obtained at 300 K on a Bruker Avance III HD 600 MHz NMR spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) operating at 600.13 MHz for ^{1}H resonance frequency using an inverse detection 5 mm ^{1}H-^{13}C-^{15}N-31P cryoprobe attached to a cryoplatform (the pre-amplifier cooling unit). Plasma samples were prepared, and the analyses performed as previously described (Chamorro-García et al., 2021), with slight modifications. For all spectra, a total of 128 transients were collected into 65,536 data points using a spectral width of 20 ppm, a relaxation delay of 5 s and an acquisition time of 2.72 s. All free induction decays were then multiplied by an exponential function with a line broadening factor of 0.3 Hz prior to Fourier transform. All spectra were manually phase- and baseline-corrected, and referenced to the chemical shift of glucose (δ 5.24 ppm).

Analysis of short-chain fatty acids (SCFAs) in cecal samples

Approximately 35 mg of cecal content was weighed, snap-frozen and stored at −80°C until analysis. The samples were extracted with water and proteins precipitated with phosphotungstic acid. 2-Ethylbutyrate was added to supernatants at a ratio of 1: 4 as an internal standard. The SCFA content was determined from a 0.3 µL volume of supernatant by gas chromatography (Agilent 7890B gas chromatograph, Agilent Technologies, Les Ulis, France) equipped with a split-splitless injector, a flame-ionization detector and a fused silica capillary column (15 m × 0.53 mm × 0.5 µm; Supelco, Saint-Quentin-Fallavier, France). The carrier gas (H_2) flow rate was 10 ml/min. The oven temperature was initially set at 100°C for 10 min, then increased from 100 to 180°C at a rate of 20 C/min and held for 2 min. The detector temperature was 240°C. Samples were analyzed in duplicate. The peaks obtained were integrated using OpenLAB Chemstation software (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

Microbiome analysis

DNA from bacteria was extracted from cecal content [CT (n = 5), GBH (n = 9), Ex-GBH (n = 10), Ex-CT (n = 5)] using a G'NOME DNA isolation kit (MP Biomedicals, Strasbourg, France) (Furet et al., 2009). The V3–V4 region of the 16S rRNA genes was amplified using MolTaq (Molzym, Plaisir, France), 50 ng DNA and the primers V3F: TACGGRAGGCAGCAG and V4R: ATCTTACCAGGGTAT CTAATCCT (Kozich et al., 2013). Purified amplicons were sequenced using MiSeq sequencing technology (Illumina) on the GeT-PLaGe platform (Toulouse, France). The sequences were submitted to the Short-Read Archive with accession number PRJNA741111. Paired-end reads obtained from

10.3389/fphys.2022.974688

MiSeq sequencing were analyzed using the Galaxy-supported pipeline named FROGS (Find, Rapidly, OTUs (Operational Taxonomic Units) with Galaxy Solution) (Escudié et al., 2018). For the preprocessing, reads with a length ≥380 bp were kept. The clustering and chimera removal tools followed the guidelines of FROGS (Escudié et al., 2018). Assignation was performed using SILVA138 16S pintail100. OTUs with abundance lower than 0.005% were removed from the analysis (Bokulich et al., 2013).

Statistical analysis

GraphPad Prism® software (version 6) was used for all analyses (except for microbiome and NMR metabolomic analysis). All data are reported as means ± standard error of mean (SEM). Outliers were identified by the Rout method and removed. We performed t-tests to compare means at D42 and D70, or two-way ANOVA followed by Tukey's HSD tests. Regarding gut microbiome analysis, all statistical analyses were performed using R software (version 4.2.0; R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.). The microbiota composition analysis was performed using the mia package (Ernst et al., 2022). For the variability within bacterial communities (α diversity), Chao, Shannon and Faith indices were computed. The effect of exposure to GBH on α diversity was investigated using Kruskal–Wallis tests followed by Dunn's post-hoc tests and was considered significant if $p < 0.05$. For the differences between bacterial communities (β diversity), the Bray–Curtis matrix and Unifrac distance were computed and then visualized with non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots.

For the differential analysis, OTUs with a prevalence below 0.05% were filtered out as well as those with a low number of reads (OTUs with sum counts of less than 0.05% of the sum of all counts). Then, OTU counts were agglomerated at the genus level and relative abundances were computed at each taxonomic level. As recommended by Nearing et al. (2022), three differential analysis methods were used (ALDEx2 (ANOVA-like differential expression 2) (Fernandes et al., 2014), ANCOM-BC (analysis of compositions of microbiomes with bias correction (Lin and Peddada, 2020) and DESeq2 (differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution (Love et al., 2014)) and we focused on the common results. All p-values were adjusted with the Benjamini–Hochberg correction. A difference is significant if the adjusted p-value is below 0.05 and if the size effect is above 1 for ALDEx2 or if the logFC (log fold change) is above 2 for DESeq2. Finally, sparse partial least-squares discriminant analysis (sPLS-DA) was computed on the centered log ratio (CLR)-transformed data using the mixOmics package (Lê Cao et al., 2016; Rohart et al., 2017). The choice of optimal values for the sparsity parameters and the evaluation of classification was performed using a 5-fold cross-validation and 100 repeats.

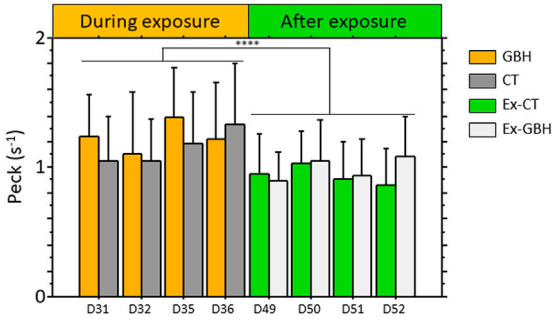


FIGURE 2
Frequency of pecks for feeding made by control hens (CT, n = 45) and those exposed to GBH (GBH, n = 45) at the manger during (D31, D32, D35 and D36) and after (D49, D50, D51 and D52; Ex-CT, n = 45; Ex-GBH, n = 45) GBH exposure. Results are presented as means ± SEM. ****p ≤ 0.0001 CT: Control, GBH: Glyphosate-Based Herbicide, Ex-CT: Ex-Control, Ex-GBH.

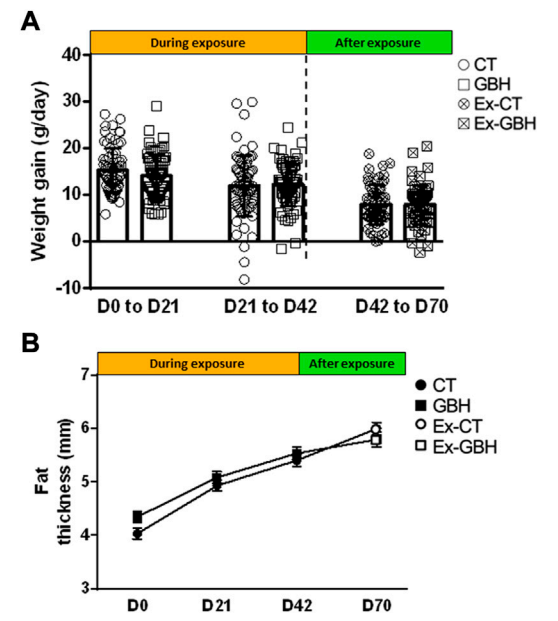


FIGURE 3
Body weight gained **(A)** and fat thickness **(B)** during dietary GBH exposure (D0 to D42; CT, n = 75; GBH, n = 75) and after (D42 to D70; Ex-CT, n = 66; Ex-GBH, n = 66) dietary GBH exposure. Results are presented as means ± SEM **(A)** and as means **(B)**. CT: Control, GBH: Glyphosate-Based Herbicide, Ex-CT: Ex-Control, Ex-GBH.

10.3389/fphys.2022.974688

TABLE 2 Hens organ index [Tissue weight (g)×100)/(Body weight (g)] in GBH exposed and control animals during the period of exposure (42nd day of protocol, D42, CT n = 9, GBH n = 9) and after GBH exposure (70th day of protocol, D70, Ex-CT, n = 12, Ex-GBH, n = 12).

	D42		*p* Value	D70		*p* Value
	CT	GBH		Ex-CT	Ex-GBH	
Liver	1.59	1.68	0.502	1.65	1.64	0.930
Spleen	0.069	0.062	0.318	0.059	0.075*	0.015
Heart	0.360	0.336	0.367	0.359	0.375	0.427
AAT	2.04	2.12	0.734	2.30	2.42	0.148
Kidney	0.154	0.151	0.902	0.377	0.324	0.064
Brain	0.092	0.097	0.097	0.091	0.088	0.667
Gizzard	0.737	0.888***	0.0003	0.812	0.842	0.408

CT, control; *GBH, Ex-CT, Ex-Control; Ex-GBH, animals that have been GBH, exposed for 42 days then non-exposed until D70*, Ex-*AAT*, abdominal adipose tissue, Index = (Tissue weight (g)×100)/(Body weight (g)). Results are presented as means. *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$, ****$p \leq 0.0001$. *CT, control; GBH, Ex-CT, Ex-Control, Ex-GBH.*

All analyses were first performed considering all four groups (CT, GBH, Ex-CT and Ex-GBH) separately. Because no significant difference was detected between CT and Ex-CT groups, they were combined and renamed CT + Ex-CT for the microbiome analysis.

Results

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure did not change chickens' feeding behavior

One parameter of the hens' feeding behavior was estimated by counting the number of times hens pecked at the diet during and after GBH exposure. As shown in Figure 2, no significant difference was detected between GBH and CT hens and between Ex-GBH and Ex-CT hens. All hens made significantly fewer pecks at the diet after exposure than during GBH exposure ($p < 0.001$).

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure did not affect chickens' weight gain but increased gizzard weight

Weight gain determined at D0–D21, D21–D42 and D42–D70 is presented in Figure 3A. No significant difference was detected, either during (GBH vs. CT hens) or after GBH exposure (Ex-GBH vs. Ex-CT animals). In addition, no significant effect of GBH on chickens' fat thickness was detected, either during or after GBH exposure (Figure 3B). Liver, spleen, heart, abdominal adipose tissue (AAT), kidney, brain and gizzard indices are presented in Table 2. During GBH exposure (D42), no significant effect was detected except for gizzards, which were significantly heavier in GBH as compared to CT hens ($p < 0.05$). Furthermore, after exposure (D70), spleens and kidneys were heavier and lighter ($p < 0.05$), respectively, in Ex-GBH hens compared to Ex-CT hens.

Gly and aminomethylphosphonic acid accumulated in plasma and tissues after chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure in chickens

Plasma Gly and AMPA concentrations were assayed during GBH exposure and normal diet. The results are presented in Table 3. Plasma Gly and AMPA concentrations reached a peak between D0 and D21 before progressively decreasing to values approximatively twice as low at D42 (1.7- and 1.9-fold decrease, respectively) in GBH animals. Concentrations continued to decrease after GBH exposure. Gly and AMPA accumulations in tissues are presented in Figure 4. Both molecules were found in liver (Gly: 8.10 mg/kg and AMPA: 2.40 mg/kg), AAT (Gly: 2.00 mg/kg and AMPA: 0.13 mg/kg) and leg muscle (Gly: 0.86 mg/kg and AMPA: 0.09 mg/kg) in GBH hens at D42 and were observed in smaller amounts in Ex-GBH at D70 (after GBH exposure): 3.11 and 0.74 mg/kg, 0.80 and 0.04 mg/kg and 0.09 and 0.07 mg/kg in liver, AAT and leg muscle, respectively. In CT and Ex-CT animals, Gly and AMPA were almost undetectable in the three tissues at D42 and D70.

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure reversibly increased plasma oxidative stress in chickens

Plasma oxidative stress was measured using the TBARS index, which quantifies the MDA concentration in plasma. The results are presented in Figure 5. At D42, the TBARS index was significantly ($p < 0.05$) higher in GBH hens than in CT hens. No significant difference was observed between Ex-GBH and Ex-CT hens after GBH exposure at D70.

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure did not modulate plasma lipids and uric acid concentrations

Plasma triglyceride, cholesterol, phospholipid and uric acid concentrations were assayed at D0, D21 and D44 (Supplemental Figure S1A–D). No significant effect of GBH exposure on any of these parameters was detected.

10.3389/fphys.2022.974688

TABLE 3 Glyphosate and AMPA concentrations in hen's plasma during (n = 10) and after (n = 10) the dietary GBH exposure period.

	Time (day)	(Glyphosate] (ng/ml)	(AMPA] (ng/ml)
During exposure	D0	5.37 ± 0.60^{a}	0 ± 0^{a}
	D21	1,549.02 ± 89.37^{d}	19.82 ± 1.75^{d}
	D42	910.59 ± 117.29^{c}	10.15 ± 0.61^{c}
After exposure	D49	297.54 ± 7.96^{b}	6.24 ± 0.26^{b}
	D56	160.99 ± 9.12^{ab}	4.45 ± 1.03^{ab}
	D70	67.21 ± 6.87^{ab}	1.59 ± 0.52^{a}

Results are presented as means ± SEM; letters indicate significant differences detected by Two-way ANOVA, and Tukey HSD's test for pair-wise comparisons ($p < 0.05$).

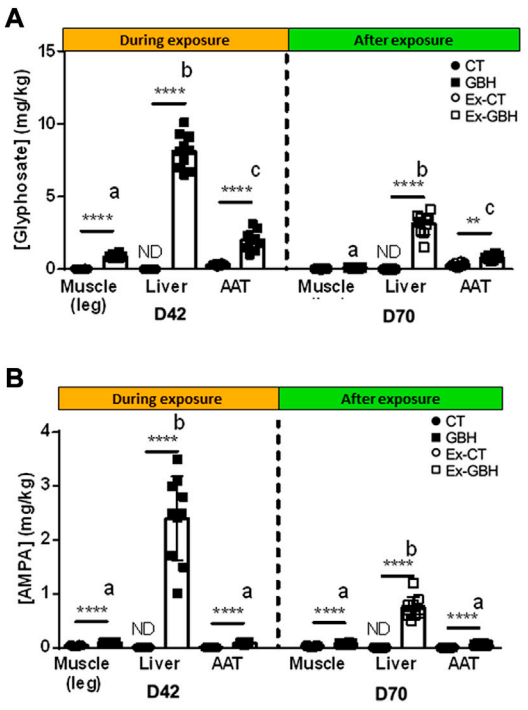


FIGURE 4
Glyphosate **(A)** and AMPA **(B)** concentrations in hens' leg muscles, liver and abdominal adipose tissue (AAT) during (D42) and after (D70) GBH exposure. Results are presented as means ± SEM. p-values express mean differences between CT (n = 10) and GBH (n = 10) groups, and Ex-CT (n = 10) and Ex-GBH (n = 10); **p ≤ 0.01, ****p ≤ 0.0001; letters indicate significant differences detected by two-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by Tukey's HSD test for comparing mean tissue concentrations at D42 and D70 separately. CT: control, GBH: Glyphosate-Based Herbicide, Ex-CT: Ex-Control, Ex-GBH.

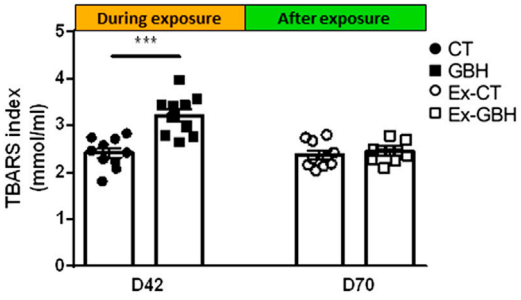


FIGURE 5
TBARS index in hens' plasma during (D42; CT, n = 10 and GBH, n = 10) and after (D70; Ex-CT, n = 10 and Ex-GBH, n = 10) GBH exposure. Results are presented as means ± SEM. ***p ≤ 0.001. CT: Control, GBH: Glyphosate-Based Herbicide, Ex-CT: Ex-Control, Ex-GBH.

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure did not trigger biotransformation enzyme transcription in liver but enhanced IgA transcript levels in chickens

The mRNA expression of liver biotransformation enzymes was measured by RT-qPCR. The results are presented in Table 4.

No significant effect was detected on any of the transcripts of which we measured the level, either during exposure (CT vs. GBH hens) or after exposure (Ex-CT vs. Ex-GBH). In the cecum, expression of the immunoglobulin A gene (*IgA*) was significantly ($p < 0.05$) enhanced by GBH treatment after exposure in Ex-GBH hens as compared to Ex-CT hens whereas no significant effect was detected during exposure (CT vs. GBH hens). We next determined the expression levels of genes involved in the inflammatory and immune responses. No significant effect was detected for *chemerin*, *CMKLR1*, *IFNα*, *IFNβ*, *IL-1β*, *IL-6* and *IL-8* (Table 4). mRNA expression of stress-related genes in the gizzard was also measured and is shown in Table 4 *iNOS* expression was significantly ($p < 0.05$) higher in the Ex-GBH group than in the Ex-CT group after exposure and that of *HSP70* was significantly ($p < 0.05$) higher in the Ex-CT group than in the Ex-GBH group after exposure. No significant effect on any of these genes was detected during exposure (CT vs. GBH hens). No significant effect on the mRNA expression of some digestive genes (*PGA5* and *PGC*) was detected in the proventriculus (Table 4). The TNF-γ protein concentration in hens' plasma was assayed and the results are presented in Supplemental Figure 2A. No significant effect of GBH exposure was detected, either at D42 or D70.

10.3389/fphys.2022.974688

TABLE 4 Relative mRNA expression of various genes in hen's organs at the end of GBH exposure (D42, CT, n = 9 and GBH, n = 9) hens) and after dietary GBH exposure (D70, Ex-CT, n = 12 and Ex-GBH, n = 12 hens).

Organ		D42			D70		
		CT	GBH	*p*.value	Ex-CT	Ex-GBH	*p*.value
Liver	*CYP1A2*	10.47	8.74	0.578	16.42	12.31	0.210
	CYP1A4	0.110	0.130	0.598	0.170	0.190	0.835
	CYP2A6	20.0	18.4	0.696	15.1	16.28	0.741
	CYP2C	11.4	9.86	0.498	12.4	11.40	0.793
	CYP3A37	6.87	6.78	0.956	5.11	5.16	0.966
	CYP3A4	0.300	0.35	0.401	0.35	0.310	0.425
	CYP3A80	0.460	0.42	0.681	1.98	0.740*	0.027
	CYP2H1	22.8	22.0	0.854	16.7	18.4	0.661
	CYP2H2	13.0	13.44	0.905	10.2	12.4	0.432
	GSTA3	3.10	2.92	0.700	5.65	3.86	0.200
	GSTA4	4.71	3.50	0.054	4.43	4.32	0.861
	EPHX1	0.500	0.45	0.541	0.40	0.44	0.763
	FXR	0.760	0.78	0.881	1.49	1.24	0.461
	SL O 1B3	0.710	0.71	0.972	0.71	0.77	0.759
Gizzard	*COX2*	0.201	0.132	0.188	0.188	0.142	0.194
	HSP27	39.9	33.8	0.637	64.1	53.4	0.360
	HSP40	94.1	93.1	0.835	91.3	93.3	0.582
	HSP60	0.533	0.361	0.113	0.707	0.628	0.310
	HSP70	3.18	2.48	0.443	4.31	2.29*	0.015
	HSP90	2.24	1.49	0.249	1.87	1.55	0.544
	iNOS	0.028	0.022	0.412	0.023	0.042**	0.003
	NFκB	0.079	0.059	0.417	0.104	0.099	0.760
	PTGES	0.087	0.054	0.168	0.074	0.055	0.245
	TNFa	0.036	0.029	0.154	0.023	0.033	0.052
Proventriculus	*PGA5*	32,266	38,158	0.330	26,653	27,223	0.899
	PGC	5,916	7,495	0.114	6,874	6,838	0.971
Caecum	*Chemerin*	0.336	0.337	0.986	0.272	0.257	0.731
	CMKLR1	0.017	0.017	0.984	0.065	0.048	0.301
	IgA	12.3	8.49	0.364	4.46	6.70*	0.041
	IFNα	0.071	0.086	0.620	0.434	0.290	0.230
	IFNβ	0.002	0.005	0.179	0.024	0.011	0.100
	*IL-1*β	0.013	0.007	0.095	0.020	0.016	0.338
	IL-6	0.001	0.001	0.895	0.004	0.002	0.077
	IL-8	0.040	0.025	0.185	0.049	0.032	0.242
Spleen	*IFNα*	0.031	0.025	0.607	0.112	0.061	0.108
	IFNβ	3.50	2.18	0.301	7.90	6.00	0.414
	*IL-1*β	0.006	0.004	0.182	0.010	0.014	0.279
	IL-8	0.076	0.075	0.964	0.065	0.038*	0.036
	IL-22	0.035	0.021	0.273	0.093	0.024**	0.003

Results are presented as mean of the pltarget gene mRNA, expression relative to the geometric mean of three housekeeping genes expression (*GAPDH, EEF1α* and *β-actin*); *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$, ****$p \leq 0.0001$. *CT, control; GBH, Ex-CT, Ex-Control, Ex-GBH* .

10.3389/fphys.2022.974688

TABLE 5 Significant plasma metabolites identified in GBH dietary exposed (GBH, n = 10) as compared to control hens (CT, n = 10) at day 42 (D42).

Metabolites	FC	Pvalue
Glycerol	1.05	0.024
Glycine	0.941	0.045
Isoleucine	1.11	0.025
Leucine	0.926	0.024
Lysine	1.53	0.028
Methionine	1.18	0.028
Tyrosine	1.42	0.049

FC (Fold Change) = GBH/CT (*CT*, control, *GBH*). Results are presented as means.

Chronic dietary glyphosate-based herbicide modified the plasma concentration of glycerol and six amino acids

Metabolites whose concentrations in hens' plasma were significantly affected by GBH exposure are mentioned in Table 5. Plasma glycerol, isoleucine, lysine, methionine and tyrosine concentrations were significantly increased ($p < 0.05$), while plasma glycine and leucine concentrations were significantly reduced in GBH as compared to CT animals ($p < 0.05$).

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure changed SCFA concentrations in chickens' cecum

Cecal contents were subjected to gas chromatography to measure the cecal SCFA concentration. SCFAs in hens' cecum were assayed and the results are shown in Table 6. Cecal acetate, propionate, isobutyrate, isovalerate and valerate concentrations were significantly ($p < 0.05$) reduced during exposure in GBH as compared to control animals (CT). All of them were restored in Ex-GBH chickens' cecum after GBH exposure, as compared to their respective controls (Ex-CT), except for acetate and valerate, which were still significantly ($p < 0.05$) reduced.

Chronic dietary glyphosate-based herbicide exposure increased gut microbiome diversity

GBH durably changed the composition of the microbiota, which was not completely resilient (Figures 6A,B). Surprisingly, GBH increased the diversity of the microbiota in a delayed manner. Indeed, the diversity indices (Chao, Shannon and Faith indices) became different at the final time point even though they were similar at the end of the GBH exposure (Figures 6C–E). The delayed impact of GBH was reflected in eight individual taxa that were different from the control at the end of the experiment but not just after the GBH exposure (Figure 7). For example, the Bacteroidales F082 family was not immediately affected by GBH administration but was significantly enhanced in the Ex-GBH group. Similarly, the *Synergistes* (family Synergistaceae) were favored by GBH at the final time point only. The other groups that showed a delayed impact were: *Akkermansia* (family Akkermansiaceae), *DTU089* (family Clostridiaceae), *Paraprevotella* (family *Paraprevotella*), *S50* (family Rikenellaceae) and *Treponema* (family Treponemataceae). Perhaps unsurprisingly, nine taxa were immediately impacted by GBH: the amounts of Muribaculaceae family, *Alloprevotella* (family Prevotellaceae), Porphyromonadaceae and *Candidatus Vestibaculum* were significantly higher after exposure in

TABLE 6 Short-chain fatty acid concentration in cecal content (µmol/g) during dietary GBH (GBH, D42, n = 8) exposure in control (CT, n = 8) and after dietary GBH exposure (Ex-CT, D70, n = 12 and Ex-GBH, n = 11 hens).

	D42			D70		
	CT	GBH	*p*.value	Ex-CT	Ex-GBH	*p*.value
Acetate	28.0	18.0**	0.009	25.8	16.6*	0.022
Propionate	8.36	5.43*	0.022	8.02	5.63	0.126
Isobutyrate	0.770	0.510**	0.004	0.730	0.59	0.194
Butyrate	2.08	1.64	0.293	1.85	1.30	0.166
Isovalerate	0.530	0.389*	0.041	0.510	0.450	0.377
Valerate	0.710	0.516*	0.044	0.620	0.390*	0.033
Caproate	0.000	0.000		0.020	0.000	0.068
Total isoAGCC	1.30	0.900**	0.006	1.24	1.04	0.233
Total AGCC	41.5	26.4*	0.015	38.0	25.2*	0.045

Results are presented as means; *$p \leq 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$, ****$p \leq 0.0001$. *CT, control; GBH, Ex-CT, Ex-Control, Ex-GBH.*

10.3389/fphys.2022.974688

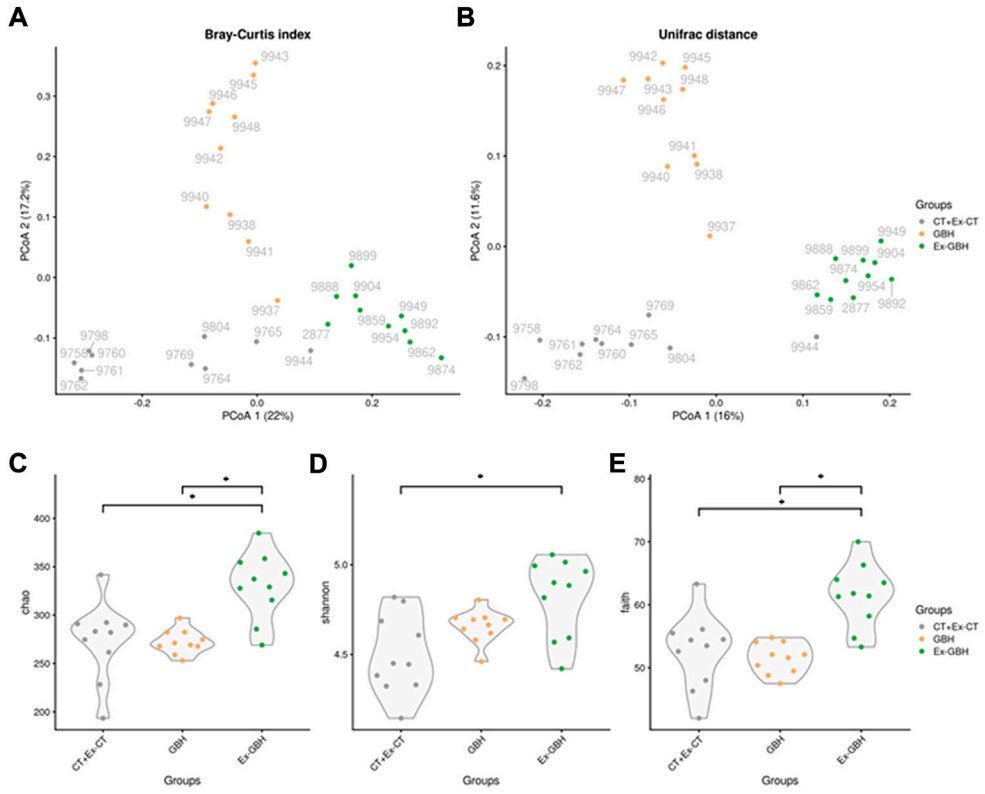


FIGURE 6
Microbiome β-diversity in cecal content of hens exposed to GBH for 42 days (GBH, n = 9), then non-exposed until D70 (Ex-GBH, n = 12) and controls at D42 and D70 taken together (CT + Ex-CT, n = 10), collected during (D42) and after GBH exposure (D70) measured by principal coordinates analysis (PCoA) on Bray–Curtis index **(A)** and Unifrac distance **(B)**. Results are presented as individual values. Microbiome α-diversity in the very same groups measured by Chao **(C)**, Shannon **(D)** and Faith indices **(E)**. *p ≤ 0.05. CT + Ex-CT: Control and ex-Control taken together, GBH: Glyphosate-Based Herbicide, Ex-GBH.

GBH and Ex-GBH groups than in the CT + Ex-CT group. The abundance of *Barnesiella* was significantly decreased whereas that of *Colidextribacter* was significantly higher in the GBH group than in the CT + Ex-CT group. The abundance of *Coprobacter* was different in all three groups: it was significantly lower in the GBH group than in the CT + Ex-CT group and was significantly higher in Ex-GBH than in the other groups. *DTU089* abundance was significantly lower in the Ex-GBH group than in the CT + Ex-CT group. *GCA-900066575* abundance was significantly higher in the Ex-GBH group than in GBH hens. *Ruminococcus* abundance was significantly higher in Ex-GBH and CT + Ex-GBH groups than in the GBH group. Abundance of the *S50* wastewater-sludge group was significantly higher in Ex-GBH than in the GBH group. *Synergistes* abundance was significantly higher in Ex-GBH than in the CT + Ex-GBH group. *Clostridia* vadin BB60 abundance was significantly higher in the CT + Ex-CT group than in the GBH group. sPLS-DA analysis was performed to explain group variations. Two components have been identified. Most of the differential taxa identified by sPLS-DA analysis was already identified by the previous analysis. The first component (X-variate 1) explains 16% of the variations and allows to separate GBH and CT + Ex-CT hens from Ex-GBH hens. Second component (X-variate 2) explains 13% of the variations and allows to separate GBH hens from CT + Ex-CT hens. For each component, most contributing taxa were identified based on their abundance. The first component has 5 most contributing taxa. Its most contributing taxon is *Treponema*, more abundant in Ex-GBH group, followed by Prevotellaceae, more abundant in GBH group, *Paraprevotella*, a non-identified *F082* family bacterium, more abundant in Ex-GBH group and *Butyricicoccus* which is more abundant in CT + Ex-CT group. The second component has 5 most contributing taxa. Its most contributing taxon is Muribaculaceae, more abundant in GBH group, followed by *Bacteroidales*, more abundant in GBH group too, itself followed by *Flavobacteriales*, more abundant in CT + Ex-CT group and *Candidatus Vestibculum* and *Synergistes*, more abundant in GBH and CT + Ex-CT group.

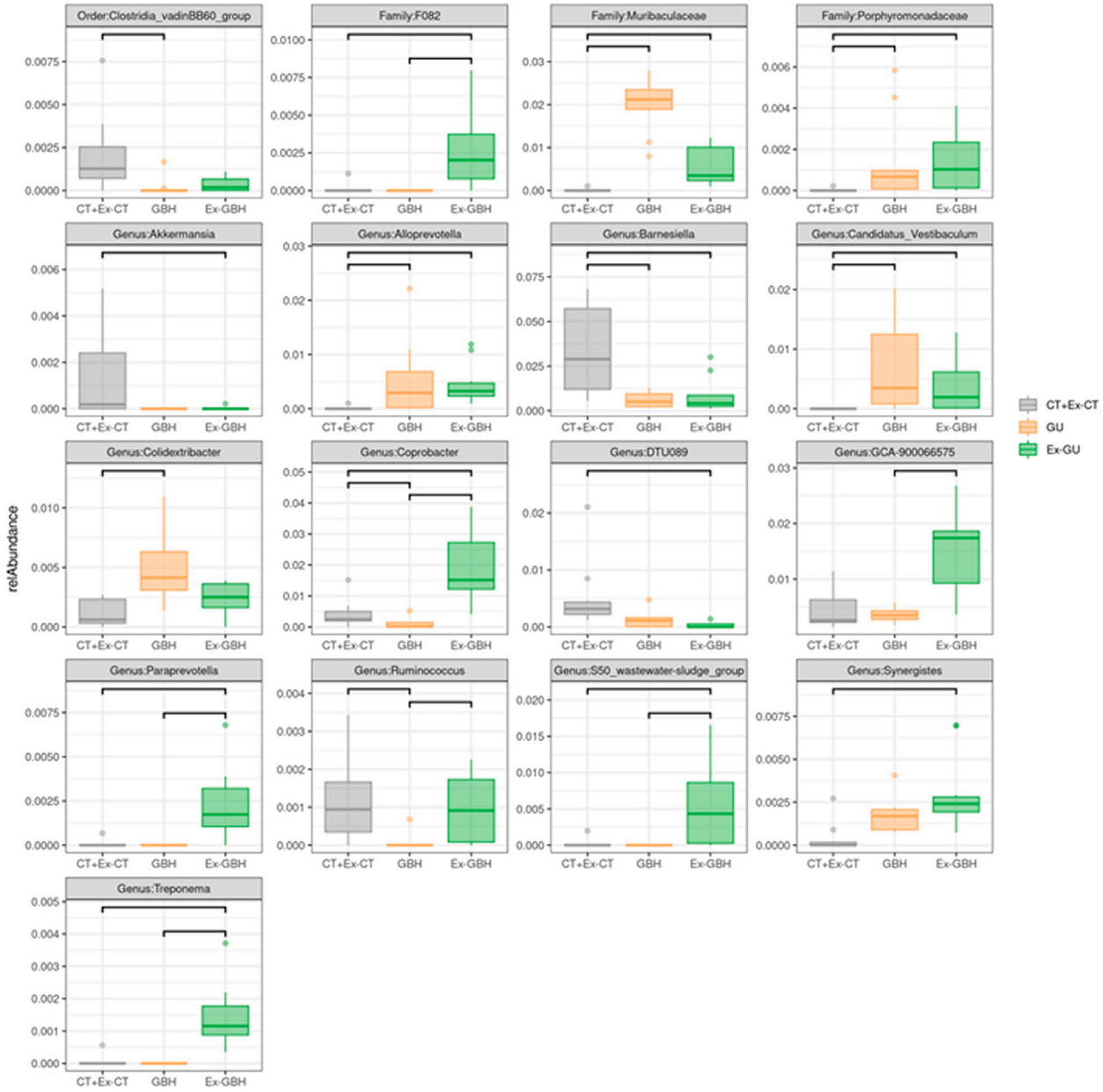


FIGURE 7
Relative abundance of differential taxa in cecal content of hens exposed to GBH for 42 days (GBH, n = 9), exposed for 42 days then non-exposed until D70 (Ex-GBH, n = 12) and controls at D42 and D70 taken together (CT + Ex-CT, n = 10), commonly identified by ALDEx2, DESeq2 and ANCOM-BC methods. A bar between two groups indicates that the relative abundance is significant between these two groups. Taxa are identified at order, family and genus levels Results are presented as means ± SEM. *p ≤ 0.05. CT + Ex-CT: Control and ex-Control taken together, GBH: Glyphosate-Based Herbicide, Ex-GBH.

Discussion

Our results show for the first time possible disturbances of the cecal microbiota associated with plasma oxidative stress and the accumulation of Gly in metabolic tissues in response to chronic dietary GBH exposure in breeder broiler hens (Figure 8). Furthermore, some of these alterations are potentially reversible and were observed without any variation of growth performance (Figure 8).

Indeed, when we monitored hens' body weight and fat thickness during and after chronic dietary GBH exposure, we did not observe any differences in either of these two parameters

10.3389/fphys.2022.974688

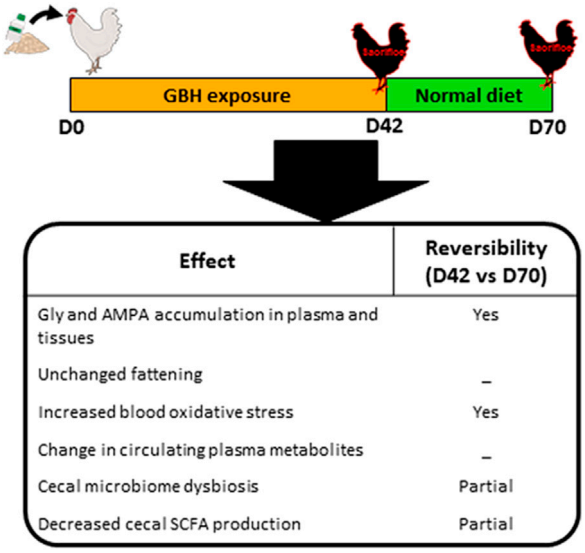


FIGURE 8
Schematic representation of effects of dietary GBH exposure in hens and their potential reversibility on glyphosate and AMPA accumulation in plasma and tissues, fattening, plasma oxidative stress, plasma metabolites, cecal microbiome dysbiosis and cecal SCFA production.

between the hens fed with GBH and those fed without GBH. These results are in accordance with those obtained after a 13-weeks study performed on rats (Panzacchi et al., 2018). Moreover, triglyceride, cholesterol and phospholipid concentrations in plasma were not affected and the uric acid assay did not show any difference with the control either, suggesting that fatty acid and purine metabolism is not affected by the GBH diet. However, metabolomic analysis revealed that the concentrations of some serum metabolites were altered. A recent study shows that in Gly exposed humans, several metabolites levels in serum can be altered (Zhang et al., 2022). These alterations could be linked to metabolism dysfunctions, including fatty acids metabolism and purine biosynthesis. The authors also found that TCA cycle intermediates were altered following to the exposition. In our study, all altered serum metabolites were amino acids (except for glycerol). More specifically, five out of eight of the significantly affected metabolites were ketogenic amino acids, including two glucoformers. Also, all the metabolites we identified were reported several times as potential biomarkers for human colorectal cancer detection (Ni et al., 2014). Among them, leucine, lysine and tyrosine can be oxidized to generate acetyl-CoA for ketone body synthesis; methionine and isoleucine are also convertible into propionyl-CoA, then into succinyl-CoA to enter the TCA cycle (Newsholme et al., 2011; Chiang, 2014; Kumari, 2018). This suggests a potential disruption of mitochondrial activity. However, when we determined the ATP concentration in hens' livers, we observed no significant effect of the treatment. The effect of such variations in amino acid circulation therefore remains unclear.

Still, it is worth noticing that Gly and AMPA mainly accumulated in the liver and, to a lesser extent, in leg muscles and AAT. However, no significant effect on liver and AAT weight was detected. Gly and AMPA were also detectable in plasma at both D42 (during exposure) and D70 (after exposure), where they were accompanied by an increase in oxidative stress only at D42. Oxidative stress induction has widely been demonstrated in mammals exposed to Gly and AMPA (Kwiatkowska et al., 2014; Owagboriaye et al., 2019; Turkmen et al., 2019). This effect is reversible since plasma TBARS levels drop back to CT values after exposure. The maximum Gly and AMPA concentrations were measured on the 21st day of the diet, and the values measured later on the 42nd day were lower. This suggests that their degradation/excretion rate is lower than their intake rate before D21 but becomes greater during the following days. In order to clarify this observation, we quantified transcript levels of biotransformation enzymes. A recent study has shown that *in ovo* injections of Gly and GBH trigger modulations in the mRNA expression of cytochromes and other biotransformation-related genes in chick embryos (Fathi et al., 2020). Yet, in adult hens, we did not detect any significant effect on the expression of biotransformation-related genes, whether they encode for Phase I (cytochromes) or Phase II enzymes (GSTs). CYP enzymes enable detoxication of xenobiotics by catalyzing redox and hydrolysis reactions, modifying their chemical properties and thus their toxicity. GSTs catalyze the conjugation reaction of GSH to xenobiotics, which enhances their hydrosolubility and thus their elimination in urine and feces. It has been shown that in rats, 98% of administered Gly is excreted as the unchanged parent compound (Panzacchi et al., 2018), which could explain the lack of action of Phase I and Phase II enzymes on it, which would have turned it into modified compounds. Moreover, a 2000 risk assessment reported that orally administered Gly and AMPA are weakly biotransformed in animals (Williams et al., 2000). However, Gly concentrations in the liver do not quickly drop to negligible values after exposure. Yet, as previously mentioned, GBH's suspected toxicity is not due to Gly alone but also to the surfactants contained in GBH formulations (Bradberry et al., 2004; Kim et al., 2013; Mesnage et al., 2019). Studies have shown that some surfactants are even more toxic than the active ingredient. One example is lipid-based POEAs (polyethoxylated tallow amines) (Martins-Gomes et al., 2022) which are now banned in the EU but still allowed in the United States The presence of these coformulants could explain the high and sustainable accumulation of Gly in the liver, but we would have expected them to trigger the expression of biotransformation enzymes. The exact composition of most GBHs is, however, strictly confidential. We are therefore unable to determine which coformulants could be responsible for this phenomenon.

Considering that hens' spleens were heavier in the Ex-GBH group than in the Ex-CT group, we assumed a disruption at the immune system level. We therefore investigated immune system gene transcript levels in several immune tissues and observed an increase in IgA mRNA expression in the cecum of Ex-GBH animals compared to that in controls. Since IgA is known to be involved in gut microbiome dynamics (Shi et al., 2017), we suspected potential disruption to hens' gut microbiome. The main effects of GBH dietary exposure observed in the present study are actually at the gut microbiome level. It is now well established that GBH and Gly are able to induce changes in microbial communities, especially in the gut of exposed animals (Lozano et al., 2018; Mao et al., 2018). A recent study has shown that orally administered Gly and GBH trigger inhibition of the shikimate pathway in the gut microbiome of Sprague Dawley rats. This inhibition is coupled with increased levels of *Akkermansia muciniphila* (Mesnage et al., 2021). Interestingly, our results rather show a decrease in *Akkermansia* abundance, which is not restored after exposure. In humans, the shikimate pathway is mainly achieved by *A. muciniphila* (Mesnage and Antoniou, 2020), which, extrapolated to poultry, could make the crushing of its abundance expectable and consistent since it is the pathway targeted by Gly. Our results also show that *Barnesiella* and *Clostridia* vadin BB60 abundance follows the same scheme, as does that of *Ruminococcus* whose abundance follows a trend toward restoration after Gallup exposure, implicating various potential neuropsychiatric disorders (Barnett et al., 2022). On the other hand, Muribaculaceae, Porphyromonadaceae, *Alloprevotella*, *Candidatus Vestibaculum* and *Colidextribacter* abundances are significantly increased by GBH exposure and follow a trend toward restoration after GBH exposure. Interestingly, *Colidextribacter* species are known to be positively correlated with oxidative stress (Wang et al., 2021). The impact of GBH may be similar between rats and poultry, since GBH exposure also increases *Alloprevotella* in rats' microbiome (Dechartres et al., 2019). However, to our knowledge, no evident link between variations in the populations of other above-mentioned bacteria and GBH exposure has been established. It has nevertheless previously been shown that a decrease in one bacterial population can induce an increase in other populations (Ruuskanen et al., 2020). We therefore assume that some of the community variations observed here are rather due to inner ecological competition triggered by the reduction in abundance of some taxa than to a direct antibiotic effect of the herbicide. Moreover, Gly is not deleterious to all bacteria: some are able to degrade the molecule (Mesnage and Antoniou, 2020) for phosphorus supply or energy production (Hove-Jensen et al., 2014; Strilbyska et al., 2021). Several recent studies suggest an increase in α-diversity in various models when individuals are exposed to glyphosate or GBHs (Tang et al., 2020; Castelli et al., 2021; Mesnage et al., 2021, 2022). Our results are similar to these findings, except that α-diversity is not increased in exposed animals, but in formerly exposed animals. It is surprising that adding a perturbation does not have any effect on a system but the removal of this perturbation does produce some significant effects on it. To our knowledge, no previous study has reported this kind of observation following to the administration of dietary GBH. However, since we observe some effects on the gut microbiome at the family and genus levels, we can hypothesize that cecal bacteria quickly accustom to the GBH presence, probably by gaining genetic resistances to it. They could however not accustom to its withdrawal as quickly. Since a genetic resistance, for instance to an antibiotic, is often a disadvantage in absence of it, GBH withdrawal could free up an ecological niche for other bacteria, resulting in an increase in α-diversity.

SFCA concentrations in animal feces are also good indicators of potential disruptions in the gut microbiome. Dietary carbohydrates that reach the large intestine without having previously been lysed into smaller molecules in the small intestine are metabolized by bacteria into SCFAs. These molecules are critical in maintaining animals' health, as they are the primary energy source for colonocytes and are involved in the production of hormones which act on their metabolism (blood glucose regulation, fat and protein digestion, satiation promotion) (Barnett et al., 2022). *Ruminococcus* (Ruminococcaceae) is part of the gut bacteria able to produce SCFAs from dietary carbohydrates (Barnett et al., 2022) that we identified as reversibly diminished by GBH exposure. Our data are also in good agreement with those observed in rats (Dechartres et al., 2019) where Ruminococcaceae abundance was lowered by exposure to GBH. *Akkermansia* has also been reported to be an SCFA (propionate) producer in humans (Morrison and Preston, 2016). Our results show a global diminution of all cecal SCFAs during GBH administration, which are restored after exposure for acetate and valerate only. We can therefore hypothesize a link between the fall of these bacteria and that of cecal SFCA levels. Since SFCAs are also suspected to be involved in neuroendocrine regulation and gut microbiome–brain communication, disturbance in their dynamics suggests potential physiological and mental disorders (Silva et al., 2020). A 2017 study revealed depressive-like behaviors in young adult rats when exposed to a GBH (Cattani et al., 2017). However, we did not detect any effect on hens' feeding behavior. At this point, it therefore seems important to remember the correlational nature of such studies. Since correlation does not imply causation, more studies are needed to confirm direct guilt of GBH/Gly/surfactants in disruption of the gut microbiome and cecal SFCA production and on the disorders they trigger. Other effects of GBH have been demonstrated in other cells. For instance, it has been shown that low GBH levels could induce oxidative stress and impair Ca^{2+}-mediated functions in rat Sertoli cells, resulting in a reduced male fertility (de Liz Oliveira Cavalli et al., 2013). Future works could therefore focus on the potential effects of

GBH administration on male and female reproductive functions.

Conclusion

Here, we show that half the current NOAEL of dietary Gly does not induce a direct impact on hens' metabolism (at least on the various parameters determined in our 150 animals), though it reversibly triggers oxidative stress in blood plasma and impacts several gut microbes. Investigating the link between GBH and fertility is a direction that future works should probably take, in order to constitute a robust database allowing characterization of the actual impact that the molecule and its formulations have on animal and human health.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: https://www.ebi.ac.uk/ena, PRJNA741111.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by ethics committee of Val de Loire No. 19.

Author contributions

MF, AE, CR, MC, PF, and JD. contributed to the overall approach and design of experiments. GL, MF. and JD performed statistical data analysis. CS and EV determined the fattening of animals by using ultrasound. CL and JL realized the analyses of food intake behavior and RG participated to the RTqPCR analysis. EM performed the analyses of SCFA concentrations in hen's caecum and AH and OZ realized the caecal microbiome analysis. MF and JD. wrote the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved the final version.

Funding

The authors thank the Région Centre Val de Loire for the financial support (Project number 32000858, HAPOFERTI).

Acknowledgments

The authors are grateful to all the persons from the experimental unit (INRAE, PEAT, Centre Val de Loire DOI: 10.15454/1.5572326250887292E12) who take care of animals. We also thank to Christine Leterrier for her help in the feeding behavior analysis. All NMR experiments were performed on the instruments of the MetaToul-AXIOM platform, partner of the national infrastructure of metabolomics and fluxomics: MetaboHUB (MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010). We also thank to Laurent Cauquil for the European Nucleotide Archive submission.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.974688/full#supplementary-material

References

Al-Khalaifah, H. S., Shahin, Sara. E., Omar, A. E., Mohammed, H. A., Mahmoud, Hala. I., and Ibrahim, D. (2020). Effects of graded levels of microbial fermented or enzymatically treated dried brewer's grains on growth, digestive and nutrient transporter genes expression and cost effectiveness in broiler chickens. *BMC Vet. Res.* 16, 424. doi:10.1186/s12917-020-02603-0

Armstrong, D., and Browne, R. (1994). "The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory," in Free Radicals in diagnostic medicine *advances in experimental medicine and biology*. Editor D. Armstrong (Boston, MA: Springer US), 43–58. doi:10.1007/978-1-4615-1833-4_4

Barnett, J. A., Bandy, M. L., and Gibson, D. L. (2022). Is the use of glyphosate in modern agriculture resulting in increased neuropsychiatric conditions through modulation of the gut-brain-microbiome Axis? *Front. Nutr.* 9, 827384. doi:10.3389/fnut.2022.827384

Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., et al. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276

Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., and Vale, J. A. (2004). Glyphosate poisoning. *Glyphosate Poisoning Toxicol. Rev.* 23, 159–167. doi:10.2165/00139709-200423030-00003

Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P., et al. (2021). Impact of chronic exposure to sublethal doses of glyphosate on honey bee immunity, gut microbiota and infection by pathogens. *Microorganisms* 9, 845. doi:10.3390/microorganisms9040845

Cattani, D., Cesconetto, P. A., Tavares, M. K., Parisotto, E. B., De Oliveira, P. A., Rieg, C. E. H., et al. (2017). Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology* 387, 67–80. doi:10.1016/j.tox.2017.06.001

Cattani, D., Struyf, N., Steffensen, V., Bergquist, J., Zamoner, A., Brittebo, E., et al. (2021). Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysregulation of dynorphins and an increase of neural precursor cells in the brain of adult male rats. *Toxicology* 461, 152922. doi:10.1016/j.tox.2021.152922

Chamorro-García, R., Poupin, N., Tremblay-Franco, M., Canlet, C., Egusquiza, R., Gautier, R., et al. (2021). Transgenerational metabolomic fingerprints in mice ancestrally exposed to the obesogen TBT. *Environ. Int.* 157, 106822. doi:10.1016/j.envint.2021.106822

Chiang, J. (2014). "Liver physiology: Metabolism and detoxification," in *Pathobiology of human disease* (Elsevier), 1770–1782. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7

Cong, Y., Chi, Q., Teng, X., and Li, S. (2019). The protection of selenium against cadmium-induced mitochondrial damage via the cytochrome P450 in the livers of chicken. *Biol. Trace Elem. Res.* 190, 484–492. doi:10.1007/s12011-018-1557-x

Dai, D., Pan, Y., Zeng, C., Liu, S., Yan, Y., Wu, X., et al. (2020). Activated FXR promotes xenobiotic metabolism of T-2 toxin and attenuates oxidative stress in broiler chicken liver. *Chem. Biol. Interact.* 316, 108912. doi:10.1016/j.cbi.2019.108912

de Liz Oliveira Cavalli, V. L., Cattani, D., Heinz Rieg, C. E., Pierozan, P., Zanatta, L., Benedetti Parisotto, E., et al. (2013). Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 335–346. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043

Dechartres, J., Pawluski, J. L., Gueguen, M., Jablaoui, A., Maguin, E., Rhimi, M., et al. (2019). Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. *J. Neuroendocrinol.* 31, e12731. doi:10.1111/jne.12731

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018). Frogs: Find, rapidly, OTUs with Galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791

Estienne, A., Reverchon, M., Partyka, A., Bourdon, G., Grandhaye, J., Barbe, A., et al. (2020). Chemerin impairs *in vitro* testosterone production, sperm motility, and fertility in chicken: Possible involvement of its receptor CMKLR1. *Cells* 9, 1599. doi:10.3390/cells9071599

Fathi, M. A., Han, G., Kang, R., Shen, D., Shen, J., and Li, C. (2020). Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 16865–16875. doi:10.1007/s11356-020-08269-3

Fernandes, A. D., Reid, J. N., Macklaim, J. M., McMurrough, T. A., Edgell, D. R., and Gloor, G. B. (2014). Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: Characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2, 15. doi:10.1186/2049-2618-2-15

Fogliatto, S., Ferrero, A., and Vidotto, F. (2020). "Current and future scenarios of glyphosate use in Europe: Are there alternatives?," in *Advances in agronomy* (Elsevier), 219–278. doi:10.1016/bs.agron.2020.05.005

Furet, J.-P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., et al. (2009). Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR: Human and farm animal faecal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 351–362. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x

Garrido, D., Alber, A., Kut, E., Chanteloup, N. K., Lion, A., Trotereau, A., et al. (2018). The role of type I interferons (IFNs) in the regulation of chicken macrophage inflammatory response to bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 86, 156–170. doi:10.1016/j.dci.2018.04.025

Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., and Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environ. Chem. Lett.* 16, 401–426. doi:10.1007/s10311-017-0689-0

Grandhaye, J., Douard, V., Rodriguez-Mateos, A., Xu, Y., Cheok, A., Riva, A., et al. (2020). Microbiota changes due to grape seed extract diet improved intestinal homeostasis and decreased fatness in parental broiler hens. *Microorganisms* 8, 1141. doi:10.3390/microorganisms8081141

Grandhaye, J., Hmadeh, S., Plotton, I., Levasseur, F., Estienne, A., LeGuevel, R., et al. (2021). The adiponectin agonist, AdipoRon, inhibits steroidogenesis and cell proliferation in human luteinized granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 520, 111080. doi:10.1016/j.mce.2020.111080

Grau, D., Grau, N., Gascuel, Q., Paroissin, C., Stratonovitch, C., Lairon, D., et al. (2022). Quantifiable urine glyphosate levels detected in 99% of the French population, with higher values in men, in younger people, and in farmers. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 29, 32882–32893. doi:10.1007/s11356-021-18110-0

Grotto, D., Santa Maria, L. D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M. F., Moro, A. M., et al. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 619–624. doi:10.1016/j.jpba.2006.07.030

Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., and Jochimsen, B. (2014). Utilization of glyphosate as phosphate source: Biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 176–197. doi:10.1128/MMBR.00040-13

Inger, R., Gregory, R., Duffy, J. P., Stott, I., Voříšek, P., and Gaston, K. J. (2015). Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. *Ecol. Lett.* 18, 28–36. doi:10.1111/ele.12387

Jasper, R., Locatelli, G. O., Pilati, C., and Locatelli, C. (2012). Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 133–140. doi: doi:10.2478/v10102-012-0022-5

Kim, Y., Hong, J., Gil, H., Song, H., and Hong, S. (2013). Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicol. Vitro* 27, 191–197. doi:10.1016/j.tiv.2012.09.021

Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., and Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120. doi:10.1128/AEM.01043-13

Kumari, A. (2018). "Citric acid cycle," in *Sweet biochemistry* (Elsevier), 7–11. doi:10.1016/B978-0-12-814453-4.00002-9

Kwiatkowska, M., Huras, B., and Bukowska, B. (2014). The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (*in vitro*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 109, 34–43. doi:10.1016/j.pestbp.2014.01.003

Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Maté, M. L., Lanusse, C., and Virkel, G. L. (2014). Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *Int. J. Toxicol.* 33, 307–318. doi:10.1177/1091581814540481

Lê Cao, K.-A., Costello, M.-E., Lakis, V. A., Bartolo, F., Chua, X.-Y., Brazeilles, R., et al. (2016). MixMC: A multivariate statistical framework to gain insight into microbial communities. *PLoS ONE* 11, e0160169. doi:10.1371/journal.pone.0160169

Lin, H., and Peddada, S. D. (2020). Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat. Commun.* 11, 3514. doi:10.1038/s41467-020-17041-7

Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8

Lozano, V. L., Defarge, N., Rocque, L.-M., Mesnage, R., Hennequin, D., Cassier, R., et al. (2018). Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. *Toxicol. Rep.* 5, 96–107. doi:10.1016/j.toxrep.2017.12.005

Mao, Q., Manservisi, F., Panzacchi, S., Mandrioli, D., Menghetti, I., Vornoli, A., et al. (2018). The ramazzini institute 13-week pilot study on glyphosate and roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: Effects on the microbiome. *Environ. Health* 17, 50. doi:10.1186/s12940-018-0394-x

Martins-Gomes, C., Silva, T. L., Andreani, T., and Silva, A. M. (2022). Glyphosate vs. Glyphosate-based herbicides exposure: A review on their toxicity. *J. Xenobiot.* 12, 21–40. doi:10.3390/jox12010003

Mesnage, R., and Antoniou, M. N. (2020). Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. *Curr. Res. Toxicol.* 1, 25–33. doi:10.1016/j.crtox.2020.04.001

Mesnage, R., Benbrook, C., and Antoniou, M. N. (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem. Toxicol.* 128, 137–145. doi:10.1016/j.fct.2019.03.053

Mesnage, R., Bowyer, R. C. E., El Balkhi, S., Saint-Marcoux, F., Gardere, A., Ducarmon, Q. R., et al. (2022). Impacts of dietary exposure to pesticides on faecal microbiome metabolism in adult twins. *Environ. Health.* 21, 46. doi:10.1186/s12940-022-00860-0

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., and Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.* 84, 133–153. doi:10.1016/j.fct.2015.08.012

Mesnage, R., Teixeira, M., Mandrioli, D., Falcioni, L., Ducarmon, Q. R., Zwittink, R. D., et al. (2021). Use of shotgun metagenomics and metabolomics to evaluate the impact of glyphosate or roundup mon 52276 on the gut microbiota and serum metabolome of sprague-dawley rats. *Environ. Health Perspect.* 129, 017005. doi:10.1289/EHP6990

Morrison, D. J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200. doi:10.1080/19490976.2015.1134082

Nearing, J. T., Douglas, G. M., Hayes, M. G., MacDonald, J., Desai, D. K., Allward, N., et al. (2022). Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nat. Commun.* 13, 342. doi:10.1038/s41467-022-28034-z

Newsholme, P., Stenson, L., Sulvucci, M., Sumayao, R., and Krause, M. (2011). "Amino acid metabolism," in *Comprehensive biotechnology* (Elsevier), 3–14. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00002-7

Ni, Y., Xie, G., and Jia, W. (2014). Metabonomics of human colorectal cancer: New approaches for early diagnosis and biomarker discovery. *J. Proteome Res.* 13, 3857–3870. doi:10.1021/pr500443c

Okamoto, A. S., Filho, R. L. A., Milbradt, E. L., Moraes, A. C. I., Vellano, I. H. B., and Guimarães-Okamoto, P. T. C. (2018). Bacterial communication between lactobacillus spp. isolated from poultry in the inhibition of Salmonella heidelberg—Proof of concept. *Poult. Sci.* 97, 2708–2712. doi:10.3382/ps/pey141

Owagboriaye, F., Dedeke, G., Ademolu, K., Olujimi, O., Aladesida, A., and Adeleke, M. (2019). Comparative studies on endogenic stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 14502–14512. doi:10.1007/s11356-019-04759-1

Pandey, A., Dabhade, P., and Kumarasamy, A. (2019). Inflammatory effects of subacute exposure of roundup in rat liver and adipose tissue. *Dose. Response.* 17, 1559325819843380. doi:10.1177/1559325819843380

Panzacchi, S., Mandrioli, D., Manservisi, F., Bua, L., Falcioni, L., Spinaci, M., et al. (2018). The ramazzini institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: Study design and first in-life endpoints evaluation. *Environ. Health* 17, 52. doi:10.1186/s12940-018-0393-y

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005752. doi:10.1371/journal.pcbi.1005752

Romano, R. M., Romano, M. A., Bernardi, M. M., Furtado, P. V., and Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch. Toxicol.* 84, 309–317. doi:10.1007/s00204-009-0494-z

Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Gómez-Gallego, C., Selenius, O., Salminen, S., Collado, M. C., et al. (2020). Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. *Environ. Pollut.* 266, 115108. doi:10.1016/j.envpol.2020.115108

Samsel, A., and Seneff, S. (2013). Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy* 15, 1416–1463. doi:10.3390/e15041416

Serra, L., Estienne, A., Bourdon, G., Ramé, C., Chevaleyre, C., Didier, P., et al. (2021). Chronic dietary exposure of roosters to a glyphosate-based herbicide increases seminal plasma glyphosate and AMPA concentrations, alters sperm parameters, and induces metabolic disorders in the progeny. *Toxics* 9, 318. doi:10.3390/toxics9120318

Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, Alaa. A., Hafez, H. M., and Krüger, M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota *in vitro*. *Curr. Microbiol.* 66, 350–358. doi:10.1007/s00284-012-0277-2

Shi, N., Li, N., Duan, X., and Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* 4, 14. doi:10.1186/s40779-017-0122-9

Silva, Y. P., Bernardi, A., and Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front. Endocrinol.* 11, 25. doi:10.3389/fendo.2020.00025

Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — Masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238. doi:10.1038/nrmicro2974

Strilbyska, O. M., Tsiumpala, S. A., Kozachyshyn, I. I., Strutynska, T., Burdyliuk, N., Lushchak, V. I., et al. (2021). The effects of low-toxic herbicide roundup and glyphosate on mitochondria. *EXCLI J.* 14, 183–196. doi:10.17179/excli2021-4478

Tang, Q., Tang, J., Ren, X., and Li, C. (2020). Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ. Pollut.* 261, 114129. doi:10.1016/j.envpol.2020.114129

Turkmen, R., Birdane, Y. O., Demirel, H. H., Kabu, M., and Ince, S. (2019). Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicol. Res.* 8, 238–245. doi:10.1039/C8TX00287H

Walsh, L. P., McCormick, C., Martin, C., and Stocco, D. M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* 108, 769–776. doi:10.1289/ehp.00108769

Wang, H., Li, W., Muhammad, I., Sun, X., Cui, X., Cheng, P., et al. (2018). Biochemical basis for the age-related sensitivity of broilers to aflatoxin B1. *Toxicol. Mech. Methods* 28, 361–368. doi:10.1080/15376516.2018.1428258

Wang, M., Zhang, S., Zhong, R., Wan, F., Chen, L., Liu, L., et al. (2021). Olive fruit extracts supplement improve antioxidant capacity via altering colonic microbiota composition in mice. *Front. Nutr.* 8, 645099. doi:10.3389/fnut.2021.645099

Williams, G. M., Kroes, R., and Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165. doi:10.1006/rtph.1999.1371

Xing, M., Zhao, P., Guo, G., Guo, Y., Zhang, K., Tian, L., et al. (2015). Inflammatory factor Alterations in the gastrointestinal tract of cocks overexposed to arsenic trioxide. *Biol. Trace Elem. Res.* 167, 288–299. doi:10.1007/s12011-015-0305-8

Zhang, L., Gui, S., Wang, J., Chen, Q., Zeng, J., Liu, A., et al. (2020). Oral administration of green tea polyphenols (TP) improves ileal injury and intestinal flora disorder in mice with *Salmonella typhimurium* infection via resisting inflammation, enhancing antioxidant action and preserving tight junction. *J. Funct. Foods* 64, 103654. doi:10.1016/j.jff.2019.103654

Zhang, Q., Liu, X., Gao, M., Li, X., Wang, Y., Chang, Y., et al. (2022). The study of human serum metabolome on the health effects of glyphosate and early warning of potential damage. *Chemosphere* 298, 134308. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134308

Zhao, P., Zhang, K., Guo, G., Sun, X., Chai, H., Zhang, W., et al. (2016). Heat shock protein alteration in the gastrointestinal tract tissues of chickens exposed to arsenic trioxide. *Biol. Trace Elem. Res.* 170, 224–236. doi:10.1007/s12011-015-0462-9

Glossary

Actin B: Actin Beta ALDEx2: ANOVA-Like Differential Expression 2

AMPA: Amino-Methyl-Phosphonic Acid

ANCOM-BC: Analysis of Compositions of Microbiomes with Bias Correction

BCA: bicinchoninic acid

BSEP: ATP binding cassette subfamily B member 11

Ces1: Carboxylesterase 1

CMKLR1: Chemerin Chemokine-Like Receptor 1

COX-2: Cyclooxygenase 2

Cq: quantification cycle

CT: Control

CYP1A1: Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1

CYP1A2: Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2

CYP1A4: Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 4

CYP1A5: Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 5

CYP2A6: Cytochrome P450 family 2 subfamily A member 6

CYP2C: Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C

CYP2H1: Cytochrome P4502H1

CYP2H2: Cytochrome P4502H2

CYP3A: Cytochrome P450, family 3, subfamily A

CYP3A37: Cytochrome P450, family 3, subfamily A member 37

EPHX1: Epoxide Hydrolase 1

FMOC-Cl: 9-fluorenylmethyl chloroformate

FROGS: Find, Rapidly, OTUs, Operational Taxonomic Units

FXR: Farnesoid X receptor

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GBH: Glyphosate-based Herbicides

Gly: Glyphosate

GSH: Glutathione

GSTA3: Glutathione S-Transferase Alpha 3

GSTA4: Glutathione S-Transferase Alpha 4

GSTs: Glutathione S-Transferase

Hsp27: Heat shock protein 27

Hsp40: Heat shock protein 40

Hsp60: Heat shock protein 60

Hsp70: Heat shock protein 70

Hsp90: Heat shock protein 90

IFNα: Interferon alpha

IFNβ: Interferon beta

IgA: Immunoglobulin A

IL-1β: Interleukin-1 beta

IL-22: Interleukin-22

IL-6: Interleukin-6

IL-8: Interleukin-8

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

MDA: MalonDiAldehyde

MMLV: Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

NF-κB: Nuclear factor-kappa B

NMDS: non-metric multidimensional scaling

NMR: Nuclear magnetic resonance metabolomics

NOAEL: Non observed adverse effect level

OTUs: Operational Taxonomic Units

PGA5: Pepsinogen A5

PGC: Progastricsin

POEA: Polyethoxylated tallow amines

PTGES: Prostaglandin E Synthase

SCFA: Short-Chain Fatty Acid

TCA cycle: tricarboxylic acid cycle

TNF-α: Tumor Necrosis Factor-alpha

III. Fréville et al., 2024a

Fréville, M., Estienne, A., Ramé, C., Lefort, G., Piégu, B., Chahnamian, M., et al. (2024). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide alters ovarian functions in young female broilers. *Poultry Science* 103, 103767. doi: 10.1016/j.psj.2024.103767

Poultry Science®

Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide alters ovarian functions in young female broilers

Freville Mathias,* Estienne Anthony ,* Ramé Christelle,* Lefort Gaëlle ,* Piégu Benoît ,* Chahnamian Marine,† Froment Pascal ,* and Dupont Joëlle†,1

*Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Français du Cheval et de l'Equitation, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Université de Tours, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR85, Nouzilly F-37380, France; and †Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT 1295, Nouzilly F-37380, France

ABSTRACT Glyphosate (**GLY**)-based herbicide (**GBH**) formulations are widely used pesticides in agriculture. The European Union recently decided to extend the use of GLY in Europe until 2034. Previously, we showed that chronic dietary GBH exposure in adult hens resulted in a reversible increase in early mortality in chicken embryos. In this present study, we investigated the GBH effects on metabolism and ovarian functions by using a transcriptomic approach in vivo in young female broilers and in vitro in ovarian explant cultures. We exposed 11-day-old female broilers to 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (GBH13, n = 20), 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (GBH34, n = 20), or a standard diet (control [CT], n = 20) for 25 d. These 2 GBH concentrations correspond to approximatively one-eighth and one-third of the no observed adverse effect level (**NOAEL**) as defined by European Food Safety Authority in birds. During this period, we evaluated body weight, fattening, food intake, and the weight of organs (including the ovaries). Chronic dietary GBH exposure dose dependently reduced food intake, body weight, and fattening, but increased oxidative stress and relative ovary weight. We analyzed the ovarian gene expression profile in CT, GBH13, and GBH34 broilers with RNA sequencing and showed that differentially expressed genes are mainly enriched in pathways related to cholesterol metabolism, steroidogenesis, and RNA processing. With quantitative polymerase chain reaction and western blotting, we confirmed that GBH decreased ovarian STAR and CYP19A1 messenger RNA and protein expression, respectively. Furthermore, we confirmed that GBH altered steroid production in ovarian explants. We have identified potential regulatory networks associated with GBH. These data provide valuable support for understanding the ovarian transcriptional regulatory mechanism of GBH in growing broilers.

Key words: glyphosate, young broiler, food intake, ovary, transcriptomic approach

2024 Poultry Science 103:103767
https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103767

INTRODUCTION

Glyphosate (**GLY**) or *N*-(phosphonomethyl)glycine, sold in the form of GLY-based herbicides (**GBH**), is an active herbicide used widely in agriculture throughout the world. Due to its extensive use, GLY has been frequently detected in environmental compartments such as the soil (Silva et al., 2018), groundwater and surface water (Geng et al., 2021), the air (Ramirez Haberkon et al., 2021), and cereals (Xu et al., 2019). Glyphosate has been considered harmless to animals because of its capacity to inhibit the Shikimate pathway present exclusively in plant cells and in some microorganisms (Schönbrunn et al., 2001). However, several studies have shown adverse effects after GBH administration in various mammalian models, including endocrine disruption (Walsh et al., 2000; Romano et al., 2010; Gill et al., 2018). Furthermore, in plants and animals, GLY is metabolized into aminomethylphosphonic acid (**AMPA**), which is also suspected to exert toxic effects (Martins-Gomes et al., 2022). Although evidence for the carcinogenicity and toxicological effects of GLY has been found and debated, the European Union decided to extend the use of GLY in Europe for 10 yr until 2034 (Cressey, 2015; Tarazona et al., 2017; Casassus, 2023).

Although the adverse effects of GBHs for human health have been particularly scrutinized and debated in

© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Received February 19, 2024.
Accepted April 9, 2024.

[1]Corresponding author: joelle.dupont@inrae.fr

the public discourse, they are also suspected to have great ecotoxicological effects. Scientists are particularly concerned with the reduction in bird populations. A 2015 study showed that European birds have been in strong decline for at least 30 years (Inger et al., 2015). While biodiversity collapses are multifactorial phenomena, agricultural activities and particularly more widespread pesticide use are suspected to be critical factors (Rigal et al., 2023). Moreover, according to the European Food Safety Authority (**EFSA**), GLY and AMPA are highly persistent in soils: Their half-life can be several hundred days, depending of the aerobic/anaerobic condition of the soil (Martins-Gomes et al., 2022). GLY residues are also detectable in water and food (Gill et al., 2018; Fogliatto et al., 2020) and are therefore likely to be transferred to birds. Moreover, studies have concluded that GBHs can threaten birds. However, these studies claim that the threat would come from a lack of food due to the harmful effects of GBHs on the invertebrates in the diet of adult birds (Gill et al., 2018). Nonetheless, GBHs can decrease the liver antioxidant capacity and testosterone levels in Japanese quail (Ruuskanen et al., 2020a), and parental exposure might also affect embryo development (Ruuskanen et al., 2020b). A previous study from our laboratory on adult broiler hens showed that chronic dietary GBH intake significant increased embryo mortality and developmental defects (Estienne et al., 2022). Although these deleterious effects were reversible, the progeny of hens temporarily exposed to a GBH were more likely to fatten, even with a balanced diet (Estienne et al., 2023).

Because adverse effects have been observed in adult birds, we aimed to assess the effect of dietary GBH exposure in young broilers. We exposed 11-day-old female broilers to one of 2 dietary doses of GBH—13 or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d—for 25 d. We monitored their food intake, body weight, and fattening; the relative weight of the ovaries, abdominal adipose tissue, and spleen; the plasma GLY and AMPA concentrations; and oxidative stress markers. In addition, we evaluated the effect of the 2 GBH doses on genes involved in ovary steroidogenesis with RNA sequencing (RNA-seq) and reverse transcription−quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Finally, we exposed ovarian explants from 10-day-old broilers to GBH and evaluated progesterone and estradiol production.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Issues

All experimental procedures were performed in accordance with the French National Guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals: APAFIS number 21549-2019071809504554v3, approval date November 6, 2021, Ministry of Agriculture and Fish Products, and a notice from the ethics committee of Val de Loire N°19).

Animals

Sixty female broilers of the commercial ROSS 308 breed were obtained at 1 d of age from a local hatchery (Boye Accouvage La Villonniere, La Boissière en Gatine, France) and reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) according to the standard breeding conditions. At 11 d of age, the broilers were divided into 3 groups of 20 and subjected to the following dietary treatments for 25 d: a low Gallup Super 360 dose with 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group), a high Gallup Super 360 dose with 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group), or a regular diet without GBH (the CT group). Blood samples were collected to quantify the plasma GLY and AMPA concentrations and oxidative stress. The broilers were weighed on d 1 (D1), D9, D16, and D25 of the experiment. Ultrasonography was performed on D9 and D25 to measure the thickness of the abdominal adipose tissue. On D25, the broilers were killed by electrical stunning and bled out, as recommended by the ethical committee. Then, biological samples were collected (Figure 1).

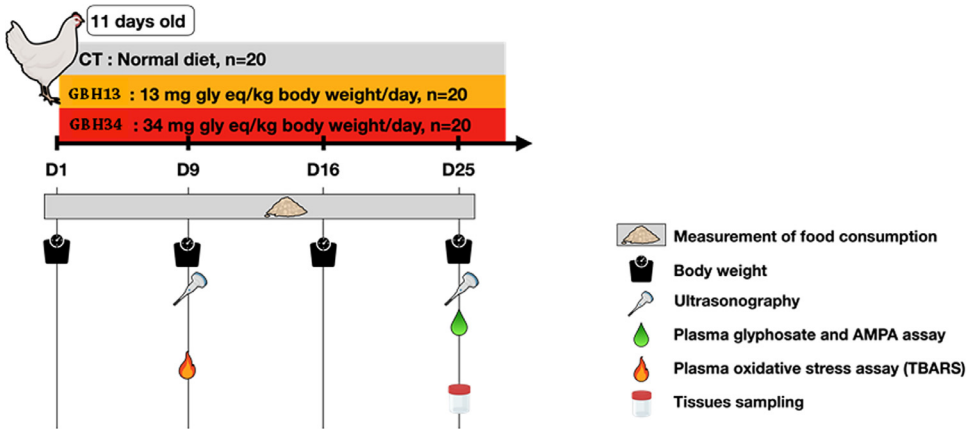


Figure 1. Experimental design. Eleven-day-old female broilers were exposed to glyphosate (**GLY**)-based herbicide (**GBH**) in the diet for 25 d, corresponding to a dose of 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group, n = 20) or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group, n = 20). The control group (CT, n = 20) received a normal diet. Food intake was determined each day. On d 1 (D1), D9, D16, and D25 of the experiment, the broilers were weighed; on D9 and D25, an ultrasonographic examination was used to estimate the abdominal adipose tissue thickness; and on D25, blood was collected for oxidative stress assessment and the GLY and aminomethylphosphonic acid (**AMPA**) assays. All the animals were euthanized to collect tissues on D25.

Diet Composition

The CT food had 0.001 mg GLY/g food and 0.0001 mg AMPA/g food; the GBH13 food had 0.086 mg GLY/g food and 0.0027 mg AMPA/g food; and the GBH34 food had 0.215 mg GLY/g food and 0.0068 mg AMPA/g food. The GLY and AMPA concentrations in food were determined by Phytocontrol company (Nîmes, France). Gallup (Gallup Super 360) was obtained from Axereal (Monnaie, France) and contains 360 g GLY/L (485.8 g isopropylamine salt/L). Control diet composition is shown in the Supplementary Table 1.

Biological Sample Collection

Blood samples were collected from the occipital sinus into heparin tubes on D9 and D25 from 10 broilers per group. Blood samples were centrifuged (5,000 *g*, 10 min, 4°C) and stored at -20°C before use for the thiobarbituric acid reactive substances (**TBARS**), GLY, and AMPA assays. Tissues samples were obtained on D25.

Plasma Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay

Lipid peroxidation, as determined through measuring the amount of MDA (malondialdehyde) that reacts with 2-thiobarbituric acid, was used to estimate oxidative stress (Armstrong and Browne, 1994). Blood samples were collected into EDTA-treated tubes, then gently shaken and kept and handled on wet ice. The plasma was separated by centrifuging the blood samples at 1,000 × *g* for 10 min at 4°C, then transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes and stored at −80°C. The TBARS values of the EDTA-treated plasma were measured using the modified method of Grotto et al. (2007). A standard curve for 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used, and the concentration was expressed as mmol MDA/mL solution.

GLY and AMPA Assays

The plasma GLY and AMPA concentrations were measured after a derivatization reaction using 9-fluorenylmethyl chloroformate (**FMOC-Cl**), in collaboration with Dr. S El Balkhi (Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Limoges, France), as described previously (Serra et al., 2021).

Feed Conversion Ratio

The FCR was calculated for each animal on D9, D16, and D25 with the following formula:

$$FCR = \frac{Total\ feed\ consummed\ between\ two\ days\ (g)}{Weight\ gain\ between\ two\ days(g)}$$

Relative Tissue Weight

On D25, the ovaries, abdominal adipose tissue, and spleen were weighed and their relative weight (ratio) was determined with the following formula:

$$Ratio = \frac{Tissue\ weight\ (g)}{Body\ weight\ (g)}$$

RT-qPCR

Total RNA from CT, GBH13, and GBH34 ovaries and ovarian explants (n = 8 per group) were extracted using the TRIzol RNA Isolation Reagent (Invitrogen by Life Technologies, Montigny le Bretonneux, France) and an ULTRATURAX instrument for grinding, according to the manufacturer's recommendations. The RNA concentration and purity (based on the A260/A280 ratio) were determined with a Nanodrop spectrophotometer. Two micrograms of total RNA was reverse transcribed into complementary DNA (**cDNA**) in a 20-μL reaction containing 0.5 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, and dCTP), 2 M RT Buffer, 15 μg/μL of oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor, and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase incubated at 37°C for 1 h. Quantitative polymerase chain reaction was performed in a 13 μL reaction containing 3 μL of cDNA and 8 μL of SYBR Green Supermix 1X Reagent (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), and 250 nM of specific primers (Invitrogen by Life Technologies, Montigny le Bretonneux, France); the primer sequences are shown in Table 1. Each sample was run in duplicate in a 384-well plate on a MyiQ real-time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The thermal cycling protocol was: incubation at 50°C for 2 min; denaturation at 95°C for 10 min; and 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. For each target gene, expression was calculated according to primer efficiency (E) and quantification cycle (Cq), where expression = E − Cq. Then, the relative expression of the target gene was determined by using the geometric mean expression of 3 reference genes (*GAPDH, ACTB*, and *EEF1α*).

Western Blotting

Total protein was extracted from CT, GBH13 and GBH34 ovaries with lysis buffer (Tris HCl 1 M [pH 7.4], NaCl 0.15 M, EDTA 1.3 mM, EGTA 1 mM, VO43 23 mM, NaF 0.1 M, NH_2PO_4 1%, and Triton 0.5%) and an ULTRATURAX instrument for grinding. The lysates were centrifuged (16,000 *g*, 20 min, 4°C), and the supernatant was collected and kept on ice. A bicinchoninic acid (**BCA**) protein assay kit (Interchim, Montluçon, France) was used to measure the protein concentration. Eighty micrograms of protein was mixed with 5 × Laemmli buffer and denatured at 95°C for 5 min. The protein was loaded on a sodium dodecyl

Table 1. Primer sequences used for RTqPCR analysis.

Gene	Primer F	Primer R	Reference
GAPDH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGATCTCGC	(Grandhaye et al., 2020)
EEF1α	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TCACATGAGACAGACGGTTGC	
β-actin	ACGGAACCACAGTTTATCATC	GTCCCAGTCTTCAACTATACC	
StAR	TGCCATCTCCTACCAACA	CATCTCCATCTCGCTGAAG	(Estienne et al., 2020)
HSD3β	TACTGCTGGAAGAAGATGAG	CAAGGTGTCAATGATGGAAG	
CYP11A1	TGAATATCATCAGCCCCCGC	GTAGGGCTTGTTGCGGTAGT	
CYP19A1	TGTTCCATCACGCTATTT	GATTCTTGTTTGGGCTTC	(Jin et al., 2020)
Catalase	ACTGCAAGGCGAAAGTGTTT	GGCTATGGATGAAGGATGGA	
GPX1	AACCAAATTCGGGCACCAG	CCGTTCACCTCGACTTCTC	
COLEC12	GCGCCAAGATGAAAGACGAT	GCCACCTGTCACATTGTCCA	
HMGCR	ATGTCAGGAGTGCGACAACT	CGTCCTTCACGACTCTCTCG	(Jiang et al., 2020)
THRSP	GTTCTGACCGACCTCACCAA	GTGGGACTTGGCACAGGAAT	

sulfate−polyacrylamide gel (12%) and separated by electrophoresis. The separated protein was transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated in Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20% and 5% nonfat milk for 30 min at room temperature to block nonspecific protein binding. Then, the membrane was incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody diluted 1:1,000: 3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase (HSD3B1, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France, reference PA5-106895), cytochrome P450 11a1 (CYP11A1, Thermo Fisher Scientific, reference PA5-37359), steroidogenic acute regulatory (STAR, Thermo Fisher Scientific, reference PA5-21687), P450 aromatase (CYP19A1, Serotec, Varilhes, France), and vinculin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France, reference V9131). The next day, the membrane was incubated for 90 min at room temperature with horseradish peroxidase−conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) diluted 1:5,000. An enhanced chemiluminescence substrate (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) and the G-box SynGene (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) and GeneSnap software (Ozyme) were used to visualize the protein bands. The GeneTools software (version 4.01.02; Syngene) was used to quantify the bands. The results are expressed as the signal intensity of the protein of interest after normalization with the vinculin signal intensity (arbitrary units).

RNA Extraction, Library Preparation, and RNA-seq

Total RNA from CT, GBH13, and GBH34 ovaries (n = 5 per group) was extracted with the RNeasy Midi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and purified with a DNA-free kit (Invitrogen by Life Technologies, Montigny le Bretonneux, France), according to the manufacturer's recommendations. The total RNA quality was assessed with an Agilent Bioanalyzer 2100, using a RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Directional RNA-seq libraries were constructed using the TruSeq Stranded Total RNA library prep kit (Illumina, Évry-Courcouronnes, France), following the manufacturer's instructions, using 750 ng of total RNA. After the Ribo-Zero step, the samples were checked with an Agilent Bioanalyzer for proper ribosomal RNA depletion. The quality of the final libraries was assessed with an Agilent Bioanalyzer, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. The libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced using 2 single-read 75 base pair (bp) runs on an Illumina NextSeq500 instrument, using NextSeq 500 High Output 75 cycles kits.

Sequence Data Filtering

Demultiplexing was done (bcl2fastq2 V2.15.0) and adapters were removed (Cutadapt1.3); only reads longer than 10 bp were kept for analysis.

Read Mapping and Gene Identification

The reads were analyzed by using the nfcore/RNASeq pipeline (https://nf-co.re/rnaseq/doi:10.5281/zenodo.1400710). Following quality and adapter trimming with trim_galore, the reads were mapped to the GRCg7b *Gallus gallus* genome (GCF_016699485.2) using STAR. Various tools integrated into the pipeline, including RSeQC, QualiMap, and dupRadar, were employed to assess sample quality and mapping. Transcripts were identified with geneIDs by using the gene transfer format, and the number of reads for each messenger RNA (**mRNA**) was quantified with the SALMON software tool. The corresponding filtered annotation file contained 18,023 protein-coding genes. The raw sequencing data were available in the EMBL database with the accession number PRJEB72648 (https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB72648).

Differential Expression Analysis

Normalization of read counts (using the TMM method) and differential expression analysis were performed with the edgeR R/Bioconductor package (Robinson et al., 2010). Genes with a false-discovery rate (**FDR**)-adjusted P-value < 0.05 (Benjamini−Hochberg method; do i: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x) and absolute log fold-change (|logFC|) > 0.5 were considered to be statistically significant. Upregulated genes showed

higher expression in the GBH13 or GBH34 group compared with the CT group (|logFC| > 0.5). Downregulated genes showed lower expression in the GBH13 or GBH34 group compared with the CT group. AVenn diagram was prepared with the ggvenn package in R to summarize the number of upregulated and downregulated genes.

Gene Network Analysis

The Gene Ontology (GO) enrichment analysis was carried out by using the R/Bioconductor gprofiler2 package (for biological process, molecular function, and cellular component). The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (**KEGG**) enrichment analysis employed the WikiPathways networks (Kolberg et al., 2023). In addition, similar GO terms were grouped based on their semantic similarity with the rrvgo package in R (Sayols et al., 2023). Finally, the genes associated with each GO term are illustrated using network graphs, which were generated with the enrichplot package in R.

In Vitro Ovarian Explant Culture

Ovaries from 80 chicks (10 d old) were collected by dissection after slaughtering and kept in saline solution for about 30 min at room temperature before use. For each culture, 16 ovaries were pooled and cut into small pieces (1 mm in diameter). The equivalent of 2 ovaries was cultured in each well of a 96-well culture plate for 24 h with various GBH concentrations in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (**DMEM**; Sigma-Aldrich, l'Isle-d'Abeau Chesnes, France) with 1% fetal bovine serum. Conditioned culture medium was collected and stored at -20°C and ovarian explants were collected and stored at -80°C before use for hormonal assays and RT-qPCR, respectively. Five independent cultures were performed (one culture per week for 5 weeks).

Progesterone and Estradiol Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

The progesterone and estradiol concentrations in culture medium from ovarian explants were measured after 48 h of treatment using ELISAs (Cayman Chemicals, Montluçons, France) based on a previous study (Canepa et al., 2008). The intra- and inter-assay coefficients of variation were <10% and <8%, respectively. The results are expressed as the concentration of progesterone and estradiol (ng/mL) per 100 μg of protein. The data were obtained from 5 independent cultures.

Statistical Analysis

GraphPad Prism version 10 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for all analyses. The data are presented as the mean ± the standard error of the mean. All data are reported as boxplots (minimum to maximum, with all points shown). Outliers were identified with the ROUT method and removed. The data were analyzed with 1- or 2-way analysis of variance (**ANOVA**) followed by Tukey's honestly significant difference test to compare the means of each group. For the 2-way ANOVA, the 2 factors were GBH concentration (**GBH**) and time effect. A P-value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Chronic Dietary GBH Exposure Dose Dependently Reduced Food Intake in Young Female Broilers

The amount of food consumed by the young female broilers over time is shown in Figure 2A; this information allowed us to calculate the estimated amount of GLY and AMPA ingested each day (Figures 2B and 2C, respectively). Of the 3 groups, the CT broilers ate the most (75 ± 1.6% of the given food), followed by the GBH13 broilers (55.2 ± 1.2% of the given food) and the GBH34 broilers (31.5 ± 2.0% of the given food). There was a significant difference between the 3 groups on D3 of the experiment (Figure 2A; $P < 0.001$). Despite the different food intake, the GBH34 broilers ingested 1.5 to 2 times more GLY and AMPA than the GBH13 broilers ($P < 0.0001$). Body weight gain followed the same pattern of food intake: The CT broilers gained significantly more weight than the GBH13 broilers on D9, D16, and D25 (Figure 2D; $P < 0.0001$). The GBH34 broilers had a significantly thicker abdominal fat layer on D9 and D25 (Figure 2E; $P < 0.0001$). Moreover, the GBH13 broilers had a higher body weight and were fatter than the GBH34 broilers (Figures 2D and 2E; $P < 0.0001$). The FCR was significantly higher in the GBH34 broilers than in the GBH13 and CT broilers at all 3 time points (P < 0.0001 on D9 and D25, and P = 0.0004 on D16; Figure 2F) whereas the GBH13 broilers had a higher FCR than the CT broilers only on D9 (Figure 2F; $P = 0.02$).

Plasma GLY and AMPA Concentrations

On D25, the plasma GLY concentration was significantly higher in the GBH34 broilers than in the GBH13 broilers (Figure 3A; $P < 0.0001$). However, there was no significant difference in the plasma AMPA concentration between the GBH13 and GBH34 broilers, although there was a trend for a higher concentration in the GBH34 broilers (Figure 3B; $P = 0.055$). Plasma oxidative stress, based on the TBARS assay, was significantly increased in the GBH13 and GBH34 broilers (Figure 3C; $P < 0.0001$).

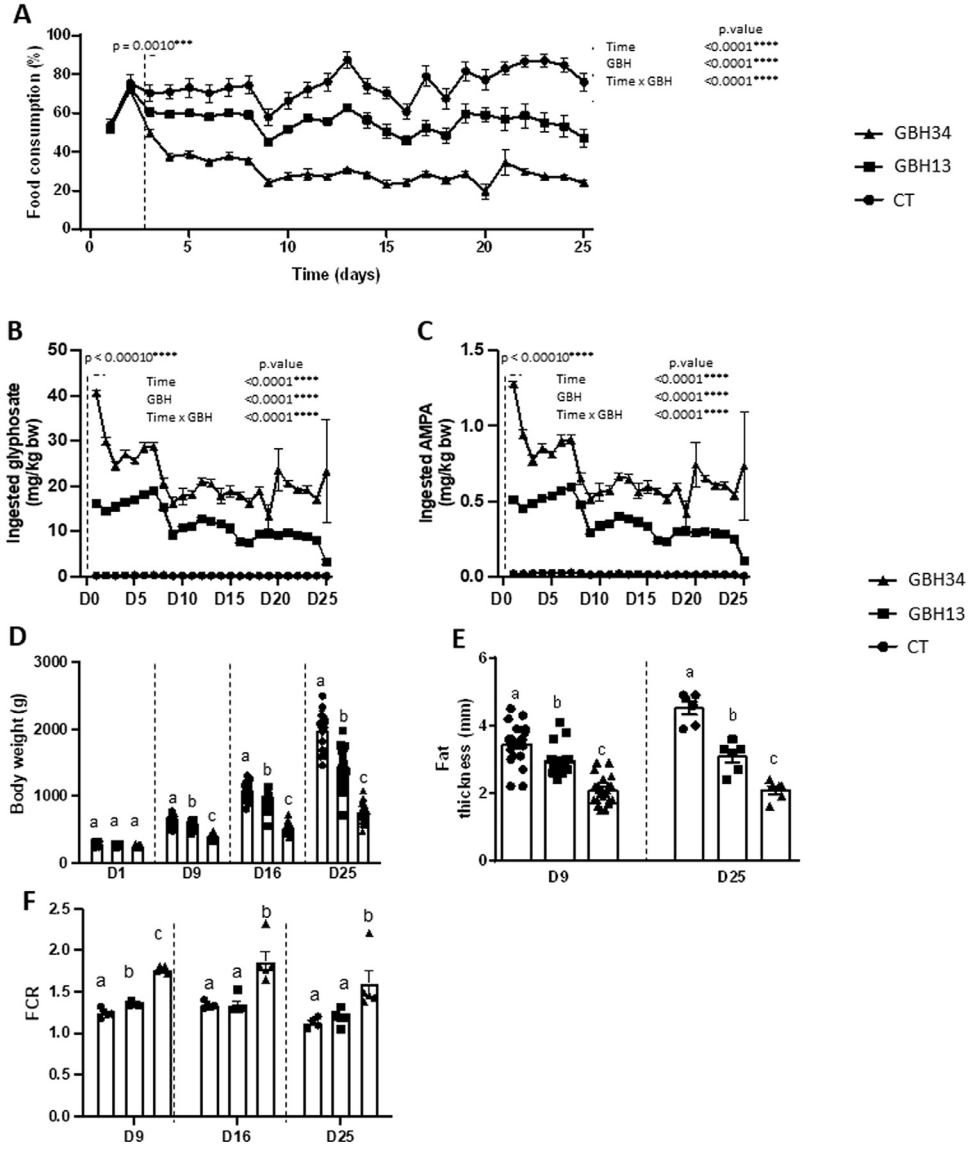


Figure 2. (A) The effect of chronic dietary exposure to 2 glyphosate (**GLY**)-based herbicide (**GBH**) concentrations on food intake in growing broilers. Eleven-day-old female broilers were exposed to GBH in the diet for 25 d, corresponding to a dose of 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group, n = 20) or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group, n = 20). The control group (CT, n = 20) received a normal diet. The daily food consumption is shown as a percentage of the total food given (mean ± standard error of the mean). The *P*-values for the time (days), GBH exposure, and the time × GBH interaction are presented. The daily concentration of ingested equivalent (B) GLY and (C) AMPA (mg/kg body weight) in the CT, GBH13, and GBH34 broilers (n = 20 per group). The results are presented as mean ± the standard error of the mean. The *P*-values for the time (days), GBH exposure, and the time × GBH interaction are presented. The evolution of (D) body weight (g) on d 1 (D1), D9, D16, and D25 of the experiment; (E) fat thickness (mm) on D9 and D25; and (F) the feed conversion ratio (FCR) on D9, D16, and D25 in the CT, GBH13, and GBH34 broilers (n = 20 per group). The results are presented as the mean ± the standard error of the mean. For each day, different letters indicate significant differences determined with 1-way analysis of variance followed by Tukey's honestly significant difference test for pairwise comparisons ($P < 0.05$).

Chronic Dietary GBH Exposure Modified the Relative Ovary and Abdominal Adipose Tissue Weights

The GBH34 broilers had a significantly heavier relative ovary weight compared with the CT and GBH13 broilers (Figure 4A; $P = 0.001$). On the other hand, the relative abdominal adipose tissue weight was significantly lower in the GBH34 broilers compared with the GBH13 and CT broilers (Figure 4B; $P < 0.0001$). The relative ovary and abdominal adipose tissue weights were similar between the CT and GBH13 broilers. The relative spleen weight was not significantly different between the CT, GBH13, and GBH34 groups (Figure 4C).

Alteration of the Ovarian Transcriptome by Chronic Dietary GBH Exposure in Young Broilers

RNA-seq analysis revealed that the ovarian transcriptome was strongly affected by the chronic dietary GBH exposure. Compared with the CT ovaries, there were

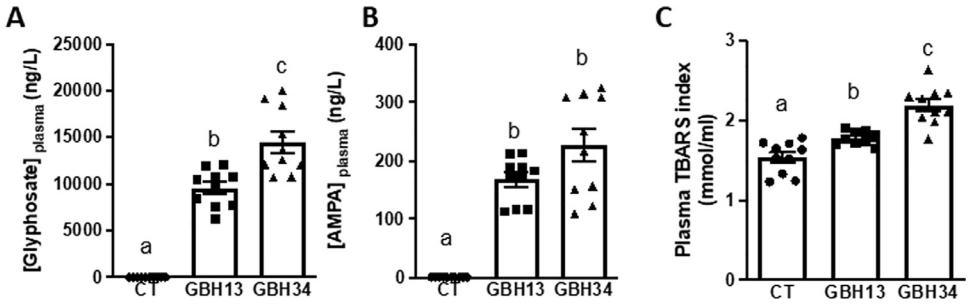


Figure 3. The plasma (A) glyphosate (**GLY**, ng/L) and (B) aminomethylphosphonic acid (**AMPA**, ng/L) concentrations and the thiobarbituric acid-reactive substances (**TBARS**) index in the control (**CT**), GBH13, and GBH34 broilers on d 25 of the experiment. Eleven-day-old female broilers were exposed to GBH in the diet for 25 d, corresponding to a dose of 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group, n = 10) or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group, n = 10). The CT group (n = 10) received a normal diet. The results are presented as the mean ± standard error of the mean. Different letters indicate significant differences determined with one-way analysis of variance followed by Tukey's honestly significant difference test for pairwise comparisons ($P < 0.05$).

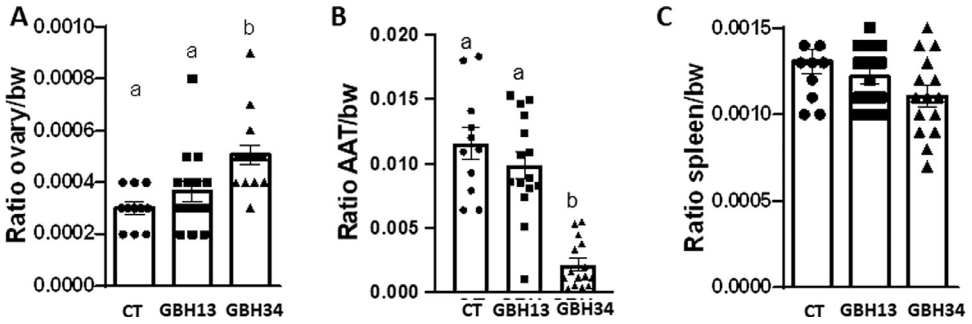


Figure 4. The weight of the (A) ovaries, (B) abdominal adipose tissue, and (C) spleen relative to the body weight in the control (**CT**), GBH13, and GBH34 broilers on d 25. Eleven-day-old female broilers were exposed to GBH in the diet for 25 d, corresponding to a dose of 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group, n = 20) or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group, n = 20). The CT group (n = 20) received a normal diet. The results are presented as the mean ± the standard error of the mean. Different letters indicate significant differences determined with 1-way analysis of variance followed by Tukey's honestly significant difference test for pairwise comparisons ($P < 0.05$).

935 differentially expressed genes (**DEG**) in the GBH34 ovaries, 253 DEGs in the GBH13 ovaries, and 295 common DEGs in the GBH13 and GBH34 ovaries (Figure 5). All DEGs, up- and down-regulated genes was provided as Supplementary Table 2.

The GO enrichment analysis for the CT vs. GBH34, CT vs. GBH13, and GBH13 versus GBH34 comparisons are presented in Figures 6A, 7A, and 8A, respectively. The DEGs with |logFC| > 0.5 for the CT versus GBH34, CT versus GBH13, and GBH13 versus GBH34 comparisons are presented in Figures 6B, 7B, and 8B, respectively. For biological process, the most abundant GO terms for the GBH34 versus CT comparison were related to sterol and cholesterol metabolic processes and axoneme assembly (Figure 6A). Genes involved in the steroidogenesis process such as STAR (a cholesterol carrier) and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase enzyme (**HSDB1**) were significantly reduced in the GBH34 compared with the CT ovaries (Figure 6B). However, radial spoke head 1 homolog (**RSPH1**), which is involved in primary ciliary dyskinesia and contributes to axoneme assembly, and hormone-sensitive lipase, HSL (**LIPE**) showed higher expressed in GBH34 ovaries (Figure 6B). For the GBH13 versus CT comparison, the most abundant GO terms were RNA processing and metabolic processes (Figure 7A). Genes involved in these processes showed higher expression in the GBH13 ovaries compared with the CT ovaries. However, we also found a significant reduction in a steroidogenic enzyme, CYP19A1, in the GBH13 ovaries (Figure 7B). The most important GO terms observed for the GBH34 versus GBH13 comparison were related to synapse and trans-synaptic signaling, secretory vesicle, and calcium ion-regulated exocytosis of neurotransmitters (Figure 8A). In addition, we observed an increase in the axonogenic processes and a decrease in cholesterol processes with a significant reduction in STAR expression (Figure 8B)

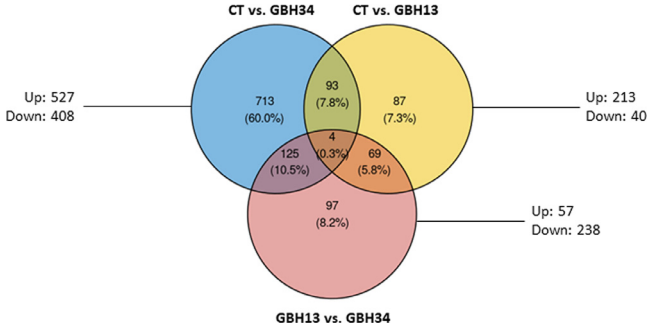


Figure 5. Venn diagram of differentially expressed genes in the ovaries of control (**CT**), GBH13, and GBH34 broilers on d 25. Eleven-day-old female broilers were exposed to GBH in the diet for 25 d, corresponding to a dose of 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group) or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group). The CT group received a normal diet.

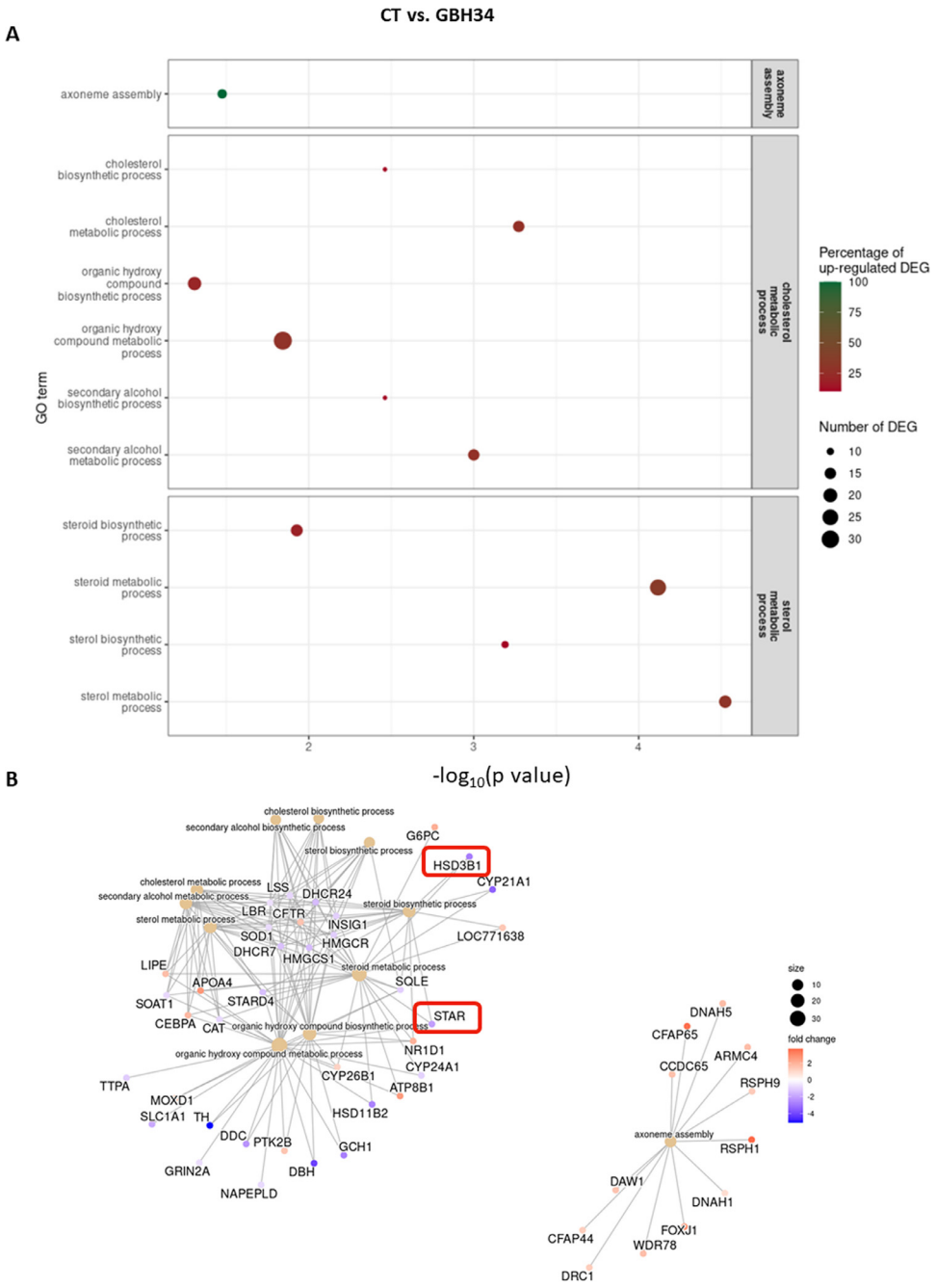


Figure 6. (A) The top 3 enriched gene ontology (**GO**) terms of differentially expressed genes (**DEG**) in the ovaries for the control (**CT**, n = 5) vs. GBH34 (n = 5) comparison on d 25 of the experiment. The size of the dots is positively correlated with the number of DEGs in the pathway. (B) Gene interaction network of the DEGs in the CT and GBH34 ovaries. The network nodes and edges represent gene and gene−gene associations, respectively. The red and purple nodes indicate the upregulated and downregulated genes, respectively. The size of the dots is positively correlated with the number of DEGs in the pathway.

Alteration of the Ovarian Expression of Steroidogenic Factors and Other Genes by Chronic Dietary GBH Exposure in Young Broilers

We next validated our RNA-seq data by evaluating the mRNA and protein expression of steroidogenic factors and other genes after chronic dietary GBH exposure. As shown in Figure 9A, the GBH13 and GBH34 ovaries showed significantly reduced mRNA expression of *CYP11A1* ($P < 0.0001$), *CYP19A1* ($P < 0.0001$), and *HSD3B1* ($P = 0.004$). Moreover, the GBH34 ovaries showed markedly reduced *STAR* mRNA expression ($P = 0.012$). Similarly to the mRNA expression, CYP19A1 and STAR protein expression was significantly reduced to levels almost undetectable in the GBH13 ovaries (Figure 9B; $P = 0.010$ and $P = 0.011$, respectively). The CYP19A1 and STAR protein levels

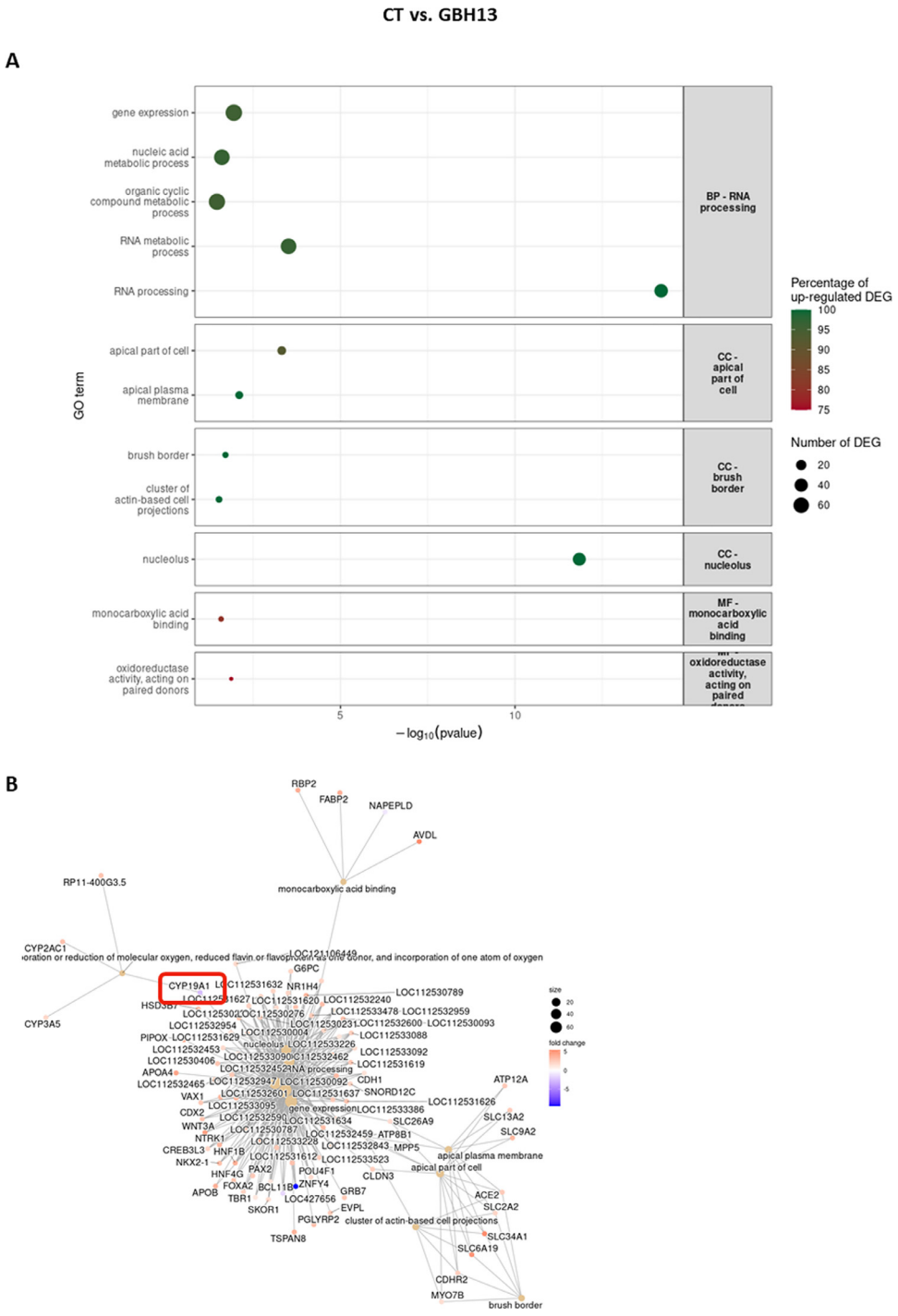


Figure 7. (A) The top 6 enriched gene ontology (**GO**) terms of differentially expressed genes (**DEG**) in the ovaries of the control (**CT**, n = 5) vs. GBH13 (n = 5) comparison. The size of the dots is positively correlated to the number of DEGs in the pathway. (B) Gene interaction network of the DEGs in the CT and GBH13 ovaries. The network nodes and edges represent gene and gene−gene associations, respectively. The red and purple nodes indicate the upregulated and downregulated genes, respectively. The size of the dots is positively correlated with the number of DEGs in the pathway.

tended to be partially restored in the GBH34 ovaries (CT vs. GBH34, $P = 0.2$ and $P = 0.09$, respectively). CYP11A1 protein expression was not significantly different between the CT, GBH13, and GBH34 ovaries ($P = 0.3$). Nonetheless, it appeared to be higher in the GBH34 ovaries and lower in the GBH13 ovaries (the measured protein level was near zero for most samples). The HSD3B1 protein level was significantly increased in the GBH34 ovaries ($P = 0.0014$). RT-qPCR also validated the RNA-seq data by showing changes in the GBH13 and GBH34 ovaries compared with the CT ovaries for other genes, including 2 genes that encode lipid metabolism regulators (*HMGCR* and *THRSP*), 2 genes that encode antioxidant enzymes (*CAT* and *GPX1*), and a gene that encodes a protein involved in immunity (*COLEC12*) (Table 2).

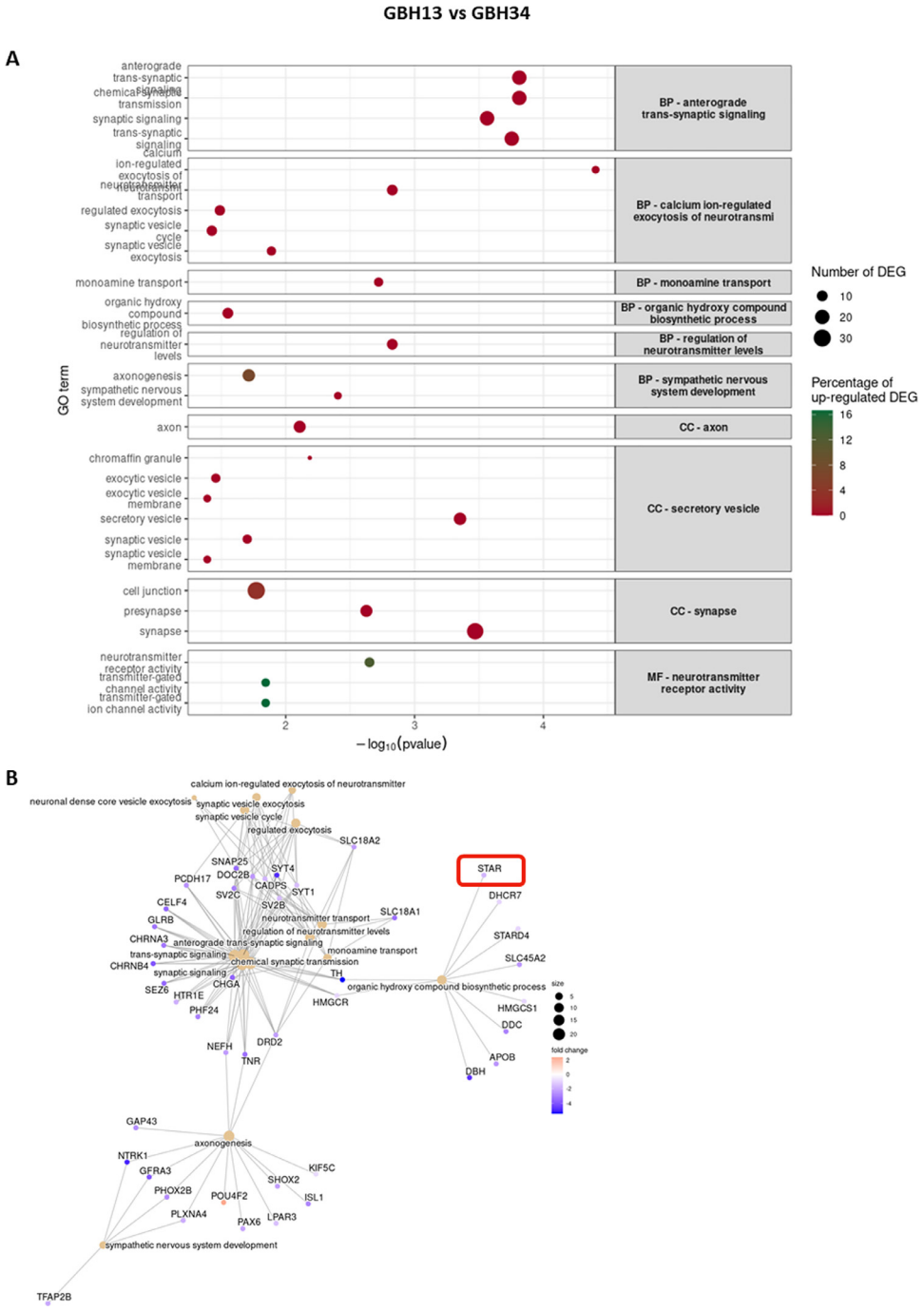


Figure 8. (A) The top 10 enriched gene ontology (**GO**) terms of differentially expressed genes (**DEG**) in the ovaries of the GBH13 (n = 5) vs. GBH34 (n = 5) comparison. The size of the dots is positively correlated to the number of DEGs in the pathway. (B) Gene interaction network of the DEGs in the CBH13 and GBH34 ovaries. The network nodes and edges represent gene and gene−gene associations, respectively. The red and purple nodes indicate the upregulated and downregulated genes, respectively. The size of the dots is positively correlated with the number of DEGs in the pathway.

Reduced Steroid Production by GBH-Treated Ovarian Explants From Young Broilers

We investigated the effects of GBH treatment on steroid production in ovarian explants from young broilers. GBH dose dependently reduced progesterone (Figure 10A; $P < 0.0001$) and estradiol (Figure 10B; $P < 0.0001$) release by ovarian explants. Moreover, GBH treatment dose dependently reduced *STAR, HSD3B1*, and *CYP19A1* mRNA expression ($P < 0.0001$ for all 3 transcripts), but had no effect on *CYP11A1* mRNA expression ($P > 0.05$). Thus, the decrease in steroid secretion in response to GBH may be due to a reduction in *STAR, HSD3B1* and *CYP19A1* expression.

DISCUSSION

We have shown for the first time that chronic dietary GBH exposure alters metabolic and ovarian functions in growing broilers. Indeed, GBH exposure dose dependently reduced food intake, body weight, and fattening,

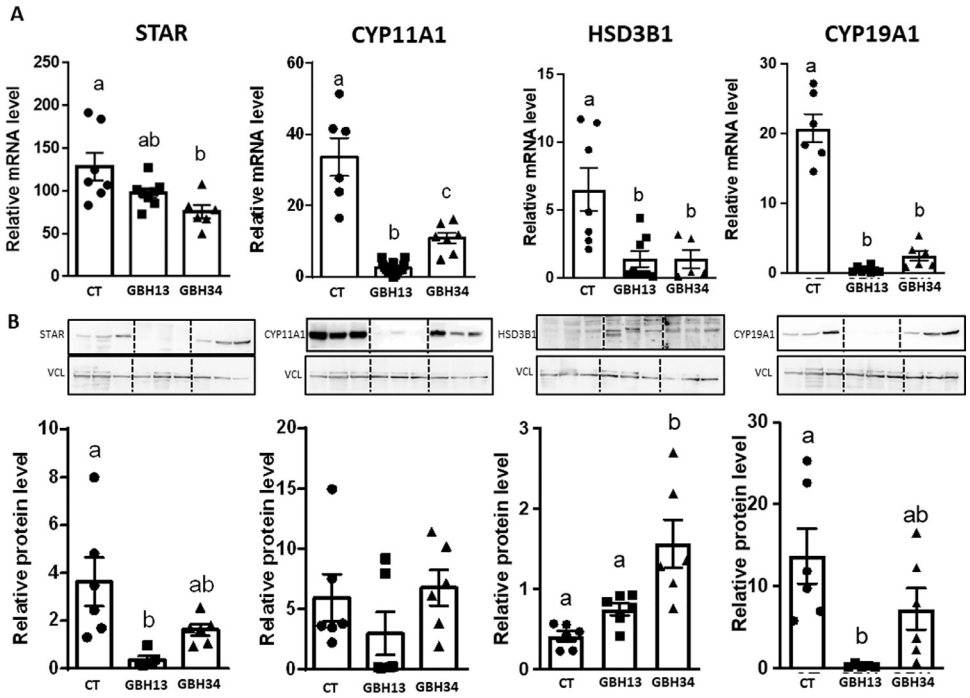


Figure 9. The (A) messenger RNA (mRNA, n = 8 per group) and (B) protein (n = 6 per group) expression of steroidogenic factors (STAR, HSD3B1, CYP11A1 and CYP19A1) in control (CT), GBH13, and GBH34 ovaries on d 25. Eleven-day-old female broilers were exposed to GBH in the diet for 25 d, corresponding to a dose of 13 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH13 group) or 34 mg GLY equivalent/kg body weight/d (the GBH34 group). The CT group received a normal diet. The results are presented as the mean ± the standard error of the mean. Different letters indicate significant differences determined with 1-way analysis of variance followed by Tukey's honestly significant difference test for pairwise comparisons ($P < 0.05$).

and increased plasma GLY, AMPA, and oxidative stress. Furthermore, the relative ovary weight was increased in GBH-treated broilers. Ovarian transcriptomic analyses using RNA-seq showed that steroidogenesis, sterol, and cholesterol metabolic processes were altered in response to GBH exposure. We validated the RNA-seq data with RT-qPCR of whole ovaries as well as in ovarian explants treated with GBH.

In the present study, the CT, GBH13, and GBH34 broilers received the same amount of food during the experiment; however, we found that the more GBH the food contained, the less the broilers consumed. Although the GBH34 broilers consumed less food than the GBH13 broilers, we estimated that they ingested more GLY and AMPA. These calculations were confirmed by the plasma GLY and AMPA concentrations. We noted that the CT broilers gained the most weight and fat of the 3 groups. The reason why the GBH13 broilers gained less weight and fat was likely due to the reduced food intake. The GBH34 broilers, who ate the least amount of food, showed the lowest weight and fat gain during the experiment. We propose 2 hypotheses to explain the rejection of the diet containing GBH: 1) GBH gives the food an unpleasant tase, so the broilers eat less; and 2) GBH produces a feeling of satiety, so the broilers eat less. GBH enrichment is known to decrease food consumption in birds (Evans & Batty, 1986). When that study was published, the authors also could not explain the exact reason for this observation. It is quite surprising that very few studies have focused on the rejection of GLY-containing food in animals, given that palatability is a crucial parameter of feeding behaviors. We tend to prefer our second hypothesis given that all 3 broiler groups ate the same amount of food during the first days of the experiment, suggesting that the taste of the food did not disturb them (of note, the broilers were not subjected to food restriction before the experiment began). Only the relative ovary weight was affected by the addition of GBH: The ovaries were heavier in the GBH34 broilers. A previous study showed that oral administration of

Table 2. Relative expression of various genes in hens' ovaries (CT, n = 8, GBH13, n = 8, GBH34, n = 8).

		CT	GBH13	GBH34	*P* value
Oxidative stress	*Catalase*	0.69 ± 0.10^{a}	0.14 ± 0.01^{b}	0.46 ± 0.11^{a}	0.0002
	GPX1	6.97 ± 0.81^{a}	4.45 ± 0.53^{b}	4.01 ± 0.41^{b}	0.0076
Immunity	*COLEC12*	0.19 ± 0.04^{a}	0.02 ± 0.003^{b}	0.10 ± 0.02^{b}	0.0003
Lipid metabolism	*HMGCR*	9.84 ± 3.56^{a}	0.11 ± 0.01^{b}	1.56 ± 0.86^{b}	0.0119
	THRSP	7.84 ± 2.90^{a}	0.01 ± 0.004^{b}	1.13 ± 0.69^{ab}	0.0187

Results are presented as mean ± SEM of the several target gene mRNA, expression relative to the geometric mean of 3 housekeeping genes expression (*GAPDH, EEF1α* and *β-actin*); Letters indicate statistical significance. CT, control; GBH13, [glyphosate equivalent] = 13 mg/kg body weight/d, GBH34, [glyphosate equivalent] = 34 mg/body weight/d.

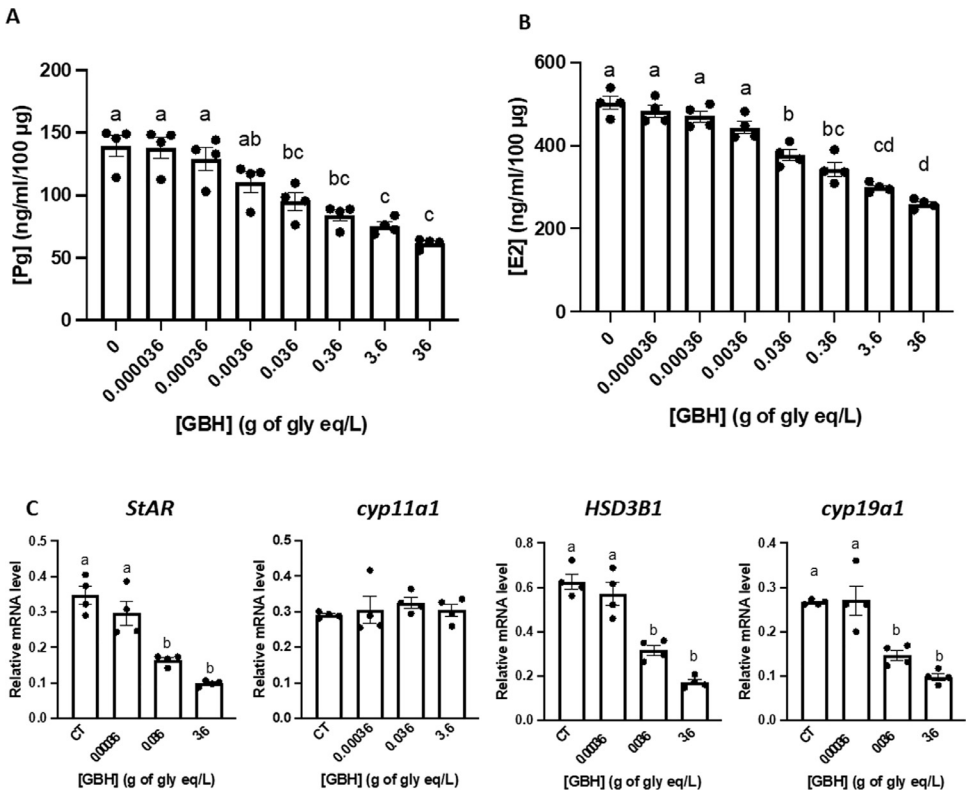


Figure 10. The effect of glyphosate-based herbicide (**GBH**) on in vitro steroid production by chicken ovarian explants. Conditioned culture medium was collected after 24-h exposure to GBH (0.000036−36 g glyphosate/L), and the (A) progesterone (Pg) and (B) estradiol (E2) concentrations were measured with enzyme-linked immunosorbent assays. (C) Total RNA was extracted from ovarian explants, and *HSD3B1, STAR, CYP11A1*, and *CYP19A1* messenger RNA (**mRNA**) expression was determined. The data are expressed as the mean ± the standard error of the mean of 5 replicates (one replicate is representative of approximately 2 ovaries for each condition). Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

GBH or GLY alone could modulate ovarian steroidogenic enzymes transcription in pregnant mice (Ren et al., 2018). In that study, the authors administered GBH to the animals through the drinking water. Consequently, their water consumption was lower, but not their food consumption. Still, their body weight was negatively affected by the treatment. This means that the growth reduction we observed in young broilers could be due to reduced feed intake as well as energy imbalance caused by the GBH ingestion. This energy imbalance could ultimately lead to the steroidogenic disruptions we detected, given that lipids and sterols play key roles in steroidogenesis.

In vitro exposure of ovarian explants to increasing GBH concentrations seemed to trigger similar dynamics, as it reduced the estradiol and progesterone concentrations in the culture medium. This indicates the likely involvement of another mechanism in the steroidogenic impairment in the GBH13 broilers. Another possible cause could then be the induction of oxidative stress, which would impair steroidogenesis. Oxidative stress induction by GBH has widely been discussed (Kwiatkowska et al., 2014; Owagboriaye et al., 2019; Turkmen et al., 2019). Here, *catalase* and *GPX1* transcripts levels were significantly reduced after GBH administration, suggesting an increase in hydrogen peroxide and other organic hydroperoxides. Considering the important role of lipids in steroidogenesis, lipid peroxidation could explain the reduction in steroid synthesis, as steroidogenic enzymes are very sensitive to this phenomenon (Takayanagi et al., 1986). We detected reduced *HMGCR* and *THRSP* transcript levels; these genes encode proteins that are involved in lipid and sterol dynamics.

The higher ovary weight in the GBH34 broilers prompted us to perform RNA-seq to evaluate changes in transcripts in response to the GBH exposure. In the GBH34 broilers, most of the genes affected were related to cholesterol and sterol metabolic process, such as *HSD3B1, HSD11B2*, and *STAR*, which were downregulated in the GBH34 broilers compared with the CT broilers. We confirmed these results with RT-qPCR. This analysis also showed that the *CYP11A1* and *CYP19A1* transcripts were downregulated in the GBH13 and GBH34 broilers, but with a stronger effect in the GBH13 broilers. The CYP19A1, CYP11A1, and STAR protein levels followed the same U-shaped pattern as their mRNAs. However, in the GBH34 broilers, the HSD3B1 protein level was surprisingly high, while its mRNA level was low. This type of non-monotonic U-shaped curve is reminiscent of what we can observe for some endocrine-disrupting chemicals (**EDC**; Vandenberg, 2014). Numerous studies have noted that GLY could be an EDC (Muñoz et al., 2021). Our results are support this view: GLY seems to act as an EDC in young broiler ovaries.

In a previous study, we showed that GBH is weakly biotransformed in adult female broiler liver (Fréville et al., 2022). Dietary GBH administration did not modulate the transcription of hepatic biotransformation genes, suggesting that it is eliminated unchanged in the urine and feces. Researchers have reached similar conclusions with other models (Williams et al., 2000; Panzacchi et al., 2018). Nonetheless, we observed that chronic dietary GBH exposure dose dependently altered the mRNA expression of several cytochrome P450s. A study showed that in ovo administration of GLY and/or GBH could affect the mRNA expression of some cytochrome P450s in young broiler embryos (Fathi et al., 2020). Some of the overexpressed cytochrome P450 are known to be linked to pollutant families. For example, *CYP1A4* transcription is known to be induced by dioxin-related compounds (Head & Kennedy, 2007; Kubota et al., 2008). Of note, GBHs comprise GLY as well as other products that help GLY exercise its herbicidal properties. Although some of them have been well described, like polyethoxylated tallow amines (**POEA**; Martins-Gomes et al., 2022), the exact recipe for most GBHs remains confidential. Therefore, we cannot designate a single compound as responsible for the effects we detected. However, we do know the exact GLY concentrations to which the broilers were exposed: 0.086 and 0.215 mg/kg food for the GBH13 and GBH34 groups, respectively. These concentrations are notably lower than what is found in cereals after GBH spread on fields (Eason & Scanlon, 2002). Thus, it is not incongruous to think that the effects we observed in broilers could be observed in wild birds. Nevertheless, GLY is not very persistent in soil, as its half-life in agricultural soil varies from 4 to 19 d, depending on the nature of the soil (Al-Rajab & Schiavon, 2010). Any conclusions drawn from our results must be balanced by the fact that wild animals are not actually exposed to a constant dose of GBH through their diet. Moreover, not all of the observed effects can be attributed to GBH or starvation-induced disorders; they are probably a combination of both.

CONCLUSIONS

We showed that chronic dietary GBH alters feeding behavior in young female broilers, leading to a reduction in growth performance and an increase in plasma oxidative stress. These alterations were accompanied by a significant reduction in ovarian steroidogenesis, suggesting that GBHs are potential EDCs. Future work should focus on exploring the mechanisms leading GBHs to alter hormones dynamics. The ovarian transcriptomic data from young female broilers subjected to chronic dietary GBH exposure identified potential regulatory networks associated with GBH. These data provide valuable support for understanding the ovarian transcriptional regulatory mechanism of GBHs in growing broilers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to all the UEPEAT team for the animal care. We also acknowledge the sequencing and bioinformatics expertise of the I2BC High-throughput sequencing facility, supported by France Génomique (funded by the French National Program "Investissement d'Avenir" ANR-10-INBS-09). The authors thank the ministry of research for the Mathias Freville's financial support.

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.psj.2024.103767.

REFERENCES

Al-Rajab, A. J., and M. Schiavon. 2010. Degradation of 14C-glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in three agricultural soils. J. Environ. Sci. 22:1374–1380.

Armstrong, D., and R. Browne. 1994. Armstrong, D. (Ed.). (1994). The Analysis of Free Radicals, Lipid Peroxides, Antioxidant Enzymes and Compounds Related to Oxidative Stress as Applied to the Clinical Chemistry Laboratory," in Free Radicals in Diagnostic Medicine Advances in Experimental Medicine And Biology 366:43–58.

Canepa, S., A. Lainé, A. Bluteau, C. Fagu, C. Flon, and D. Monniaux. 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. Cah. Des. Tech. De. l'INRA. 64:19–30.

Casassus, B. 2023. EU allows use of controversial weedkiller glyphosate for 10 more years. Nature, doi:10.1038/d41586-023-03589-z. https://www.nature.com/articles/d41586-023-03589-z.

Cressey, D. 2015. Widely used herbicide linked to cancer. Nature: nature 2015:17181.

Eason, T. H., and P. F. Scanlon. 2002. Effects of atrazine and glyphosate ingestion on body weight and nutritional well-being of Coturnix quail. Z. Für Jagdwiss. 48:281–285.

Estienne, A., M. Reverchon, A. Partyka, G. Bourdon, J. Grandhaye, A. Barbe, E. Caldas-Silveira, C. Rame, W. Niżański, P. Froment, and J. Dupont. 2020. Chemerin impairs in vitro testosterone production, sperm motility, and fertility in chicken: possible involvement of its receptor CMKLR1. Cells 9:1599.

Estienne, A., M. Fréville, O. Bernardi, C. Ramé, L. Calandreau, F. Cornilleau, P. Ganier, M. Chahnamian, P. Froment, and J. Dupont. 2023. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide in broiler hens has long-term impacts on the progeny metabolism. Poult. Sci. 102:102877.

Estienne, A., M. Fréville, G. Bourdon, C. Ramé, J. Delaveau, C. Rat, M. Chahnamian, A. Brionne, P. Chartrin, H. Adriensen, F. Lecompte, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. Ecotoxicol. Environ. Saf. 241:113741.

Evans, D. D., and M. J. Batty. 1986. Effects of high dietary concentrations of glyphosate (roundup®) on a species of bird, marsupial and rodent indigenous to Australia. Environ. Toxicol. Chem. 5:399–401.

Fathi, M. A., G. Han, R. Kang, D. Shen, J. Shen, and C. Li. 2020. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. Environ. Sci. Pollut. Res. 27:16865–16875.

Fogliatto, S., A. Ferrero, and F. Vidotto. 2020. Chapter Six - Current and future scenarios of glyphosate use in Europe: Are there alternatives? Adv. Agron. 163:219–278.

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, M. Chahnamian, C. Staub, E. Venturi, J. Lemarchand, E. Maximin, A. Hondelatte, O. Zemb, C. Canlet, R. Guabiraba, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. Front. Physiol. 13:974688.

Grandhaye, J., V. Douard, A. Rodriguez-Mateos, Y. Xu, A. Cheok, A. Riva, R. Guabiraba, O. Zemb, C. Philippe, M. Monnoye, C. Staub, E. Venturi, A. Barbe, C. Ramé, J. Dupont, and P. Froment. 2020. Microbiota changes due to grape seed extract diet improved intestinal homeostasis and decreased fatness in parental broiler hens. Microorganisms 8:1141.

Geng, Y., L. Jiang, D. Zhang, B. Liu, J. Zhang, H. Cheng, L. Wang, Y. Peng, Y. Wang, Y. Zhao, Y. Xu, and X. Liu. 2021. Glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium in agricultural groundwater and surface water in China from 2017 to 2018: occurrence, main drivers, and environmental risk assessment. Sci. Total Environ. 769:144396.

Gill, J. P. K., N. Sethi, A. Mohan, S. Datta, and M. Girdhar. 2018. Glyphosate toxicity for animals. Environ. Chem. Lett. 16:401–426.

Grotto, D., L. D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M. F. Charão, A. M. Moro, et al. 2007. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography−visible detection. J. Pharm. Biomed. Anal. 43:619–624.

Head, J. A., and S. W. Kennedy. 2007. Differential expression, induction, and stability of CYP1A4 and CYP1A5 mRNA in chicken and herring gull embryo hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 145:617–624.

Inger, R., R. Gregory, J. P. Duffy, I. Stott, P. Voříšek, and K. J. Gaston. 2015. Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. Hill, J (Ed.). (2015). Common European birds are declining rapidly while less abundant species' numbers are rising. Ecol. Lett. 18:28–36.

Jiang, K., Z. Ma, Z. Wang, H. Li, L. Wang, Y. Tian, D. Li, and X. Liu. 2020. Evolution, expression profile, regulatory mechanism, and functional verification of EBP-like gene in cholesterol biosynthetic process in chickens (Gallus Gallus). Front. Genet. 11:587546.

Jin, K., Q. Zuo, J. Song, Y. Zhang, G. Chen, and B. Li. 2020. CYP19A1 (aromatase) dominates female gonadal differentiation in chicken (Gallus gallus) embryos sexual differentiation. Biosci Rep 10:BSR20201576.

Kolberg, L., U. Raudvere, I. Kuzmin, P. Adler, J. Vilo, and H. Peterson. 2023. g:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). Nucleic Acids Res 51:W207–W212.

Kubota, A., H. Iwata, and E.-Y. Kim. 2008. Catalytic function of avian cytochrome P450 1A4 and 1A5 (CYP1A4 and CYP1A5) enzymes heterologously expressed using in vitro yeast system. Mar. Environ. Res. 66:154–155.

Kwiatkowska, M., B. Huras, and B. Bukowska. 2014. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (in vitro). Pestic. Biochem. Physiol. 109:34–43.

Martins-Gomes, C., T. L. Silva, T. Andreani, and A. M. Silva. 2022. Glyphosate vs. glyphosate-based herbicides exposure: a review on their toxicity. J. Xenobiotics 12:21–40.

Muñoz, J. P., T. C. Bleak, and G. M. Calaf. 2021. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: a review. Chemosphere 270:128619.

Owagboriaye, F., G. Dedeke, K. Ademolu, O. Olujimi, A. Aladesida, and M. Adeleke. 2019. Comparative studies on endogenic stress hormones, antioxidant, biochemical and hematological status of metabolic disturbance in albino rat exposed to roundup herbicide and its active ingredient glyphosate. Environ. Sci. Pollut. Res. 26:14502–14512.

Panzacchi, S., D. Mandrioli, F. Manservisi, L. Bua, L. Falcioni, M. Spinaci, G. Galeati, G. Dinelli, R. Miglio, A. Mantovani, S. Lorenzetti, J. Hu, J. Chen, M. J. Perry, P. J. Landrigan, and F. Belpoggi. 2018. The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. Environ. Health 17:52.

Ramirez Haberkon, N. B., V. C. Aparicio, and M. J. Mendez. 2021. First evidence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in the respirable dust (PM10) emitted from unpaved rural roads of Argentina. Sci. Total Environ. 773:145055.

Ren, X., R. Li, J. Liu, K. Huang, S. Wu, Y. Li, and C. Li. 2018. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. Environ. Pollut. 243:833–841.

Rigal, S., V. Dakos, H. Alonso, A. Auniņš, Z. Benkő, L. Brotons, T. Chodkiewicz, P. Chylarecki, E. De Carli, J. C. Del Moral, C. Domşa, V. Escandell, B. Fontaine, R. Foppen, R. Gregory, S. Harris, S. Herrando, M. Husby, C. Ieronymidou, F. Jiguet, J. Kennedy, A. Klvaňová, P. Kmecl, L. Kuczyński, P. Kurlavičius, J. A. Kålås, A. Lehikoinen, Å. Lindström, R. Lorrillière, C. Moshøj, R. Nellis, D. Noble, D. P. Eskildsen, J.-Y. Paquet, M. Pélissié, C. Pladevall, D. Portolou, J. Reif, H. Schmid, B. Seaman, Z. D. Szabo, T. Szép, G. T. Florenzano, N. Teufelbauer, S. Trautmann, C. Van Turnhout, Z. Vermouzek, T. Vikstrøm, P. Voříšek, A. Weiserbs, and V. Devictor. 2023. Farmland practices are driving bird population decline across Europe. Proc. Natl. Acad. Sci. 120:e2216573120.

Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140.

Romano, R. M., M. A. Romano, M. M. Bernardi, P. V. Furtado, and C. A. Oliveira. 2010. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Arch. Toxicol. 84:309–317.

Ruuskanen, S., M. J. Rainio, C. Gómez-Gallego, O. Selenius, S. Salminen, M. C. Collado, K. Saikkonen, I. Saloniemi, and M. Helander. 2020a. Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: a long-term experiment in an avian model. Environ. Pollut. 266:115108.

Ruuskanen, S., M. J. Rainio, M. Uusitalo, K. Saikkonen, and M. Helander. 2020b. Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model. Sci. Rep. 10:6349.

Sayols, S. 2023. rrvgo: a Bioconductor package for interpreting lists of gene ontology terms. MicroPubl Biol. 18, doi:10.17912/micropub.biology.000811.

Schönbrunn, E., S. Eschenburg, W. A. Shuttleworth, J. V. Schloss, N. Amrhein, J. N. S. Evans, and W. Kabsch. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:1376–1380.

Serra, L., A. Estienne, G. Bourdon, C. Ramé, C. Chevaleyre, P. Didier, M. Chahnamian, S. El Balkhi, P. Froment, and J. Dupont. 2021. Chronic dietary exposure of roosters to a glyphosate-based herbicide increases seminal plasma glyphosate and AMPA concentrations, alters sperm parameters, and induces metabolic disorders in the progeny. Toxics 9:318.

Silva, V., L. Montanarella, A. Jones, O. Fernández-Ugalde, H. G. J. Mol, C. J. Ritsema, and V. Geissen. 2018. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. Sci. Total Environ. 621:1352–1359.

Takayanagi, R., K.-I. Kato, and H. Ibayashi. 1986. Relative inactivation of steroidogenic enzyme activities of *in vitro* vitamin E-depleted human adrenal microsomes by lipid peroxidation*. Endocrinology 119:464–469.

Tarazona, J. V., D. Court-Marques, M. Tiramani, H. Reich, R. Pfeil, F. Istace, and F. Crivellente. 2017. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. Arch. Toxicol. 91:2723–2743.

Turkmen, R., Y. O. Birdane, H. H. Demirel, M. Kabu, and S. Ince. 2019. Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. Toxicol. Res. 8:238–245.

Vandenberg, L. N. 2014. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. Dose-Response 12:259–276.

Walsh, L. P., C. McCormick, C. Martin, and D. M. Stocco. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environ. Health Perspect. 108:8.

Williams, G. M., R. Kroes, and I. C. Munro. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul. Toxicol. Pharmacol. 31:117–165.

Xu, J., S. Smith, G. Smith, W. Wang, and Y. Li. 2019. Glyphosate contamination in grains and foods: an overview. Food Contr. 106:106710.

IV. Estienne et al., 2022

Estienne, A., **Fréville, M.**, Bourdon, G., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., et al. (2022). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. Ecotoxicology and Environmental Safety 241, 113741. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113741.

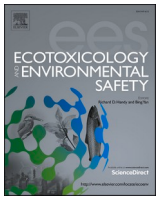
Ecotoxicology and Environmental Safety 241 (2022) 113741



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

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





Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken

Anthony Estienne [a], Mathias Fréville [a], Guillaume Bourdon [a], Christelle Ramé [a], Joël Delaveau [b], Christophe Rat [b], Marine Chahnamian [b], Aurélien Brionne [c], Pascal Chartrin [c], Hans Adriensen [a], François Lecompte [a], Pascal Froment [a], Joëlle Dupont [a,*]

[a] CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, Nouzilly 37380, France
[b] UEPEAT, INRAE, Nouzilly 37380, France
[c] Université de Tours, INRAE, BOA, Nouzilly 37380, France

ARTICLE INFO

Edited by Fernando Barbosa

Keywords:
Glyphosate
Birds
Fertility
Embryo development
Diet

ABSTRACT

Glyphosate (Gly) is the active molecule of non-selective herbicides used in conventional agriculture. Some evidence shows that exposure to Glyphosate-Based Herbicides (GBH) can affect both male and female fertility in animal models. However, few data exist on birds that can be easily exposed through their cereal-based diet. To our knowledge, there are no current studies on the effects of chronic dietary exposure to GBH and the potential reversibility on the fertility and embryo development in chickens. In our protocol, hens (32 weeks-old) were exposed to GBH (47 mg kg-1/day-1 glyphosate equivalent corresponding to half of the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) as defined by European Food Safety Authority in birds, GBH group (GBH), n = 75) or not (Control group (CT), n = 75) for 6 weeks. Then, both CT and GBH groups were fed for 5 more weeks without GBH exposure. During these two periods, we investigated the consequences on the egg performance and quality, fertilization rate, embryo development, and viability of offspring. Despite the accumulation of Gly and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in the hen blood plasma, the body weight and laying rate were similar in GBH and CT animals. We observed from the 4th day of exposure an accumulation of Gly (but not AMPA) only in the yolk of the eggs produced by the exposed hens. After artificial insemination of the hens followed by eggs incubation, we showed a strong significant early embryonic mortality level in GBH compared to CT animals (78 ± 2 % vs 2.5 ± 0.3 %, $p < 0.0001$) with embryo death mainly occurring on the third day of incubation. By using computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) tools, we noted a significant delay in the embryo development of GBH survivors at 15 days with a reduction by half of the embryo volume and some disturbances in the calculated volumes of the embryonic annexes. At 20 days of incubation, we showed a reduction in the length of the tibia and in the volume of the soft tissues whereas the skeleton volume was increased in GBH chicks. The vast majority of these phenotypes disappeared two weeks after an arrest of the GBH maternal dietary exposure. Taken together, the dietary chronic exposure of broiler hens to GBH at a Gly equivalent concentration lower than NOAEL induces an accumulation of Gly in the egg yolk resulting in severe early embryonic mortality and a delayed embryonic development in survivors that were abolished two weeks after the end of GBH exposure.

1. Introduction

Glyphosate (Gly), or N- (phosphonomethyl) glycine, is widely used as an active ingredient in herbicides that are common in conventional agriculture products such as Roundup (RU) (Muñoz et al., 2021). Glyphosate-based herbicides (GBHs) are mainly composed of 36–48 % of Gly, water, salt, and other coformulants such as polyoxyethylene tallow amine (POEA), a hydrophilic ethoxylated alkylamine, and of contaminants such as heavy metals or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and quaternary ammonium (Defarge et al., 2018, 2016; Mesnage et al., 2019). Gly has a broad spectrum and can act on various weed species (Agostini et al., 2020). In animals and plants, Gly is metabolized

* Correspondence to: INRAE UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly 37380, France.
E-mail address: joelle.dupont@inrae.fr (J. Dupont).

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113741
Received 28 March 2022; Received in revised form 30 May 2022; Accepted 1 June 2022
Available online 6 June 2022
0147-6513/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

into CO_2 and amino-methyl-phosphonic acid (AMPA) by the glyphosate oxidoreductase enzyme (Mesnage et al., 2015). A review reported the persistence and toxicity of Gly metabolites and coformulants present in herbicide formulations, and verified the animal toxicity induced by Gly, its metabolite AMPA and GBH, evaluated in various experimental models (Martins-Gomes et al., 2022). Moreover, a study conducted in xenopus and chicken embryos showed that Gly is able to influence the retinoic acid signaling and the Sonic hedgehog (Shh) signaling in vertebrates species during embryonic development leading to marked alterations in cephalic and neural crest development and shortening of the anterio-posterior axis (Paganelli et al., 2010). Some recent evidence shows that Gly and GBHs have deleterious effects on vertebrates at different levels, such as the central nervous system, liver, kidney, blood, or reproductive tract (Agostini et al., 2020; Gillezeau et al., 2019; Ingaramo et al., 2020; Jarrell et al., 2020; Martinez and Al-Ahmad, 2019). At the female reproductive tract level, GBHs has been suspected to be an endocrine disruptor by altering normal hormonal functions. In mammals, steroidogenesis is disturbed, with an induction of a delay of puberty onset (Dallegrave et al., 2007) and perturbations in estradiol (E2) and progesterone (P4) production in female rodents (Hamdaoui et al., 2018; Ren et al., 2018), swine (Gigante et al., 2018) and bovine ovarian cells (Perego et al., 2017a, 2017b). A recent review discussed the potential role of GBHs as an endocrine-disrupting chemical (EDC) (Ingaramo et al., 2020). Moreover, it appears that GBHs and/or AMPA can also behaves as an inhibitor of cell growth and induces cell apoptosis in in vitro studies conducted on human ovarian cells (Muñoz et al., 2021).

Few studies have been performed on avian species, whereas wild and domesticated birds are strongly threatened by exposure to pesticides through their rich cereal diet. In Japanese quails, a long-term exposure to GBHs, with a concentration of Gly below the one that causes observable adverse effects (NOAEL; 100 mg/kg/body weight/day(European Food Safety Authority (EFSA), 2018)), showed that Gly and AMPA could accumulate within the liver and reduce the plasma testosterone (T) levels during puberty in males (Ruuskanen et al., 2020a). Moreover, GBHs appear to induce epigenetic effects, with an impact on the phenotype of the offspring when the parents are exposed (Ruuskanen et al., 2020b). In quails, Ruuskanen et al. revealed evidence that Gly accumulated within the egg and that GBHs caused lipid damages within the brains of embryos and induced a poor embryo development (Ruuskanen et al., 2020b). In adult mallards (*Anas platyrhynchos*), an exposition to GBHs for 15 days induced a reduction in plasma T and E2 levels. Moreover, authors observed modification in epididymis morphology associated with a reduced thickness of the epithelium of the seminiferous tubules and interstitial tissue (Oliveira et al., 2007).

Focusing on the chicken model, in 1980, Batt et al. (Batt et al., 1980) demonstrated that eggs immerged for 5 s in GBH solution at 0 %, 1 % and 5 % concentration on day 0, 6, 12 or 18 of incubation had a normal embryo development with no impact on hatching rate nor chicken development. Authors concluded that external application of GBH on the eggshell has no lethal effects on the developing embryo. Other studies focused on the effects of *in ovo* direct exposure of chicken embryos to GBHs showed that GBHs induced teratogenic effects on embryo development (Lehel et al., 2021; Paganelli et al., 2010) and embryo mortality (Fathi et al., 2019; Lehel et al., 2021). At molecular level, it has been demonstrated that Gly disrupted cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine (Fathi et al. (2020) and increased reactive oxygen species (ROS) production (Fathi et al., 2020, 2019). Our laboratory previously demonstrated that a chronic dietary exposure of roosters to a GBH altered sperm parameters and induced metabolic disorders in the offspring probably through epigenetic effects (Serra et al., 2021). An observational study conducted on broiler breeder egg production highlighted a negative association between residues of Gly commonly found in food for broiler breeders and egg hatchability while no association was found between residues of Gly in the food and laying rate (Foldager et al., 2021). According to our knowledge, no studies were conducted on the consequences of chronic dietary GBH exposure on the fertility of the female chicken and on the offspring development. Therefore, the understanding of the putative effects of Gly or GBHs on bird fertility and embryo development needs to be investigated. Based on the literature and on the results of our laboratory, we hypothesized that dietary GBH exposure can alter female fertility and the embryo development. Thus, the objectives of this study were to investigate the impacts of chronic dietary GBH exposure on the fertility and the embryo development and their potential reversibility in the reproductive hens.

2. Material and methods

2.1. Ethical issues

All experimental procedures were performed in accordance with the French National Guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals APAFIS number 21549-2019071809504554v3, Approval Date: 6 November 2021, Ministry of Agriculture and Fish Products, and a notice of ethics committee of Val de Loire N◦19).

2.2. Animals

All animals (150 female chicks and 10 male chicks of the commercial breed ROSS 308) were obtained at 1 day of age from a local hatchery (Boye Accouvage La Villonniere 79310 La Boissière en Gatine, France) and reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) until 32 weeks old according to the traditional breeding conditions. At 32 weeks old, hens were divided into two homogenous groups: control (n = 75) and dietary GBH exposed (n = 75). For each group of hens, animals were distributed by 5 in 15 pens, each pen with an area of 3 m^2. Roosters (n = 10) were reared together. They were included in the study for sperm collection followed by artificial insemination. The design of the experiment is summarized in Fig. 1. Seventy-five hens were exposed for 6 weeks to GBH via the food (GBH group, 46.8 mg/kg bw/day), and 75 hens were fed with a regular diet without GBH (noted control or CT) (week 1 to week 6 of the protocol). The diet for the GBH group consists of regular broiler diet mixed with Gallup 360 in our laboratory in accordance with the directives of the "Directions Départementales de la Protection des Populations" (Departmental Directorate for the Protection of Populations). The mix was carried out by a technician with certification for the handling of phytosanitary products "Certiphyto", as recommended by the French law. After that, all animals (CT hens and ex-GBH hens) were fed with a regular diet (week 7 to week 11 of the protocol). During this protocol, blood samples of hens were collected to quantify plasma Gly and AMPA concentrations. At week 4, hens were artificially inseminated with sperm from control roosters that were fed with regular diet (not GBH exposed). The next day and for 3 weeks (weeks 4, 5, and 6), eggs were collected. At week 7, exposure to GBH was stopped, and twelve CT hens and twelve GBH hens were slaughtered to recover biological samples. At week 9, hens were artificially inseminated again with sperm from control roosters. The next day and for 3 weeks (weeks 9, 10, and 11), eggs were collected. At the end of each week (weeks 4, 5, and 6 and then week 9, 10, and 11), eggs fertilized with the sperm of CT roosters were incubated for 21 days. Before and during the whole experiment, we did not observe any significant differences between CT and GBH (week 6: CT: 3762 ± 18.9 g and GBH: 3699 ± 18.9 g) and CT and ex-GBH (week 11: CT: 3996 ± 20.5 g and GBH: 3920 ± 31.7 g) hens in terms of body weight. All animals were killed by electrical stunning and bled out, as recommended by the ethical committee.

2.3. Diets composition

Hens (32 weeks old) received a restricted laying diet according to

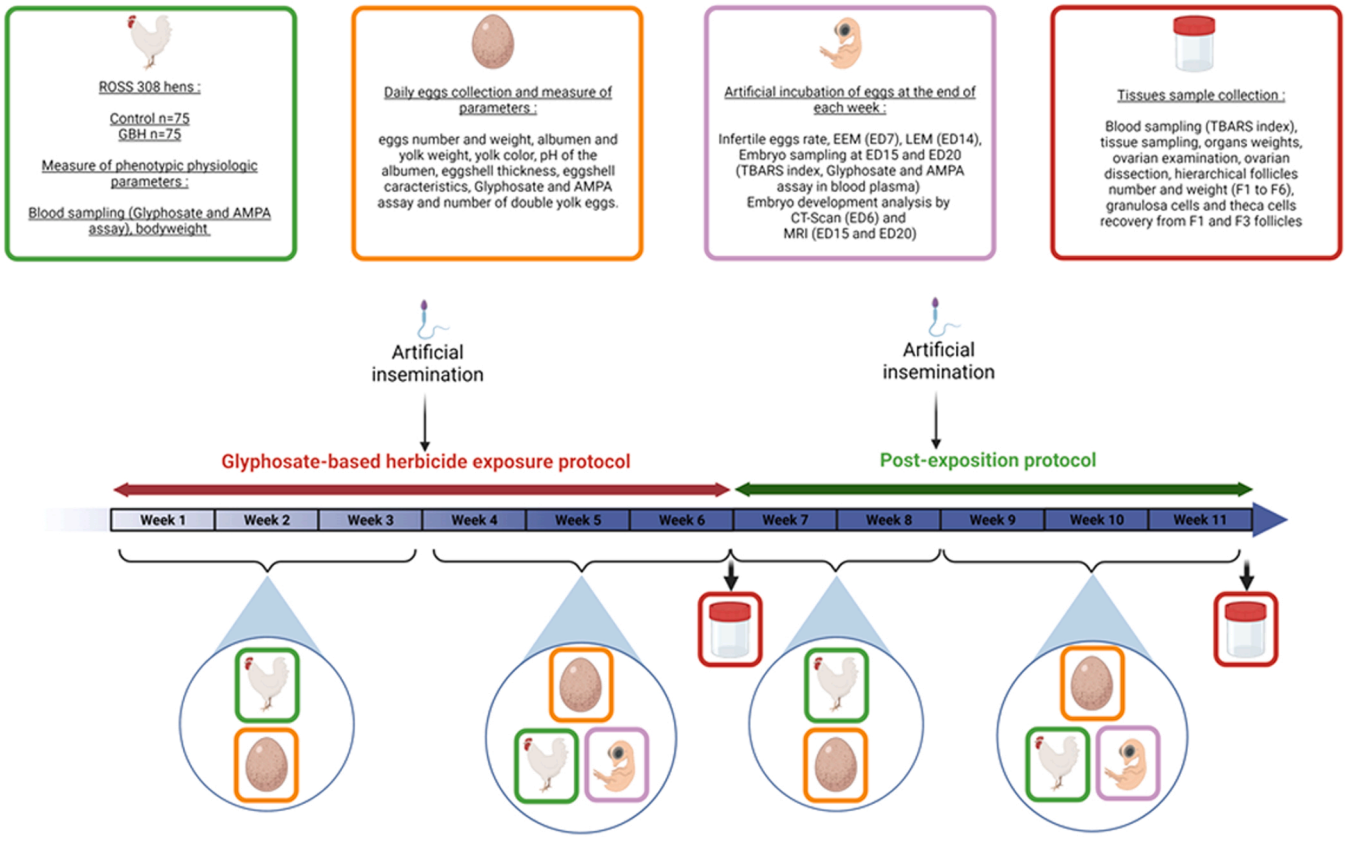


Fig. 1. Experimental design: The timeline is represented in weeks. (ED: Embryonic Day, EEM: Early Embryonic Mortality (at ED7), LEM: Late Embryonic Mortality (at ED14), MRI: Magnetic Resonance Imaging, CT-Scan: Computed Tomography Scanner F1: Hierarchical Follicle 1; F3: Hierarchical Follicle 3) 150 32 week old hens ROSS 308 were included in the study. Seventy five GBH hens were exposed for 6 weeks to GBH via the food (46.8 mg/kg bw/d), and seventy five CT hens were fed with a regular diet without GBH. Then, GBH was removed from the diet and animals were followed for 5 more weeks (week 7 to week 11). During the protocol (D0, D21, D38 during exposure and D3, D6 and D27 after exposure), blood samples were collected to quantify glyphosate (Gly) and its metabolite AMPA within the blood plasma. At week 4 and week 9, hens were artificially inseminated with sperm from control roosters. The next day and for 3 weeks (weeks 4, 5, and 6 during exposure and weeks 9, 10, and 11 after exposure), eggs were collected daily, egg parameters were measured (number, total weight, albumen and yolk weight, pH of the albumen, eggshell thickness and characteristics, Gly and AMPA assay, and number of double yolk eggs) and egg were artificially incubated for 21 days at the end of each week collection. Infertile eggs rate, EEM (ED7) and LEM (ED14) were assessed by candling. Embryo analysis by CT-Scan (ED15 and ED21), MRI (ED15 and ED21), and embryo sampling was performed (ED15 and ED21) at week 6 during exposure and week 11 after exposure. At birth, all chicks (n = 745 for CT and n = 5 for GBH during exposure and n = 571 for CT and n = 523 for Ex-GBH during post-exposition protocol) were counted and weighted, sex was determined, and chicks from each group were euthanized to collect samples and weigh organs. At the end of exposure (end of week 6) and at the end of the post-exposition protocol (end of week 11), hens were euthanized for tissue sampling and measurements (n = 9 for CT and GBH at week 6; n = 12 for CT and Ex-GBH at week 11).

Hendrix Genetics recommendation. They were fed with either GBH exposed feed (n = 75) or control feed (n = 75) from the first week of protocol to week 6 (Fig. 1). The control feed contained low measurable Gly and AMPA concentrations (0.21 mg/kg feed for Gly and undetectable levels for AMPA as determined by Phytocontrol, Nimes, France) (See Spplemental data 1 for details (Estienne, 2022)). The concentration of Gly in the GBH feed was 1250 mg/kg feed for Gly and 0.30 mg/kg feed for AMPA, as determined by Phytocontrol. Gallup super 60, called GBH within the text, was obtained from Axereal (Monnaie, France); it contained 360 g/L Gly (485.8 g/L isopropylamine salt). Hens were food-restricted as recommended by the provider. Knowing that the hens weighed on average 3.45 kg over the exposure period and their food consumption was on average 130 g/day, the concentration in the feed thus corresponded to a dose of 47 mg Gly/kg body weight/day. The European Food Safety Authority (EFSA) has reported a NOAEL of 100 mg/kg body weight/day for poultry, with a maximum residue level (MRL) of 2.28 mg/kg bw/d (European Food Safety Authority (EFSA), 2018). Therefore, our experiment tested a concentration of approximately 47 % of the NOAEL threshold. From week 7 to week 11, all animals were fed with the control feed (CT n = 63 and ex-GBH n = 63).

2.4. Measurement of egg production and quality

The eggs from each pen were collected twice a day, counted and weighted using a balance (Ohauss, Pionner). The numbers of normal and double (two yolks) eggs were collected and counted. The weight of the albumen, egg yolk, and dehydrated shell were determined. The pH of the albumen was also measured. Albumen and yolk samples were used for Gly and AMPA assays (Phytocontrol, Nimes, France) as well. As GBHs appear to impair calcification process in vertebrates, including the chicken species (Díaz-Martín et al., 2021; Kubena et al., 1981), we decided to analyse eggshell properties. Using an Instron instrument (Instron, UK527), we analyzed the eggshell elastic modulus (N/mm2) and the toughness (N/mm3) of the eggs. The egg shape, eggshell percent, index, and thickness were also measured. These parameters were assessed for 30 eggs of each animal group during GBH exposure. The fatty acid profile in the egg yolk was also determined. The total lipids were extracted from the yolk of the eggs from CT and GBH hens (week 3) after homogenization of the samples (n = 30 for each group) with a chloroform/methanol mixture. Lipids were extracted gravimetrically into methanol:chloroform (1:2). The fatty acid composition was determined by gas chromatography (Autosystem; Perkin Elmer, St Quentin en Yvelines, France) after transmethylation of lipids.

2.5. Fertility and embryo development parameters

For artificial insemination, we used the semen of 10 CT roosters, collected and pooled to have a single sample. For each experiment, the hens were inseminated with 2 × 108 spermatozoa, at the 3rd and 8th week of the protocol (Fig. 1). Eggs were collected and counted daily for 3 weeks following the artificial insemination and incubated every 7 days. We assessed the number of unfertilized eggs, early (EEM) and late (LEM) embryonic mortality by breaking eggs and candling on the 7th (EEM) and 14th (LEM) day of incubation. As previously described (Barbe et al., 2020; Mellouk et al., 2018), the different percentages (EEM, LEM, hatchability, hatchability of fertile eggs and fertility) were calculated using the following formula:

% of unfertilized eggs = (number of unfertilized eggs / number of incubated eggs) x 100 % EEM = number of EEM/(number of incubated eggs – unfertilized eggs) x 100 % LEM = number of LEM/(number of incubated eggs – unfertilized eggs + number of EEM) x 100 % Hatchability of incubated eggs = (number of hatched chicks / number of incubated eggs) x 100 % Hatchability of fertilized eggs = (number of hatched chicks/number of fertilized eggs) x 100.

2.6. Measurement of progesterone, androstenedione, testosterone and oestradiol deposition in egg yolk

As previously described (Barbe et al., 2020), we assessed steroids concentration from 30 egg yolks per group. Briefly, after thawing, the yolk was mixed and 0.5 g of each yolk was diluted with 1.5 mL of distilled water and vortexed for 30 s. Steroids were extracted by adding 3 mL of diethyl-ether to 300 μL of the mixture, followed by vortexing for 30 min and stored overnight at −20 °C. The steroid-containing diethyl ether phase was then decanted after freezing the tubes in nitrogen for 10 s. After centrifugation (1500 g, 15 min), the organic solvents were then evaporated under air flow, and the extracts taken up in 600 μL of phosphate buffer. Steroid hormones were then measured in the extracts using ELISA (oestradiol, testosterone and androstenedione) and EIA (progesterone) assays. For progesterone, the EIA assay was performed as described by Canépa et al. (2008) (See Supplemental material and methods for details) (Estienne, 2022). The sensitivity of the assay was 0.4 ng/mL. Oestradiol and testosterone concentrations were determined using commercial ELISA assays from Cayman Chemicals (reference number 501890 for oestradiol, and 582701 for testosterone) and the sensitivity of these assays was 0.01 ng/mL. Androstenedione levels were analyzed using an ELISA assay from Abcam (reference number ab108672) and the sensitivity of the assay was 0.01 ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) for each assay averaged <10 %.

2.7. Hens and embryos biological samples

Blood samples from 150 hens were collected from the occipital sinus into heparin tubes at different days during the experiment (days 0 and 21 of week 3 and day 38 of week 6 during GBH exposure and day 3 of week 7, day 8 of week 8, and day 27 of week 10 corresponding to the protocol after the end of GBH exposure). Blood samples were centrifuged (5000g for 10 min at 4 °C) and stored at −20 °C before the use for Gly and AMPA assays. Tissue samples (granulosa and theca cells) were obtained at different times of the experiment (week 6 of the protocol after the beginning of GBH exposure and week 11 of the protocol after the end of GBH exposure) by dissection after slaughtering. Organs were also weighted during dissection. At ED15 and ED21, eggs were randomly selected (n = 20 for CT and GBH groups at week 6, n = 20 for CT and Ex-GBH groups at week 11) and opened to access the embryo. The embryos were euthanized by decapitation and dissected in order to recover tissue samples and to weigh the organs.

2.8. Body weight, carcass traits, and embryo and chick quality

At ED15 and ED21 (0-day post-hatch), after euthanasia, the carcasses were dissected, and different parts including the heart, residual yolk sac (vitelline vesicle), digestive tract (proventriculus, gizzard, and intestine), liver, and brain were collected and weighed. Chicks quality was assessed as reported by Tona et al. (Tona et al., 2004).

2.9. Measurement of Gly and AMPA in blood plasma and eggs

In blood plasma of hens and embryos, Gly and AMPA were measured after a derivatisation reaction using FMOC-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate), in collaboration with Dr. S El Balkhi (Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, Limoges, France) as previously described (Serra et al., 2021) (See Supplemental material and methods for details) (Estienne, 2022). Gly and AMPA concentrations in yolk and albumen eggs were determined by Phytocontrol company (Nïmes, France).

2.10. TBARS assay in blood plasma and yolk eggs

The determination of lipoperoxidation in plasma samples and yolks was performed by measuring the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the samples using a spectrophotometer at 532 nm, following the technique described by Lapenna et al. (Lapenna et al., 2001) and the results are represented in nmol malondialdehyde (MDA)/mL plasma or /kg yolk.

2.11. Determination of weight and number of follicles

At weeks 6, and 11, 12, and 9 hens per group respectively were selected and euthanized and the preovulatory follicles, classified from F1 to F6 (Waddington and Walker, 1993) were collected, hierarchically defined and weighed. Granulosa cells and theca cells were collected from preovulatory follicles 1 (F1) and 3 and 4 (F3/4).

2.12. Theca and granulosa cells recovery followed by in vitro culture

After ovarian dissection and follicles classification, theca layer were mechanically removed from the surface of the follicles and kept in fresh PBS. Granulosa cells layers were also collected and washed twice with PBS to remove remnant yolk. Then, cells were dispersed in 0.3 % collagenase type A (Roche Diagnostic, Meylan, France) in F12 medium containing 5 % fetal bovine serum (FBS), at 37 °C. Cells were pelleted by centrifugation, washed twice with fresh medium and counted in a haemocytometer. The viability of granulosa cells was estimated by Trypan Blue exclusion. Cells were cultured in a medium composed of DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/L streptomycin, 3 mmol/L L-glutamine and 5 % FBS. The cells were initially cultured for 24 h with no treatment. After overnight serum deprivation, cells were stimulated with IGF1 (10^{-8} M), LH (10^{-8} M), IGF1 +LH (10^{-8} M) or left untreated. All cultures were maintained under a water-saturated atmosphere of 95 % air/ 5 % CO2 at 37°C. After 48 h of in vitro culture conditioned media were recovered for progesterone assy. Finally, samples of uncultured theca and granulosa cells were pelleted before snap freezing for RT-qPCR experiments. All samples were kept at −80 °C before analysis.

2.13. Measurements of the expression of steroidogenic genes in granulosa and theca cells

Total RNA from granulosa and theca cells of preovulatory follicle F1 and F3/4 of the twelve animals per group (CT vs GBH) and nine animals per group (CT vs Ex-GBH) was extracted by homogenization in the TRIzol tissue reagent using an ultraturax instrument, according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, by Life Technologies,

Villebon sur Yvette, France). The cDNA was generated by reverse transcription of total RNA (2 μg) in a mixture comprised of 0.5 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 2 M of RT Buffer, 15 μg/μL of oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor, and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV) for one hour at 37 °C. Real-time PCR was performed using the MyiQ Cycle Device (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), in a mixture with SYBR Green Supermix 1X Reagent (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), 250 nM specific primers (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France), 3 μL of cDNA diluted 1:5 in water) for a total volume of 11 μL. The samples were set up in duplicate on the same plate according to the following procedure: after an incubation of 2 min at 50 °C and a denaturation step of 10 min at 95 °C, samples were subjected to 40 PCR cycles (30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C). The primers used are shown in the Supplemental data 2 (Estienne, 2022). Then, the relative expression of the gene of interest was related to the relative expression of the geometric mean of the three reference genes (*GAPDH*, *ACTB,* and *EEF1a*). For each gene (*StAR*, *3βHSD*, *P450scc* and *CYP19A1*), expression was calculated according to primer efficiency (E) and quantification cycle (Cq), where expression = E-Cq. Then, relative expression of the target gene to the three reference genes was analyzed.

2.14. MRI analysis of incubated eggs

The MRI analysis was carried out using a 3 Teslas (T) MRI scanner (Siemens Magnetom® Verio, Erlangen, Germany) with a 70 cm inner-diameter and field gradient strength of 45 mT/m. The Radio Frequency (RF) coil was the rigid 'loop' type with an inner diameter of 7 cm. The egg could just fit inside the RF coil. MRI scans were made one by one on embryonated eggs (15 CT and 15 GBH eggs at ED15; 5 CT and 5 GBH eggs at ED21) which were placed in normal position on a cardboard egg tray per incubation day studied (ED15 and E20) and these eggs have been randomly selected alongside the live eggs checked by candling in the control group and the treated group. The eggs were incubated at 37.5 °C and 53 % relative humidity at INRAE. Thereafter, the embryonated eggs were cooled for 1 h at 4 °C followed by 10 min at − 20 °C prior to MRI scanning to minimize embryonic movement, which can lead to artefacts on the MR images (Bain et al., 2007). T2 (spin-spin interaction or transverse relaxation time) weighed images were taken within 8 min 57 s. For the purpose of this investigation, when high-contrast/high-resolution images were a pre-requisite, T2-weighted imaging was carried out using the SPACE (Sampling Perfection with Application-optimized Contrasts) pulse sequence because they produced high signal contrast between the organs of interest, making them readily identifiable. The Repetition Time (TR) and Echo Time (TE) were respectively 1860 ms and 140 ms, flip angle = 140 degrees, and bandwidth of 296 Hz/Px. The Matrix was 192 × 192, the Field of View (FOV) was 70 mm × 70 mm, with a slice thickness of 0.35 mm making a voxel size of 0.36 × 0.36 × 0.35 mm^3. 144 slices were required to cover the entire egg. Meanwhile MRI acquisitions, the viability of all the embryos could be checked thanks to presence of artefacts due to the heart beating.

2.15. Computed Tomography Scanner (CT-Scan) analysis of incubated eggs

The clinical computed tomography machine used was a Somatom Définition AS128 (Siemens, Germany). Selected live eggs at ED6 (15 CT, and 15 GBH eggs), ED15 (15 CT, and 15 GBH eggs) and ED21 (5 CT, and 5 GBH eggs) were placed on a cardboard egg tray. The X-ray source was set at 80 kV and 400 mA/s. The image acquisition mode was 16 cm × 16 cm with 512 pixels matrix size and with a slice thickness of 0.4 mm making a resolution of 312,5 μm. A I26 Safire reconstruction filter was used for an optimal *in ovo* tissues characterization.

2.16. CT-Scan and MRI images analysis

For CT-Scan and MRI analysis, the Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) images were converted to the Neuroimaging Informatics Technology Initiative (NIfTI) format. Analyses of all images were carried out using ITK SNAP software (Researchers at UPenn and UNC, General Public License), which is a free post-processing software generally used to segment 3D medical image structures. The segmentation of surface growth type was done automatically and then corrected manually. It was then possible to edit the volume of each segmented structure in mm^3.

2.17. Statistical analysis

The GraphPad Prism® software (version 8) was used for all analyses. All data are reported as means ± standard error of mean (SEM). Bartlett's test was run to test the homogeneity of variance, and normal distribution was verified by the Shapiro–Wilk test. We performed one t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVAs to compare the different means, when appropriate. When the one-way ANOVA indicated significant effects, the means were analyzed by using the Fisher's test. When the two-way ANOVA indicated significant effects, the means were analyzed by using Tukey HSD's tests. Letters correspond to the ordinary one-way or two-way ANOVA significance ($p < 0.05$), followed by Fischer's and Tukey's multiple comparisons test, respectively; Stars (*) correspond to the unpaired t-test significance ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Plasma and yolk egg Gly and AMPA concentrations

Before the start of GBH exposure, Gly and AMPA were undetectable in the plasma of all hens (day 0). After 21 days of exposure (week 3), the Gly concentrations of the two molecules significantly increased at week 3 in the plasma of GBH hens at 1500 ($p < 0.0001$) and 20 ng/mL ($p < 0.0001$), respectively. Three days after the end of GBH exposure (week 7), both concentrations decreased ($p < 0.0001$ for Gly and $p = 0.0001$ for AMPA at week 7) until day 27 of cessation exposure (week 10) (Fig. 2A and B). We then measured Gly concentrations in the yolk of the GBH group eggs during the first week of exposure to this herbicide. Gly concentrations remained undetectable or very low for the first 4 exposure days and began to increase significantly on day 5 until reaching a maximum on day 8 (Fig. 2C) ($p < 0.05$). During week 3, we found that Gly accumulation within the yolk was important (0.6 ng/mL), whereas it was very low within the albumen (Fig. 2D) ($p < 0.01$). At the end of exposure to the GBH, we noticed a constant and significant decrease of Gly concentrations from 0.9 ng/mL to 0.15 ng/mL in the yolk of eggs from the GBH group during the next 8 days (Fig. 2E) ($p < 0.05$). We then assessed the oxidative stress of hens by measuring the lipoperoxidation in plasma samples and yolks with the level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Results showed a significant increase of oxidative stress in hens' plasma from the GBH group compared to the CT group ($p < 0.001$). A similar result was obtained when measuring oxidative stress within eggs with a significant increase of TBARS index in eggs from the GBH group compared to eggs from the CT group ($p < 0.0001$) (Fig. 2F).

3.2. Effects of GBH on hen ovarian functions

At both slaughters (weeks 6 and 11), we found no difference in the ovarian parameters such as the number of hierarchical follicles, weight of the ovary (without hierarchical follicles), or hierarchical follicular weight (F1 to F6) (Supplemental data 3 (Estienne, 2022)). Moreover, RT-qPCR experiments performed on granulosa cells and theca samples from F1 and F3 follicles exhibited no difference of gene expression for

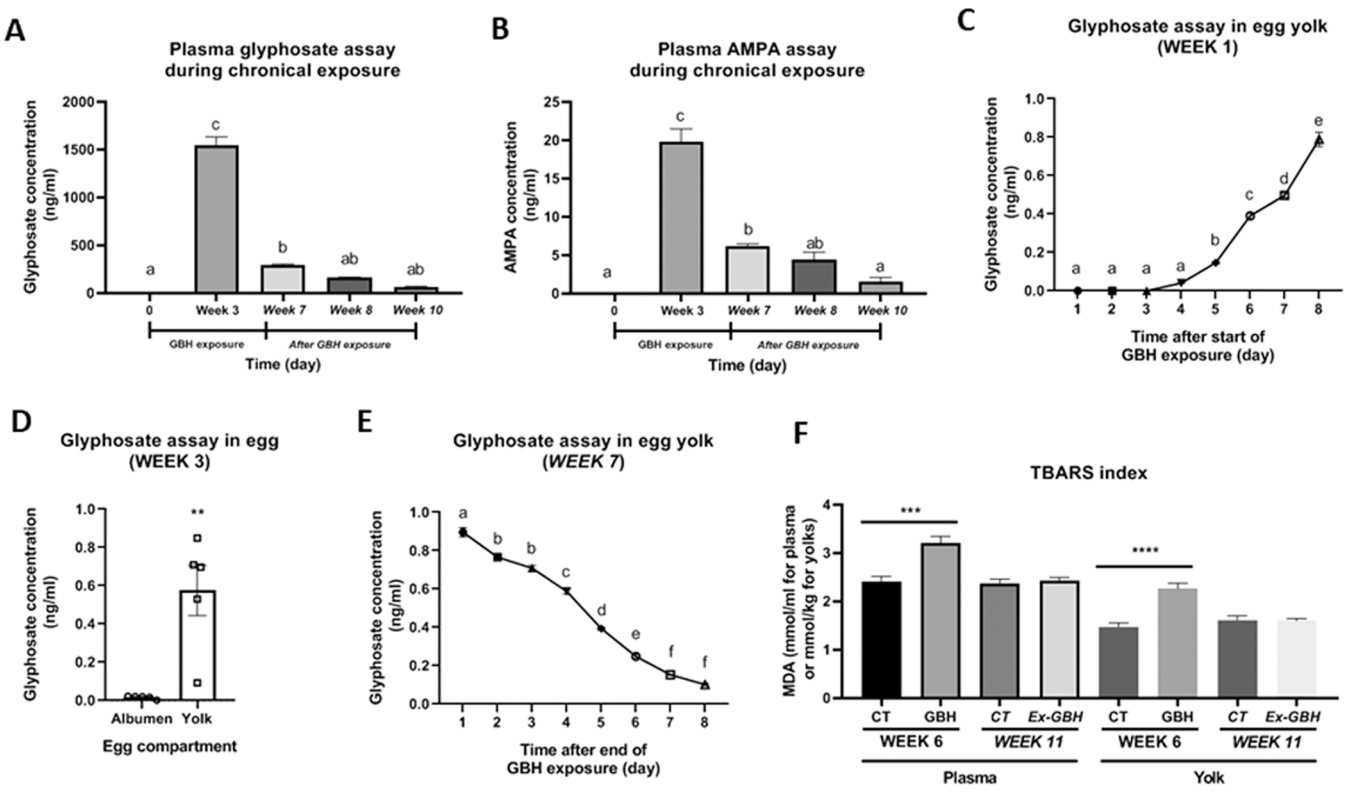


Fig. 2. Determination of glyphosate (Gly) concentrations, AMPA concentrations and TBARS index in the blood plasma and the egg compartments. A) Gly assay in the blood plasma during the whole protocol (ng/mL) (n = 10 per group). B) AMPA assay in the blood plasma during the whole protocol (ng/mL) (n = 10 per group). C) Gly assay in egg yolks from Glyphosate Based Herbicide (GBH) group during the first week of exposure to GBH (WEEK 1) (ng/mL) (n = 10 eggs per day). D) Gly assay in GBH egg yolks and albumen during the third week of exposure to GBH (week 3) (ng/mL) (n = 5 per condition). E) Gly assay in egg yolks from GBH group during the first week of post-exposition to GBH (WEEK 7) (ng/mL) (n = 10 eggs per day). F) TBARS index in blood plasma and egg of broiler hens during GBH exposure (WEEK 6, CT n = 10 versus GBH n = 10) and after GBH exposure (*WEEK 11*, CT n = 10 versus Ex-GBH n = 10). Results are presented as means ± SEM. Lowercase letters correspond to the ordinary one-way ANOVA significance ($p < 0.05$), followed by Tukey's multiple comparisons test comparing the evolution of the concentration of Gly or AMPA at different days; Stars (*) correspond to the unpaired t-test significance ($p < 0.05$) corresponding to the comparison between albumen and the yolk compartment for Gly concentrations and between the CT and Ex-GBH for TBARS index in plasma and eggs. **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$.

StAR, *3βHSD*, *CYP19A1*, and *P450scc* (Fig. 3A, B, C, D, F, G, H and I). We also performed in vitro granulosa cells (GC) cultures from F1 follicles and stimulated the cells with LH (10^{-8} M) alone, IGF1 alone (10^{-8} M), or both hormones in combination to check their responses in terms of progesterone secretion. Results showed that GC significantly increased their secretion of progesterone within the culture medium when stimulated with LH alone, IGF1 alone, or with LH and IGF1, but we observed no difference between CT and GBH GC and between CT and Ex-GBH GC (Fig. 3E and J). Focusing on eggs parameters, we didn't find any differences of eggs number/hen/day from week 1 to week 6 of the protocol (GBH exposure) between CT and GBH. Even after exposure arrest, the eggs number/hen/day from week 7 to week 10 remained identical between CT and Ex-GBH hens (Supplemental data 4A (Estienne, 2022)). During the whole experiment, the number of double yolk eggs (double ovulation) was not significantly different between the groups (CT versus GBH then CT versus ex-GBH). We only observed a significant decrease of double yolk eggs in the GBH group during week 2 (Supplemental data 4B (Estienne, 2022)). Egg yolk steroid concentrations including measurements of progesterone, estradiol, androstenedione and testosterone (Supplemental data 4C (Estienne, 2022)), and egg weights were similar between the groups during the experiment (Supplemental data 5 (Estienne, 2022)). Moreover, we analyzed lipid composition within the egg yolks sampled at week 3 and found no difference between CT and GBH eggs (Supplemental data 6 (Estienne, 2022)). Finally, other egg parameters were analyzed during week 6, such as egg weight, yolk weight, albumen weight, albumen pH, egg shape, eggshell percent, index, thickness, toughness, and elasticity. For all parameters, we only found a significant increase in eggshell percent, index, and thickness in the GBH group compared to the CT group ($p < 0.05$) (Table 1).

3.3. Effect of GBH exposure on fertility parameters

After artificial insemination, egg daily collection and artificial incubation, infertile egg rate, EEM, and LEM during and after GBH exposure were determined by candling at ED7 and ED14; dead embryos were analyzed to determine the embryonic stage when death occurred. Concerning the unfertilized rate, the data were similar between the CT and GBH groups during the GBH exposure (week 4–6). After GBH exposure (week 9–11), we noticed a slight but significant increase in the rate of unfertilized eggs in the Ex-GBH group (34.55 ± 3.12 %) compared to the CT group (23.20 ± 2.80 %) at week 10 only. EEM and LEM rates were significantly increased in the GBH group compared to the CT group during GBH exposure (Table 2). Hatching of incubated eggs and hatching of fertile eggs were significantly reduced in the GBH group compared to the CT group during the same period (Table 2). However, all of these latter parameters were unchanged between the two groups after GBH exposure (Table 2). Dead embryo analysis during GBH exposure showed that embryonic death, observed by disappearance of blood vessels, occurred mostly during ED3 ($p < 0.0001$) (Fig. 4A). We also assessed Gly and AMPA concentrations in embryo plasma and found that concentrations of both molecules were significantly increased in the GBH group compared to the CT group only during GBH exposure (for Gly: ED15, $p < 0.0001$; ED21, $p < 0.001$; for AMPA: ED15, $p < 0.001$; ED21, $p < 0.05$) (Fig. 4B and C). However, the

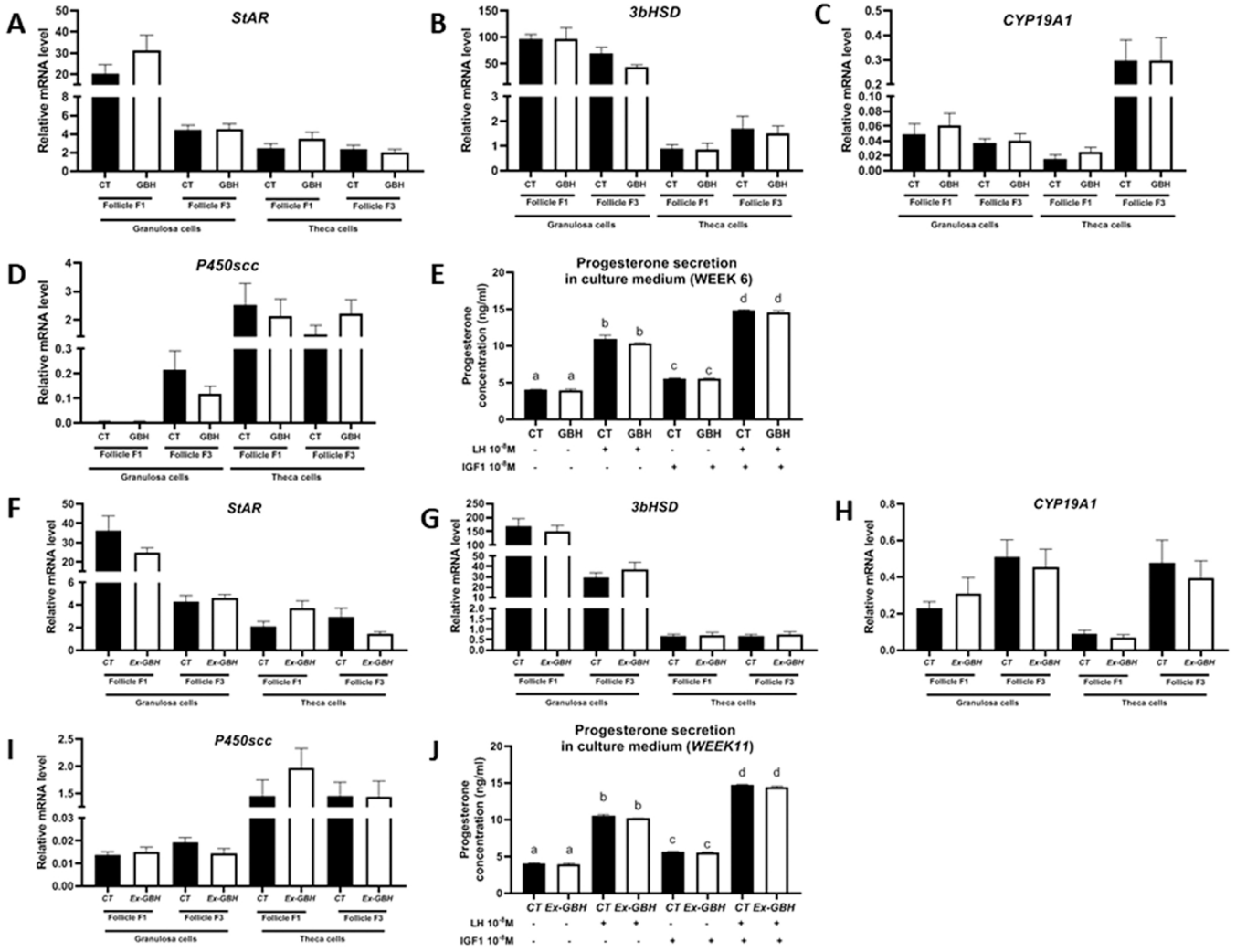


Fig. 3. Levels of A) *StAR*, B) 3*βHSD*, C) *CYP19A1*, and D) *P450scc* mRNA expression in granulosa cells and theca layers from broiler hens during Glyphosate Based Herbicide (GBH) exposure (WEEK 6, CT versus Ex-GBH). mRNA was extracted from granulosa cells of 12 preovulatory F1 follicles and 12 F3 follicles for each group. E) Effect of GBH on in vitro steroidogenesis during exposure (WEEK 6) in response to IGF1 and LH alone or in combination in hen primary granulosa cells. Granulosa cells from preovulatory follicles 1 (F1) from different groups of animals (CT versus GBH) (n = 3 per group) were seeded for 24 h and after overnight serum starvation, granulosa cells were incubated with IGF1 (10^{-8} M), LH (10^{-8} M) or both for 48 hr. The culture medium was then collected. Basal progesterone level and the response to IGF1 or/and LH were assessed. Results are presented as means ± S.E.M. P-values from ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test comparing the CT versus the GBH were considered as significant if $p < 0.05$. Lowercase letters correspond to unpaired t-test significance ($p < 0.05$). Levels of F) *StAR*, G) *3βHSD*, H) *CYP19A1*, and I) *P450scc* mRNA expression in granulosa cells and theca layers from broiler hens after Glyphosate Based Herbicide (GBH) exposure (WEEK 11, CT versus Ex-GBH). mRNA was extracted from granulosa cells of 12 preovulatory F1 follicles and 12 F3 follicles for each group. J) Effect of GBH on in vitro steroidogenesis during exposure (WEEK 11) in response to IGF1 and LH alone or in combination in hen primary granulosa cells. Granulosa cells from preovulatory follicles 1 (F1) from different groups of animals (CT versus Ex-GBH) (n = 3 per group) were seeded for 24 h and after overnight serum starvation, granulosa cells were incubated with IGF1 (10^{-8} M), LH (10^{-8} M) or both for 48 hr. The culture medium was then collected. Basal progesterone level and the response to IGF1 or/and LH were assessed. Results are presented as means ± SEM. P-values from ordinary one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test comparing the CT versus the Ex-GBH were considered as significant if $p < 0.05$. Lowercase letters correspond to unpaired t-test significance ($p < 0.05$).

results were similar between the two groups after GBH exposure with undetectable levels of AMPA for CT and ex-GBH embryos.

3.4. Focus on the effect of GBH exposure on embryo development and offspring general condition

In order to study the effect of GBH exposure on embryo development, we analyzed the developing embryo *in ovo* by non-invasive medical imaging with CT-Scan analysis (ED15 and 21) combined with MRI analysis (ED15 and 21). At ED15, CT-Scan images (illustrated on Fig. 5A) showed a significant increase in the ratio between the total egg volume and the albumen volume in the GBH group compared to the CT group ($p < 0.0001$) (Fig. 5C) and a significant decrease in the ratio between the total egg volume and the vitellus volume in the GBH group compared to the CT group ($p < 0.0001$) (Fig. 5D) whereas the air chamber volume remained unchanged between the two groups (Fig. 5B). MRI analysis at ED15 showed a significant decrease in the volumes of the embryo, eyes of the embryos, vitelline vesicle, and amnios from GBH eggs compared to CT eggs ($p < 0.05$) (Fig. 5E, F, G and J). We noticed a significant increase in the albumen volume of GBH eggs compared to CT eggs ($p < 0.001$) (Fig. 5H) while the allantoic volume appeared not significantly different between the two groups (Fig. 5I). In Fig. 5K a sagittal image of a CT embryo analyzed *in ovo* by MRI at ED15 with the different colourized compartments (albumen in blue, amnios in dark blue, vitellus in light blue, allantoic in green, eyes in pink and embryo body in purple) is shown. In Fig. 5L, we performed a three

Table 1
Quality of eggs from broiler hens during GBH exposure (WEEK 6, CT n = 30 versus GBH n = 30). Total egg, yolk, and albumen were weighted. Albumen pH was determined. Eggshell characteristics were measured with Instron. Results are presented as means ± SEM. P-values of the effect of the GBH exposure (during exposition) were considered as significant if $p < 0.05$ (t-test). Lowercase letters correspond to the unpaired t-test significance ($p < 0.05$) corresponding to the comparison between CT and GBH eggs.

Egg parameters	GBH Exposure	
	Control (WEEK6 n = 30)	GBH (WEEK6 n = 30)
Egg weight (g)	62.20 ± 3.58	62.56 ± 3.77
Yolk weight (g)	18.40 ± 0.18	18.03 ± 0.20
Albumen weight (g)	34.87 ± 0.33	34.18 ± 0.33
Albumen pH	8.36 ± 0.03	8.30 ± 0.02
Egg shape (index)	0.79 ± 0.02	0.79 ± 0.03
Eggshell percent	8.65 ± 0.50[a]	8.85 ± 0.60[b]
Eggshell index	7.32 ± 0.40[a]	7.58 ± 0.50[b]
Eggshell thickness (mm)	0.31 ± 0.02[a]	0.32 ± 0.02[b]
Eggshell toughness (N/mm^3)	469.30 ± 65.17	441.81 ± 47.71
Eggshell elasticity (N/mm^2)	18428.13 ± 1418.18	18595.73 ± 1825.99

dimensional reconstruction of the same embryo (purple) with its vitelline vesicle (yellow). Finally, in Fig. 5M we provided a picture of a GBH embryo on the left (a) and a CT embryo on the right (b) at ED15, permitting a qualitative appreciation of the reduction in size of the GBH embryo, as well as its vitelline vesicle, compared to the CT embryo and vitelline vesicle. At ED21, CT-Scan imaging (illustrated in Fig. 6A), permitted the analysis of the ratio between the total egg volume, soft tissues, and skeleton volumes showing a significant decrease of the soft tissue volume ($p < 0.05$) and an increase in the skeleton volume ($p < 0.05$) in embryo from the GBH group compared to the CT group (Fig. 6B and C). At the same embryonic stage, MRI imaging illustrated in Fig. 6D (sagittal view) and in Fig. 6E (3 dimensional reconstruction of the egg content) demonstrated a significant reduction of the tibia length of embryos from the GBH group compared to the CT group ($p < 0.01$) (Fig. 6H) whereas eyes volume and gizzards length remained similar between the two groups (Fig. 6F and G). All these measurements were performed for CT and Ex-GBH embryos during weeks 9, 10 and 11 but no significant differences were found between the two groups (data not shown).

Furthermore, we also carried out a dissection of embryos at ED15 and ED21 in order to weigh several organs. At ED15, measurements made during GBH exposure showed a significant reduction in the weight of embryo, yolk sac, liver, brain, digestive tract and heart ($p < 0.0001$ for all parameters, Table 3) of GBH embryos associated with a similar total egg weight for GBH eggs compared to CT group. At the same stage, after exposure to GBH, we found only a significant increase in brain weight of embryos from the Ex-GBH group compared to the CT (Table 3). At ED21, measurements showed a significant reduction of brain and liver weights ($p < 0.05$ for both parameters) in embryos from the GBH group (Table 3). Then, after GBH exposure, we only measured an increase of brain weight in Ex-GBH chicks when compared to CT chicks (Table 3). Finally, after birth chicks were checked and a Tona score was individually given. During and after GBH exposure, CT chicks exhibited a significantly higher Tona score when compared to chicks from the GBH group ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (Table 3).

4. Discussion

To our knowledge, the present work is the first to assess the chronic dietary effects and the reversibility of GBHs on the fertility, embryo development, and the quality of the offspring related to plasma and egg Gly concentration during the laying period in hens. In addition, we used innovative imaging techniques such Tomography (CT Scan) and MRI permitting to evaluate the evolution of different egg compartments in response to GBHs exposure without interrupting incubation and embryo development. The results obtained in the female broiler breeders model showed that a chronic diet exposure to 47 mg/kg day^{-1} Gly equivalent (that corresponds to half of NOAEL in poultry (European Food Safety Authority (EFSA), 2018) did not alter body weight, egg performance, fertilization level, and the steroid production by ovarian cells but strongly reduced the early embryo development. This was associated to an increase in Gly and AMPA concentration in egg yolk and potential oxidative stress in plasma and egg yolk. Moreover, all of these negative effects were reversible three weeks after GBH exposure in the diet. Coformulants are frequently included in the formulas of many herbicides and act by increasing the capacity of the active ingredients to penetrate the leaf cuticle. Some studies indicate that these coformulants

Table 2
Percentage of unfertilized eggs, early (EEM) and late (LEM) embryonic mortality and hatchability of incubated and fertile eggs in broiler hens during Glyphosate Based Herbicide (GBH) exposure (WEEK 4, 5 and 6, CT versus GBH) and after GBH exposure (*WEEK* 9, 10, and 11, CT versus Ex-GBH). Results are presented as means ± SEM. Effective are in parenthesis (n). P-values of the effect of the GBH exposure were considered as significant if $p < 0.05$. Lowercase letters correspond to unpaired t-test significance ($p < 0.05$).

		Unfertilized rate		EEM rate		LEM rate		Hatchability of incubated eggs		Hatchability of fertile eggs	
		Control	GBH	Control	GBH	Control	GBH	Control	GBH	Control	GBH
GBH exposure	Week 3	Artificial insemination									
	Week 4	7,81 ± 1.55 (n = 478)	9,25 ± 1.85 (n = 477)	2.62 ± 0.77[a] (n = 437)	78.80 ± 2.20[b] (n = 429)	0.70 ± 0.41[a] (n = 426)	10.58 ± 1.69[b] (n = 95)	86.91 ± 1.85[a] (n = 478)	0.57 ± 0.33[b] (n = 477)	97.54 ± 0.79[a] (n = 437)	8.57 ± 4.80[b] (n = 429)
	Week 5	22,14 ± 2.77 (n = 459)	29,27 ± 3.14 (n = 470)	11.52 ± 2.11[a] (n = 363)	81.25 ± 2.27[b] (n = 334)	0.89 ± 0.44[a] (n = 329)	11.16 ± 1.65[b] (n = 61)	67.81 ± 3.07[a] (n = 459)	0.19 ± 1.19[b] (n = 470)	98.32 ± 0.72[a] (n = 363)	10.00 ± 10.00[b] (n = 334)
	Week 6	88,37 ± 1.81 (n = 455)	90,03 ± 1.71 (n = 474)	44.52 ± 7.67[a] (n = 56)	83.33 ± 6.12[b] (n = 47)	0.00 ± 0.00[a] (n = 35)	15.63 ± 6.12[b] (n = 7)	7.32 ± 0.32[a] (n = 455)	0.24 ± 0.24[b] (n = 474)	99.96 ± 0.04[a] (n = 56)	0.00 ± 0.00[b] (n = 47)
After GBH exposure	Week 8	Artificial insemination									
	Week 9	6.34 ± 1.77 (n = 369)	6.99 ± 1.86 (n = 367)	4.01 ± 1.07 (n = 345)	3.01 ± 0.99 (n = 338)	1.27 ± 0.64 (n = 333)	0.97 ± 0.57 (n = 331)	85.00 ± 2.33 (n = 369)	83.44 ± 2.56 (n = 367)	95.54 ± 1.55 (n = 345)	93.27 ± 1.74 (n = 338)
	Week 10	23.20 ± 2.80[a] (n = 378)	34.55 ± 3.12[b] (n = 380)	12.53 ± 2.49 (n = 283)	9.38 ± 2.26 (n = 237)	1.64 ± 0.80 (n = 262)	1.93 ± 1.39 (n = 223)	64.35 ± 3.16 (n = 378)	56.69 ± 3.22 (n = 380)	95.71 ± 1.61 (n = 283)	99.03 ± 0.56 (n = 237)
	Week 11	90.29 ± 1.84 (n = 388)	93.87 ± 1.44 (n = 373)	26.00 ± 8.83 (n = 31)	20.59 ± 9.64 (n = 18)	4.00 ± 2.77 (n = 29)	0.00 ± 0.00 (n = 16)	6.77 ± 1.47 (n = 388)	4.96 ± 1.32 (n = 373)	99.95 ± 0.05 (n = 31)	99.87 ± 0.13 (n = 18)

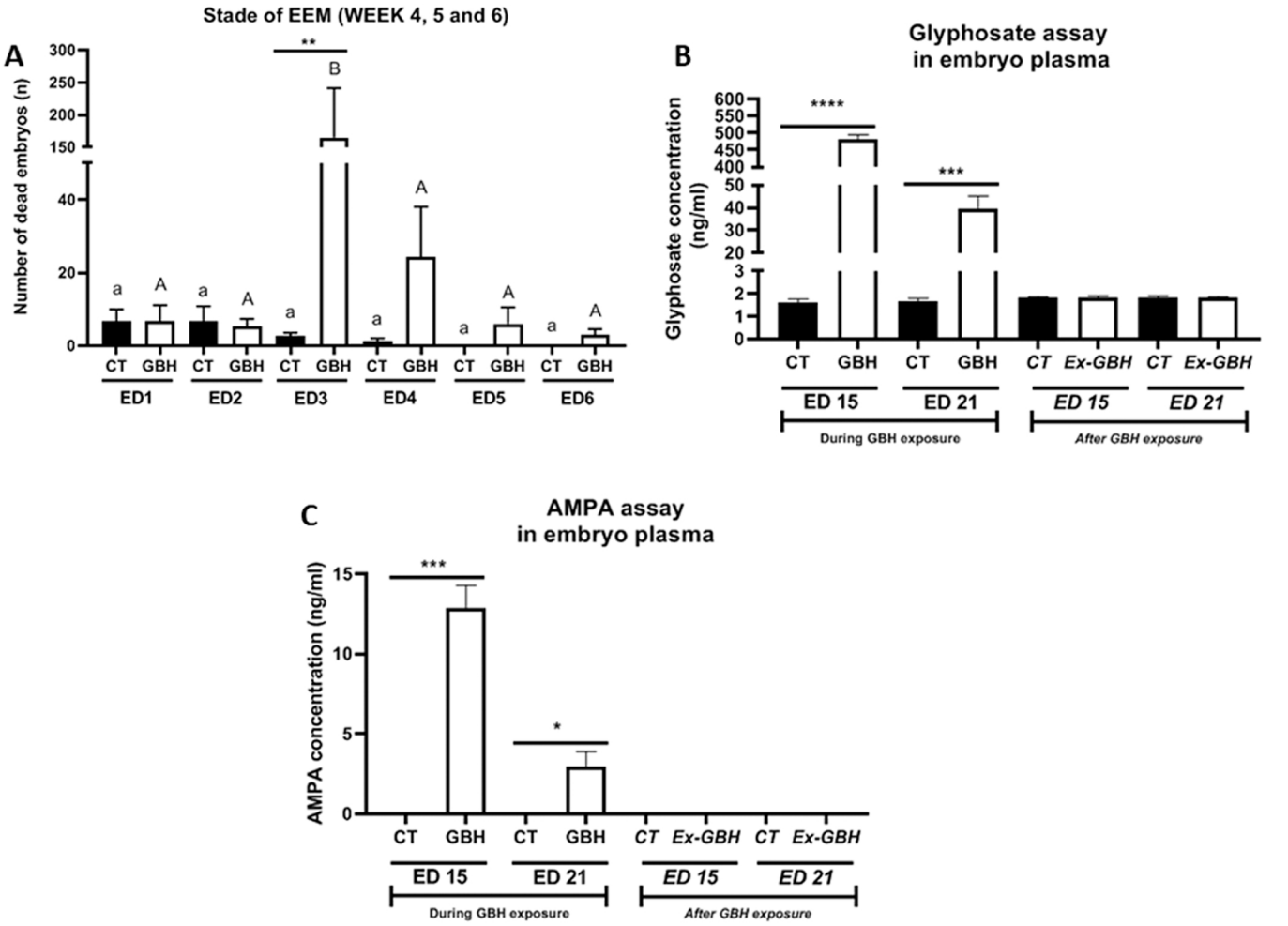


Fig. 4. Determination of embryonic stage for embryo mortality and glyphosate (Gly) and AMPA concentrations in the blood plasma of embryos. A) Embryonic stage determination for EEM in CT (black bars) and GBH (white bars) groups. B) Gly assay in the blood plasma of embryos at ED15 and ED21 for CT and GBH groups (WEEK 3) and for CT and Ex-GBH groups (*WEEK 11*) (ng/mL) (n = 4 per group). C) AMPA assay in the blood plasma of embryos at ED15 and ED21 for CT and GBH groups (WEEK 3) and for CT and Ex-GBH groups (*WEEK 11*) (ng/mL) (n = 4 per group). Results are presented as means ± SEM. Letters correspond to the ordinary two-way ANOVA significance ($p < 0.05$), followed by Tukey HSD's multiple comparisons test comparing the number of dead embryos in CT and GBH groups according to the embryonic stage; Stars (*) correspond to the unpaired t-test significance ($p < 0.05$) corresponding to the comparison between CT and GBH embryos (WEEK 3) and between CT and Ex-GBH embryos (*WEEK 11*) blood plasma for Gly and AMPA concentrations at ED15 and ED21. *$p < 0.05$; ***$p < 0.001$; ****$p < 0.0001$.

may be more toxic than glyphosate alone (Moore et al., 2012). Thus, we chose to determine the effect of GBH and not that of Gly alone.

4.1. GBH, metabolic functions and egg performance

Most of the studies that are available in avian species mainly focus on animal growth performances, welfare, and/or laying performances showing no or few adverse effects on measured parameters (Kubena et al., 1981). In our experiment, we chose to expose broiler hens to GBH via food with a concentration of Gly in the GBH food of 1250 mg/kg of food, which is about 3 times higher than the amounts found in cereals after GBHs are spread on fields (Eason and Scanlon, 2002). Moreover, this concentration is higher than the maximum residue level of 20 mg/kg of Gly found in several feed crops and defined by the European Union (European Food Safety Authority (EFSA), 2018). About egg quality, two studies conducted in quail with a parental dietary exposure to Gly (200 mg/kg of feed) showed that Gly does not alter egg production and quality (egg, yolk, or shell mass and egg hormone concentration) in females (Ruuskanen et al., 2020a, 2020b). These data are in good agreement with our data except for a significant increase in eggshell quality. Indeed, we demonstrated that statistical difference were observed, between CT and GBH, for eggshell percent (higher in GBH group) and consequently also for index, and eggshell thickness. This result is different from quail species as Ruuskanen et al. (Ruuskanen et al., 2020a) found no difference in eggshell quality. In accordance with results from other studies, our treated hens with GBH exhibited normal phenotype and no difference in terms of bodyweight and egg production compared to their CT counterparts. Indeed, a prospective study conducted in broiler breeder egg production companies revealed no association between residues of Gly in the food and the laying rate (Foldager et al., 2021).

4.2. GBH, ovarian functions and fertilization

In our study we observed that steroid concentrations in yolks were similar in GBH and CT groups, leading to the hypothesis that dietary GBH exposure doesn't affect ovarian function in laying hens. In agreement with our hypothesis, we demonstrated that in our condition's expression of steroidogenesis enzyme (*CYP11A1*, *CYP1A19*) and cholesterol carrier (*StAR*) in granulosa and theca cells was not in vivo affected by dietary GBH exposure. These data are opposite to the main data observed in vitro. A lot of studies showed that GBH or Gly inhibit

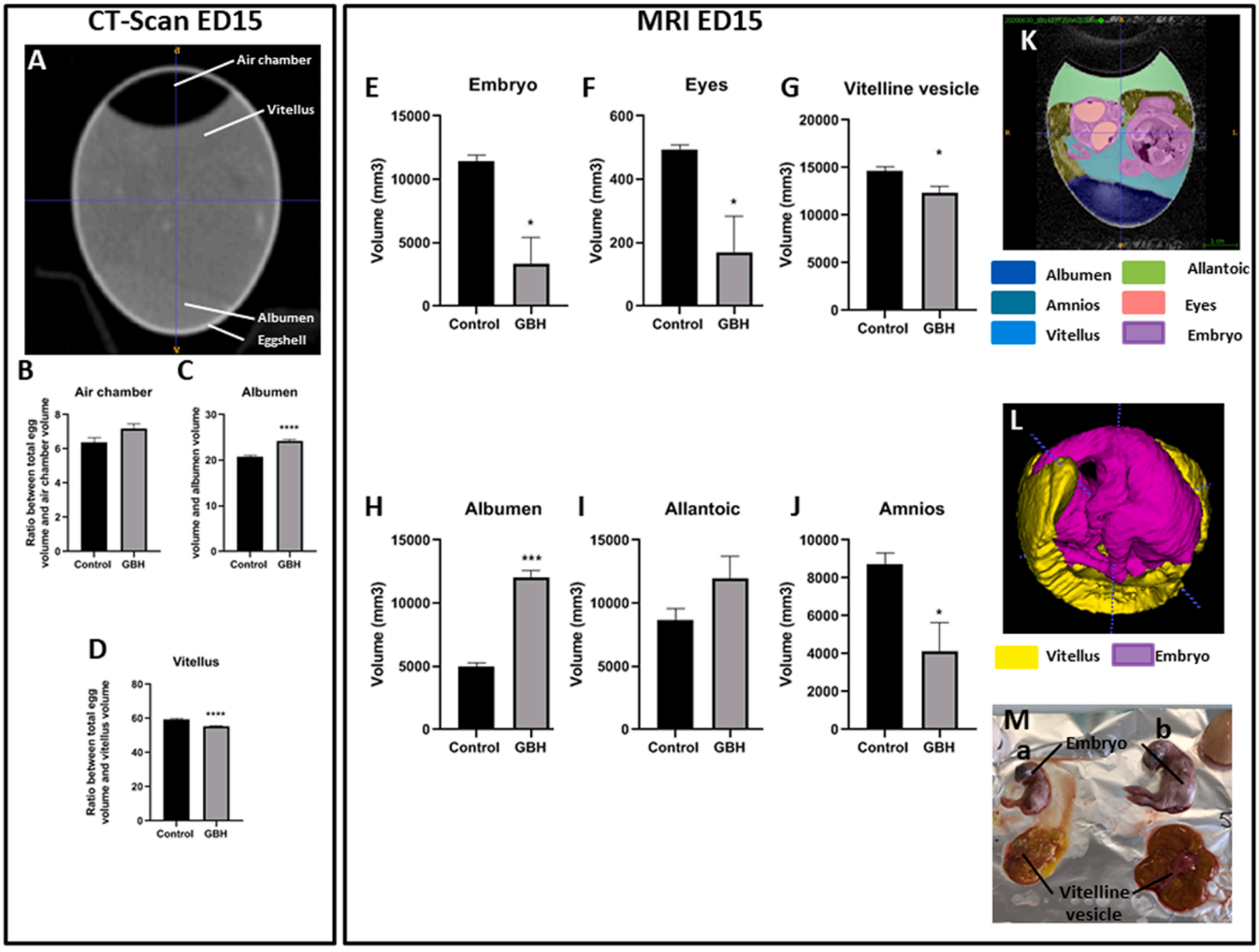


Fig. 5. Computerized tomography and Magnetic Resonance Imaging analysis of incubated eggs at ED15. Representative picture of A) analyzed incubated eggs at ED15 by CT-Scan; B) Ratio between the total egg volume and the air chamber volume, C) the albumen volume and D) the vitellus, respectively (n = 10 eggs per group). E) Volume of the embryo body, F) Volume of the eyes of the embryo, G) the vitelline vesicle, H) albumen, I) allantoic, and J) amnios determined by analysis of MRI images at ED15 (n = 4 per group). Representative picture of K) analyzed incubated egg at ED15. Structures are colorized with the albumen in blue, the amnios in dark blue, the vitellus in light blue, the allantoic in green, the eyes in pink, and the embryo body in purple. Representative picture of L) 3 dimensions reconstructed analyzed incubated egg at ED15 with the vitellus in yellow and the body of the embryo in purple. Qualitative photography M) of a GBH embryo (left) and of a CT embryo (right) with their respective vitelline vesicle showing their size difference. Results are presented as means ± SEM. Stars (*) correspond to the unpaired t-test significance ($p < 0.05$) corresponding to the comparison between CT and GBH eggs at ED15. **$p < 0.01$; ****$p < 0.0001$.

steroidogenesis, but these results were observed with higher doses of Gly (Alarcón et al., 2020; Fu et al., 2021; Perego et al., 2017b, 2017a; Ren et al., 2018; Wrobel, 2018). We went further in our investigations and demonstrated that after artificial insemination, the unfertile egg rate was not affected by the treatment, so GBH does not appear to affect egg fertilization (Uren Webster et al., 2014). However, Gly alone and one of its commercial formulation appears to affect oocyte maturation in xenopus (Slaby et al., 2020) and so, could affect fertility in some species.

4.3. GBH and embryo development and chick viability

Most studies concerning the effect of GBH on the embryo development in chicken species involved direct exposition to GBH with *in ovo* injections or egg immersion (Fathi et al., 2020, 2019; Lehel et al., 2021; Paganelli et al., 2010). Nevertheless, all these studies concluded that GBH have adverse effects on embryo development. Two studies conducted in quail with a parental exposure to Gly via food (200 mg/kg of food) showed poor embryonic development within the treated group compared to CT (Ruuskanen et al., 2020a). In a second study, the authors confirmed the same result (Ruuskanen et al., 2020b). But according to our knowledge and literature, no studies have been conducted on fertility and embryonic development in the case of parental exposure to GBH via the food in chicken.

Our results showed that Gly and AMPA were found within the plasma and eggs from hens treated with GBH. In eggs, it appears that the two molecules are mainly found in the yolk, whereas they have low concentrations or are undetectable in the albumen. Gly concentrations in egg yolk were detectable 4 days after the beginning of exposure before reaching a maximum of 8 days after the beginning of exposure, suggesting an accumulation. At the end of exposure, Gly concentrations decreased continuously until day 8. However, during the artificial incubation period, our results showed a dramatic early embryonic death occurring at ED3 in eggs from the GBH group. During ED3, corresponding to stage 20 according to Hamburger and Hamilton (1992), the embryo lies on its left side. There is the beginning of the blood circulation and the appearance of the cardiac structures which begin to beat. The vitelline membrane extends over the surface of the yolk (Hamburger and Hamilton, 1992). Thus, embryonic mortality at this stage could be due to a passage of Gly from the yolk to the embryo through its new blood circulation. Foldager et al., 2021 found a negative association

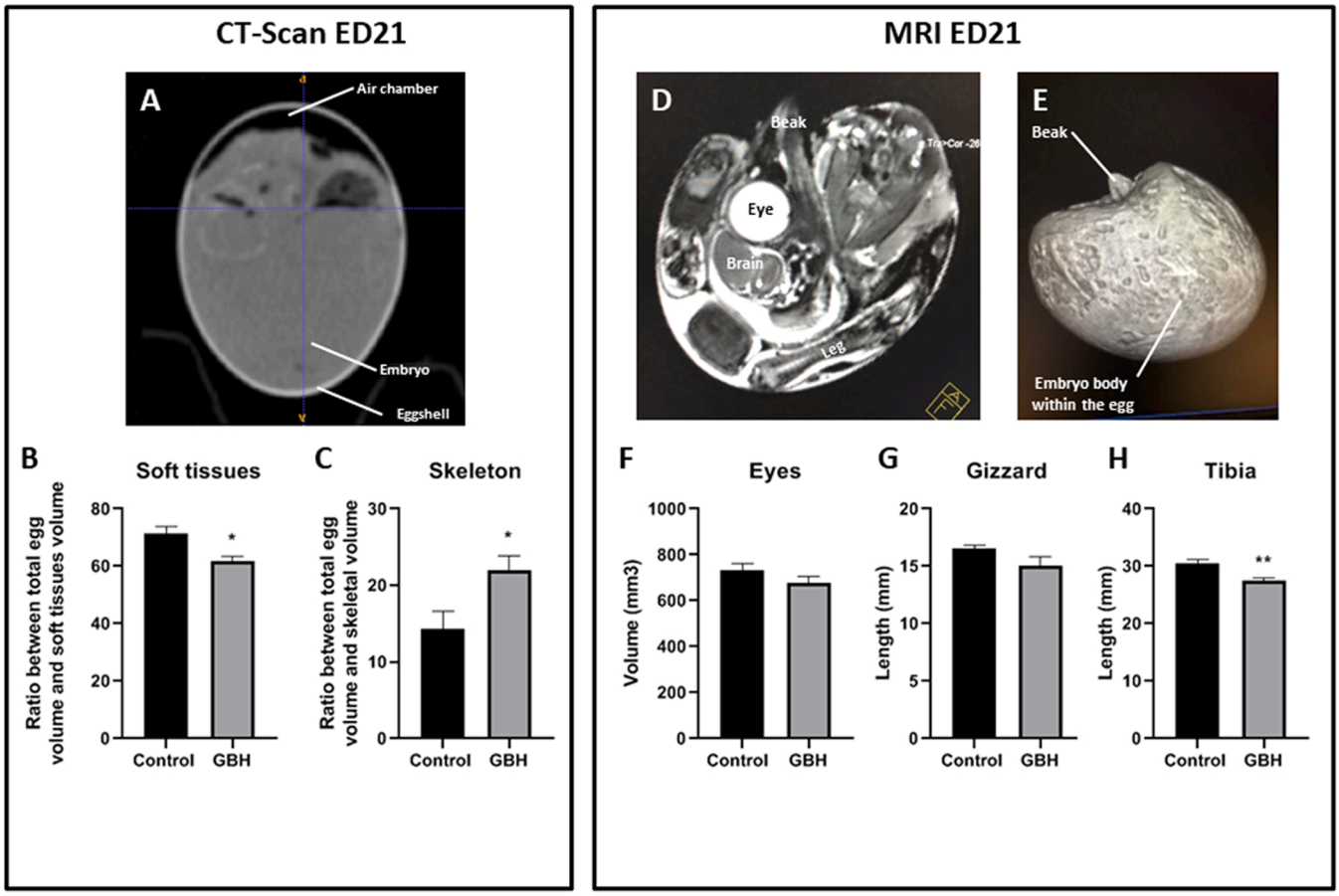


Fig. 6. Computerized tomography and Magnetic Resonance Imaging analysis of incubated eggs at ED21. Representative picture of A) computerized tomography analyzed incubated egg at ED21 (n = 5 per group); B) Ratio between the total egg volume, and C) the soft tissues and the skeleton volume, respectively. Representative pictures of D) and E) in 3 dimensions Magnetic Resonance Imaging analyzed incubated egg at ED21 (n = 4 per group); F) Volume of the eyes of the embryo, G) length of the gizzard and H) of the tibia. Results are presented as means ± SEM. Stars (*) correspond to the unpaired t-test significance ($p < 0.05$) corresponding to the comparison between CT and GBH eggs at ED6 and ED15. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$.

between residues of Gly commonly found in food for broiler breeders and egg hatchability but give no information about the stage of embryonic death (Foldager et al., 2021). In contrary, Ruuskanen et al., 2020 only found a tendency for embryonic death in eggs from the GBH treated group in quail species (Ruuskanen et al., 2020b). This difference could be due to the dose used in the protocol and species specificities. This important EEM was also followed by a significantly higher LEM, meaning that surviving ED3 mass death embryos continue to be affected by GBH treatment during incubation. Our results about the eggshell quality could also explain this massive embryo loss. Indeed, eggshell thickness, elastic modulus, toughness and pore size are important parameters for embryo survival and could be affected by exposure to pesticides and thus alter embryo development. These observations have been already made in several wildlife species of oviparous animals (Beldomenico et al., 2007; Buck et al., 2020; Fry, 1995; Stoker et al., 2013; Tavalieri et al., 2020). We quantified Gly and AMPA in embryo plasma at ED15 and ED21 and found both molecules in the plasma of the embryo of the GBH group, indicating a passage of the two molecules from the yolk to the blood of embryo. In addition, we have studied in depth the development of the embryo by analyzing the eggs during incubation by non-invasive methods such as CT-Scan and MRI. These original results highlighted a significant delay in embryonic growth within the GBH group. This was associated with disturbances in the development of embryonic annexes during the stages studied with a larger yolk sac at ED6, followed by a smaller yolk sac at ED14 - 15 associated with a higher albumen volume in the GBH group. Moreover, embryos exhibited a significant reduction of organs weight (around 40 %) with a higher reduction of the digestive tract weight (60 %) when compared to the CT. During the dissection experiment, we made the same observation for yolk sacs and it also appeared that this structure was abnormal with spillage of its contents into the albumen compartment.

MRI analysis showed an important embryo growth retardation of GBH embryos compared to CT at ED15. Indeed, the total embryo and eye volumes were strongly reduced in the GBH group but these differences were abolished at ED21. This is explained by the fact that 15 embryos per group were analyzed by MRI at ED15, but among these 15 embryos, only 5 reached the ED21 stage. We noticed that the embryos exhibiting the highest growth retardation died during the incubation process and that only the embryos with the lowest growth retardation survived until ED21. Our observations on embryonic growth retardation are also in agreement with other studies showing that direct exposure of chicken embryos by injections of GBH *in ovo* induces histopathological alterations of several organs, imbalances of serum parameters and an oxidative stress (Fathi et al., 2020, 2019). Moreover, another study with GBH *in ovo* injection or egg immersion showed a reduction in the average body weight, and resulted in a higher incidence of congenital anomalies and embryo death (Lehel et al. (2021). At a molecular level, Paganelli et al. demonstrated that GBH impair retinoic acid and Shh signaling inducing teratogenic effects and embryonic death (Paganelli et al., 2010). This is consistent with the important role of these signaling pathways in embryo development in chicken species (Stainton and Towers, 2022). At ED21, CT-Scan results showed a significant increase of skeleton volume associated with a decrease of soft tissues volume in

Table 3
Eggs and embryos characteristics of broiler hens during Glyphosate Based Herbicide (GBH) exposure (red, week 6, CT versus GBH) and after GBH exposure (green, week 11, CT versus GBH) at ED15 and ED21. The weight of the eggs were determined at dissection. After dissection, embryo, vitelline vesicle, liver, brain, and digestive tract were weighted. After birth, chick's Tona scores were determined. Results are presented as means ± SEM. P-values of the effect of the GBH exposure were considered as significant if $p < 0.05$. Lowercase letters correspond to unpaired t-test significance ($p < 0.05$).

	GBH exposure		*After GBH* exposure	
ED15	**ED15 Control (WEEK6 n = 20)**	**ED15 GBH (WEEK6 n = 20)**	***ED15 Control (WEEK11 n = 20)***	***ED15 Ex-GBH (WEEK11 n = 20)***
Egg (g)	55.87 ± 0.70	54.60 ± 0.70	60.65 ± 0.92	60.24 ± 0.73
Embryo (g)	21.32 ± 0.24[a]	11.40 ± 1.18[b]	20.54 ± 0.50	20.94 ± 0.58
Vitelline vesicle (g)	13.08 ± 0.53[a]	6.063 ± 0.77[b]	15.24 ± 0.70	14.85 ± 0.61
Liver (g)	0.39 ± 0.014[a]	0.21 ± 0.02[b]	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.02
Brain (g)	0.58 ± 0.02[a]	0.34 ± 0.03[b]	0.52 ± 0.02[a]	0.59 ± 0.01[b]
Digestive tract (g)	1.14 ± 0.06[a]	0.48 ± 0.07[b]	1.02 ± 0.06	1.03 ± 0.07
Heart (g)	0.14 ± 0.01[a]	0.08 ± 0.01[b]	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01
ED21	**E21 Control (WEEK6 n = 7)**	**E21 GBH (WEEK6 n = 4)**	***E21 Control (WEEK11 n = 40)***	***E21 Ex-GBH (WEEK11 n = 40)***
Chick (g)	41.09 ± 1.04	38.16 ± 2.25	43.90 ± 0.48	44.07 ± 0.39
Brain (g)	0.89 ± 0.03[a]	0.74 ± 0.05[b]	0.89 ± 0.02	0.88 ± 0.02
Digestive tract (g)	4.97 ± 0.09	4.33 ± 0.37	5.38 ± 0.09	5.39 ± 0.07
Heart (g)	0.33 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.33 ± 0.008	0.33 ± 0.008
Liver (g)	1.02 ± 0.03[a]	0.84 ± 0.05[b]	1.12 ± 0.02	1.15 ± 0.03
Vitelline vesicle (g)	2.97 ± 0.35	3.01 ± 0.92	2.71 ± 0.01	2.76 ± 0.02
Birth	**Control (WEEK6 and 7 n = 7)**	**GBH (WEEK6 and 7 n = 4)**	***Control (WEEK11 and 12 n = 100)***	***Ex-GBH (WEEK11 and 12 n = 87)***
Tona score	105.00 ± 2.17[a]	78.25 ± 9.93[b]	105.40 ± 0.50[a]	102.30 ± 0.67[b]

GBH group. Within the GBH group, by MRI, we noticed a smaller length of tibia bone. Previous studies in zebrafish species demonstrated that Gly exposure can induce bone disorders in embryos with craniofacial and locomotor disorders (Díaz-Martín et al., 2021). Moreover, it has been established that Gly and AMPA can alter estrogen receptor alpha osteopontin and bone sialoprotein. Exposed embryos present spine deformities as adults and these developmental alterations are likely induced by changes in protein levels related to bone and cartilage formation (Zhang et al., 2021). In xenopus species, cephalic malformations and abnormal development of the craniofacial skeleton have been observed in exposed embryos, which also showed higher retinoic acid activity (Bonfanti et al., 2018; Paganelli et al., 2010). These last results are completely new and skeletal abnormalities have to be investigated more deeply even if Gly has been shown to have an influence on bone weight, length, and mineral content in growing chicks exposed to Gly (Kubena et al., 1981). Finally, after birth, dissection permitted to put in evidence a smaller brain and liver in GBH chicks while the Tona score was significantly decreased in this same group compared to CT.

4.4. Reversibility of GBH effects on embryo development

In our experiment, we removed GBH from the diet of our animals for two weeks before repeating the fertilization experiments by artificially inseminating the hens with semen from unexposed roosters. For most measured parameters (measurement of egg production and quality; fertility and embryo development parameters; bodyweight, carcass traits, and embryo and chick quality), we found no significant difference between the CT and GBH groups, indicating reversibility of the adverse effects of GBH on these parameters. We only found that chicks from the GBH group at ED21 have a significantly heavier brain and a reduced Tona score compared to chicks from the CT group. This last result could indicate that GBH can have long-term effects on the offspring like our previous study on the effects of this GBH on rooster fertility which revealed epigenetic disorders measured on sperm DNA (Serra et al., 2021).

5. Conclusion

Our results showed that a chronic GBH diet of 47 mg/kg/day (half of the NOAEL in poultry) during the laying period in broiler breeder females strongly reduced eggshell quality and early embryo development where it did not affect egg performance, fertilization level, and ovarian steroidogenesis. Furthermore the surviving embryo had a delay of growth for most of the organs except for skeletal volume. These negative effects on the eggshell parameters and the embryogenesis were associated to an increase in Gly concentration and oxidative stress in egg yolks. Interestingly, they were totally abolished two weeks after the arrest of dietary GBH exposure. Further studies are required to investigate the effect of GBH on embryo and embryonic annexes development. Additionally, as indicated by our results on brain weight differences between CT and Ex-GBH group chicks, the long-term effects of this GBH need to be investigated, particularly with a focus on the epigenome of the offspring.

Funding

This work was financially supported by the INRAE, Région Centre Val de Loire, France (HAPOFERTI project, APR IR 32000868).

CRediT authorship contribution statement

Anthony Estienne: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Mathias Fréville:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Guillaume Bourdon:** Methodology, Writing – review & editing. **Christelle Ramé:** Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Marine Chahnamian**: Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Joël Delaveau:** Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Christophe Rat:** Methodology, Writing – review & editing. **Aurélien Brionne:** Methodology, Writing – review & editing. **Pascal Chartrin:** Methodology, Writing – review & editing. **Hans Adriaensen:** Methodology, Writing – review & editing. **François Lecompte:** Methodology, Writing – review & editing. **Pascal Froment:** Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Data curation, Writing – original draft. **Joëlle Dupont:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

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

Acknowledgements

We would like to thank the DOVE team in BOA unit for their tips concerning MRI and Instron analyses.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113741.

References

Agostini, L.P., Dettogni, R.S., dos Reis, R.S., Stur, E., dos Santos, E.V.W., Ventorim, D.P., Garcia, F.M., Cardoso, R.C., Graceli, J.B., Louro, I.D., 2020. Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. Sci. Total Environ. 705, 135808 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135808.

Alarcón, R., Rivera, O.E., Ingaramo, P.I., Tschopp, M.V., Dioguardi, G.H., Milesi, M.M., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., 2020. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the uterine differentiation of prepubertal ewe lambs. Environ. Pollut. 265, 114874 https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114874.

Anthony Estienne, 2022. Supplemental data Estienne. https://doi.org/10.17632/X7TDK9Z2DJ.2.

Bain, M.M., Fagan, A.J., Mullin, J.M., McNaught, I., McLean, J., Condon, B., 2007. Noninvasive monitoring of chick development in ovo using a 7T MRI system from day 12 of incubation through to hatching. J. Magn. Reson. Imaging JMRI 26, 198–201. https://doi.org/10.1002/jmri.20963.

Barbe, A., Mellouk, N., Ramé, C., Grandhaye, J., Anger, K., Chahnamian, M., Ganier, P., Brionne, A., Riva, A., Froment, P., Dupont, J., 2020. A grape seed extract maternal dietary supplementation improves egg quality and reduces ovarian steroidogenesis without affecting fertility parameters in reproductive hens. PLoS One 15, e0233169. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233169.

Batt, B.D., Black, J.A., Cowan, W.F., 1980. The effects of glyphosate herbicide on chicken egg hatchability. Can. J. Zool. 58, 1940–1942. https://doi.org/10.1139/z80-265.

Beldomenico, P.M., Rey, F., Prado, W.S., Villarreal, J.C., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., 2007. In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of Caiman latirostris (Crocodylia: Alligatoridae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 68, 246–251. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.018.

Bonfanti, P., Saibene, M., Bacchetta, R., Mantecca, P., Colombo, A., 2018. A glyphosate micro-emulsion formulation displays teratogenicity in Xenopus laevis. Aquat. Toxicol. 195, 103–113. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.007.

Buck, A., Carrillo-Hidalgo, J., Camarero, P.R., Mateo, R., 2020. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in common kestrel eggs from the Canary Islands: spatiotemporal variations and effects on eggshell and reproduction. Chemosphere 261, 127722. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127722.

Canépa, S., Lainé, A.-L., Bluteau, A., Fagu, C., 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins 12.

Dallegrave, E., Mantese, F.D., Oliveira, R.T., Andrade, A.J.M., Dalsenter, P.R., Langeloh, A., 2007. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. Arch. Toxicol. 81, 665–673. https://doi.org/10.1007/s00204-006-0170-5.

Defarge, N., de Vendômois, Spiroux, Séralini, G.E, J., 2018. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. Toxicol. Rep. 5, 156–163. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025.

Defarge, N., Takács, E., Lozano, V., Mesnage, R., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.-E., Székács, A., 2016. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. Int. J. Environ. Res. Public. Health 13, 264. https://doi.org/10.3390/ijerph13030264.

Díaz-Martín, R.D., Carvajal-Peraza, A., Yáñez-Rivera, B., Betancourt-Lozano, M., 2021. Short exposure to glyphosate induces locomotor, craniofacial, and bone disorders in zebrafish (Danio rerio) embryos. Environ. Toxicol. Pharmacol. 87, 103700 https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103700.

Eason, T.H., Scanlon, P.F., 2002. Effects of atrazine and glyphosate ingestion on body weight and nutritional well-being of Coturnix quail. Z. Für Jagdwiss. 48, 281–285. https://doi.org/10.1007/BF02192419.

European Food Safety Authority (EFSA), 2018. Evaluation of the impact of glyphosate and its residues in feed on animal health. EFSA J. 16. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5283.

Fathi, M.A., Abdelghani, E., Shen, D., Ren, X., Dai, P., Li, Z., Tang, Q., Li, Y., Li, C., 2019. Effect of in ovo glyphosate injection on embryonic development, serum biochemistry, antioxidant status and histopathological changes in newly hatched chicks. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 103, 1776–1784. https://doi.org/10.1111/jpn.13181.

Fathi, M.A., Han, G., Kang, R., Shen, D., Shen, J., Li, C., 2020. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 16865–16875. https://doi.org/10.1007/s11356-020-08269-3.

Foldager, L., Winters, J.F.M., Nørskov, N.P., Sørensen, M.T., 2021. Impact of feed glyphosate residues on broiler breeder egg production and egg hatchability. Sci. Rep. 11, 19290. https://doi.org/10.1038/s41598-021-98962-1.

Fry, D.M., 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. Environ. Health Perspect. 103 (Suppl 7), 165–171. https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7165.

Fu, H., Gao, F., Wang, X., Tan, P., Qiu, S., Shi, B., Shan, A., 2021. Effects of glyphosate-based herbicide-contaminated diets on reproductive organ toxicity and hypothalamic-pituitary-ovarian axis hormones in weaned piglets. Environ. Pollut. 272, 115596 https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115596.

Gigante, P., Berni, M., Bussolati, S., Grasselli, F., Grolli, S., Ramoni, R., Basini, G., 2018. Glyphosate affects swine ovarian and adipose stromal cell functions. Anim. Reprod. Sci. 195, 185–196. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.023.

Gillezeau, C., van Gerwen, M., Shaffer, R.M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., Taioli, E., 2019. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. Environ. Health 18, 2. https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5.

Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. Dev. Dyn. 195, 231–272. https://doi.org/10.1002/aja.1001950404.

Hamdaoui, L., Naifar, M., Rahmouni, F., Harrabi, B., Ayadi, F., Sahnoun, Z., Rebai, T., 2018. Subchronic exposure to kalach 360 SL-induced endocrine disruption and ovary damage in female rats. Arch. Physiol. Biochem. 124, 27–34. https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1352606.

Ingaramo, P., Alarcón, R., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., 2020. Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? Mol. Cell. Endocrinol. 518, 110934 https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110934.

Jarrell, Z.R., Ahammad, M.U., Benson, A.P., 2020. Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. Vet. Anim. Sci. 10, 100126 https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100126.

Kubena, L.F., Smalley, H.E., Farr, F.M., 1981. Influence of glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) on performance and selected parameters in broilers. Poult. Sci. 60, 132–136. https://doi.org/10.3382/ps.0600132.

Lapenna, D., Ciofani, G., Pierdomenico, S.D., Giamberardino, M.A., Cuccurullo, F., 2001. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. Free Radic. Biol. Med. 31, 331–335. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00584-6.

Lehel, J., Szemerédy, G., Szabó, R., Major, L., Grúz, A., Budai, P., 2021. Reproductive toxicological changes in avian embryos due to a pesticide and an environmental contaminant. Acta Vet. Hung. https://doi.org/10.1556/004.2021.00043.

Martinez, A., Al-Ahmad, A.J., 2019. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogeneic model of the human blood-brain barrier. Toxicol. Lett. 304, 39–49. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.013.

Martins-Gomes, C., Silva, T.L., Andreani, T., Silva, A.M., 2022. Glyphosate vs. glyphosate-based herbicides exposure: a review on their toxicity. J. Xenobiotics 12, 21–40. https://doi.org/10.3390/jox12010003.

Mellouk, N., Ramé, C., Delaveau, J., Rat, C., Marchand, M., Mercerand, F., Travel, A., Brionne, A., Chartrin, P., Ma, L., Froment, P., Dupont, J., 2018. Food restriction but not fish oil increases fertility in hens: role of RARRES2? Reproduction 155, 321–331. https://doi.org/10.1530/REP-17-0678.

Mesnage, R., Benbrook, C., Antoniou, M.N., 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. 128, 137–145. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E., 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. Food Chem. Toxicol. 84, 133–153. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012.

Moore, L.J., Fuentes, L., Rodgers, J.H., Bowerman, W.W., Yarrow, G.K., Chao, W.Y., Bridges, W.C., 2012. Relative toxicity of the components of the original formulation of roundup® to five north American anurans. Ecotoxicol. Environ. Saf. 78, 128–133. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.025.

Muñoz, J.P., Bleak, T.C., Calaf, G.M., 2021. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. Chemosphere 270, 128619. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619.

Oliveira, A.G., Telles, L.F., Hess, R.A., Mahecha, G.A.B., Oliveira, C.A., 2007. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes Anas platyrhynchos. Reprod. Toxicol. 23, 182–191. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.11.004.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., Carrasco, A.E., 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. Chem. Res. Toxicol. 23, 1586–1595. https://doi.org/10.1021/tx1001749.

Perego, M.C., Caloni, F., Cortinovis, C., Schutz, L.F., Albonico, M., Tsuzukibashi, D., Spicer, L.J., 2017a. Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells in vitro. Chemosphere 188, 274–279. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.007.

Perego, M.C., Schutz, L.F., Caloni, F., Cortinovis, C., Albonico, M., Spicer, L.J., 2017b. Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro: Glyphosate effects on bovine granulosa. J. Appl. Toxicol. 37, 692–698. https://doi.org/10.1002/jat.3417.

Ren, X., Li, R., Liu, J., Huang, K., Wu, S., Li, Y., Li, C., 2018. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. Environ. Pollut. 243, 833–841. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.049.

Ruuskanen, S., Rainio, M.J., Gómez-Gallego, C., Selenius, O., Salminen, S., Collado, M.C., Saikkonen, K., Saloniemi, I., Helander, M., 2020a. Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: a long-term experiment in an avian model. Environ. Pollut. 266, 115108 https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115108.

Ruuskanen, S., Rainio, M.J., Uusitalo, M., Saikkonen, K., Helander, M., 2020b. Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model. Sci. Rep. 10, 6349. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63365-1.

Serra, L., Estienne, A., Bourdon, G., Ramé, C., Chevaleyre, C., Didier, P., Chahnamian, M., El Balkhi, S., Froment, P., Dupont, J., 2021. Chronic dietary exposure of roosters to a glyphosate-based herbicide increases seminal plasma glyphosate and AMPA concentrations, alters sperm parameters, and induces metabolic disorders in the progeny. Toxics 9, 318. https://doi.org/10.3390/toxics9120318.

Slaby, S., Titran, P., Marchand, G., Hanotel, J., Lescuyer, A., Leprêtre, A., Bodart, J.-F., Marin, M., Lemiere, S., 2020. Effects of glyphosate and a commercial formulation Roundup® exposures on maturation of Xenopus laevis oocytes. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 3697–3705. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04596-2.

Stainton, H., Towers, M., 2022. Retinoic acid influences the timing and scaling of avian wing development. Cell Rep. 38, 110288 https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110288.

Stoker, C., Zayas, M.A., Ferreira, M.A., Durando, M., Galoppo, G.H., Rodríguez, H.A., Repetti, M.R., Beldoménico, H.R., Caldini, E.G., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M., 2013. The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (Caiman latirostris) are associated with the egg burden of organochlorine compounds. Ecotoxicol. Environ. Saf. 98, 191–195. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.022.

Tavalieri, Y.E., Galoppo, G.H., Canesini, G., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M.M., 2020. Effects of agricultural pesticides on the reproductive system of aquatic wildlife species, with crocodilians as sentinel species. Mol. Cell. Endocrinol. 518, 110918 https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110918.

Tona, K., Onagbesan, O., De Ketelaere, B., Decuypere, E., Bruggeman, V., 2004. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight, and chick posthatch growth to forty-two days. J. Appl. Poult. Res. 13, 10–18. https://doi.org/10.1093/japr/13.1.10.

Uren Webster, T.M., Laing, L.V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Sci. Technol. 48, 1271–1279. https://doi.org/10.1021/es404258h.

Waddington, D., Walker, M.A., 1993. Relationship between clustering of post-ovulatory and hierarchical follicles and their order of ovulation in the mature domestic hen (Gallus gallus domesticus). Reprod. Fertil. Dev. 5, 65–71. https://doi.org/10.1071/rd9930065.

Wrobel, M.H., 2018. Glyphosate affects the secretion of regulators of uterine contractions in cows while it does not directly impair the motoric function of myometrium in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 349, 55–61. https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.04.031.

Zhang, W., Wang, J., Song, J., Feng, Y., Zhang, S., Wang, N., Liu, S., Song, Z., Lian, K., Kang, W., 2021. Effects of low-concentration glyphosate and aminomethyl phosphonic acid on zebrafish embryo development. Ecotoxicol. Environ. Saf. 226, 112854 https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112854.

V. Fréville et al., 2024b

Mathias Fréville, Ophélie Bernardi, Christelle Ramé, Pascal Froment, Joëlle Dupont, Vitamin E alleviates Glyphosate-based herbicide-induced progesterone secretion inhibition and oxidative stress increase in chicken primary granulosa cells, Poultry Science, 2024, 104194, ISSN 0032-5791, https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104194.

Poultry Science®

Vitamin E alleviates glyphosate-based herbicide-induced progesterone secretion inhibition and oxidative stress increase in chicken primary granulosa cells

Mathias Fréville, Ophélie Bernardi, Christelle Ramé, Pascal Froment, and Joëlle Dupont[1]

CNRS, IFCE, INRAE Animal Physiology Department, Université de Tours, PRC, F-37380, Nouzilly, France

ABSTRACT Glyphosate-based herbicides (**GBH**) are the most extensively used herbicides worldwide. Despite a presumed nondangerousness for animals, several studies reported negative effects after a GBH exposure in several animal models including birds, notably on reproductive functions. Several studies concerning the advantages of Vitamin E (**VE**) for antioxidant activity but also growth and reproduction have been reported in birds. However, it remains unclear whether VE could alleviate the negative effect of GBHs on chicken ovarian cells. Here we exposed chicken primary granulosa cells (**GCs**) from F1 and F3/4 follicles to growing doses of GBH (0.036, 0.36, 3.6, and 36 gly eq/L), with or without VE supplementation (1 mg/L) and investigated cell viability, proliferation, oxidative stress and steroidogenesis. GBH exposure did not affect F1 and F3 GCs viability but it increased cell proliferation only in F1 GCs and this effect was not altered by VE. In both F1 and F3/4 GCs, GBH exposure increased total oxidant status (**TOS**), reduced total antioxidant status (**TAS**) and consequently increased index of oxidative stress (**OSI**) in dose dependent manner. This latter effect for GBH 36 mg eq gly/L was totally abolished in response to VE. In both F1 and F3/4 GCs, GBH exposure reduced progesterone secretion in a dose dependent manner and this effect with GBH 0.36 and 1.8 mg eq glyphosate/L was alleviated by VE. However, we did not observe any effect of GBH and VE on the gene expression of several components of the steroidogenesis process. Taken together, these results show that GBH may have endocrine disruptor effects, and that these effects might be alleviated by antioxidant VE supplementation.

Key words: glyphosate-based Herbicide, endocrine disruptor, poultry, steroidogenesis, progesterone

2024 Poultry Science 103:104194
https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104194

INTRODUCTION

Glyphosate-based herbicides (**GBH**) are powerful herbicides extensively used in agriculture. Their great effectiveness and their supposed innocuity lead them to be the most spread herbicides in the world (Gill et al., 2018). Their active molecule is called glyphosate (**Gly**) or N-(phosphonomethyl) glycine. It acts by inhibiting EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase), a key enzyme of the shikimate pathway of the biosynthesis of aromatic amino acids (Schönbrunn et al., 2001), which eventually results in a default in amino acids

© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Abbreviations: ABTS, 2,2′-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]; ACTB, Actin B; AMPA, Aminomethyl phosphonic acid; ANOVA, ANalyse Of VAriance; BRDU, Bromodesoxyuridin; bw, body weight; CAT, Catalase; CCK8, Cell Counting Kit-8; cDNA, Complementary DNA; Cq, Quantification cycle; CT, Control; CV, Coefficient of variation; CYP11A1, Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1; CYP19A1, Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DNA, Desoxyribonucleic acid; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; E, Efficiency; E2, Estradiol; ED, Endocrine disruptors; EEF1α, Eukaryotic elongation factor 1 alpha; EFSA, European Food Safety Authority; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; ER, Estrogen receptor; ERK, Extracellular signal-regulated kinases; F1, F1 follicles; F3/4, F3 and F4 follicles; FBS, Fetal bovine serum; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GBH, Glyphosate-based herbicides; GC, Granulosa cells; Gly, Glyphosate; gly eq, Glyphosate equivalent; GST, Glutathione S-transferase; HSD3beta, 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase; IARC, International Agency for Research on Cancer; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1; INRAE, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement; LH, Luteinizing hormone; MMLV, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase; NOAEL, No Observed Adverse Effect Level; OSI, Oxidative Stress Index; P450scc, Cytochrome P450 side-chain cleavage; PI3K, Phosphoinositide 3-kinase; qPCR, Quantitative Polymerisation Chain Reaction; RNA, Ribonucleic acid; ROS, Reactive Oxygen Species; RT, Retrotranscriptase; SEM, Standard error of the mean; SOD, Superoxyde dismutase; StAR, Steroidogenic Acute Regulatory; t.test, Student's t-test; TAS, Total Antioxidant Status; TOS, Total Oxidant Status; VE, Vitamin E; VEGFR2, Vascular endothelial growth factor receptor 2

Received May 4, 2024.
Accepted August 5, 2024.

[1]Corresponding author: joelle.dupont@inrae.fr

supply and other dysregulations in the plant, leading it to die (Bradberry et al., 2004). Its main metabolite, called aminomethyl phosphonic acid (**AMPA**) is obtained in soils after a bacterial biodegradation of Gly (Bai and Ogbourne, 2016). GBHs use in Europe is controversial. Indeed, despite the existence of numerous studies detecting adverse effects on human and animals' health, GBHs are still authorized for agriculture use and they will be until 2033. For instance, the International Agency for Research on Cancer (**IARC**) classified Gly as "potentially carcinogenic in human" in its 2015 monography (Guyton et al., 2015). In contrast, the European Food Safety Authority (**EFSA**) does not classify Gly as a carcinogenic agent. The European authority also highlights differences in the selection of studies and the interpretation of statistical analyses (European Food Safety Authority [EFSA], 2015). However, Gly alone is not able to exert its full herbicide power, and needs other co-formulants (called surfactants) which act as wetting agents and allow Gly to better penetrate plant systems (Bradberry et al., 2004). The combination of Gly and of these co-formulants is called a GBH, and GBHs are the products which are actually spread on crops. It therefore seems more relevant to consider whole GBH formulations when assessing Gly's toxicity on animals, as Gly alone is less likely to reach them than GBH formation.

Glyphosate, and by extension GBHs are also very suspected to act as endocrine disruptors (**ED**) in several models, which also fuels the controversy surrounding their use. According to the World Health Organization, "an endocrine disruptor" is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations". Exposure to ED occurs via ingestion, inhalation and dermal absorption (Ingaramo et al., 2020). In a review published in 2021, Muñoz et al., 2021 draw up a state of the art of the studies investigating the possible ED nature of Gly. A previous study shows that a GBH administration can disturb steroidogenesis step limiting StAR protein in MA-10 cells (Walsh et al., 2000). Furthermore, it can be associated to an increase in the oxidative stress *in vitro* in different cell types including bovine embryo (Dovolou et al., 2024) and *in vivo* in various tissues and species such as chicken testis (Ren et al., 2018) and mice liver mice (Qi et al., 2023). Glyphosate has been reported to cause mitochondrial dysfunctions in different models such as C. Elegans (Bailey et al., 2018), pig oocyte (Xing et al., 2022), and danio brain (Pereira et al., 2018). Studies have already investigated the impact of GBHs or Gly on mammalian granulosa cells (**GC**) (Perego et al., 2017; Gigante et al., 2018; Bhardwaj et al., 2019) but no data are yet available in avian species. In caprine GCs, Vitamin E (**VE**) is able to alleviate the negative effects of GBHs (Bhardwaj et al., 2019, 2022). Vitamin E is a lipid-soluble vitamin that acts as a natural antioxidant (Gibaldi, 1996). It has several critical functions in animals, including protecting cells alongside the harmful properties of irritable oxygen species and promoting humoral and cellular immune responses. In chicken, VE supplementation in broiler diets improves production parameters (body weight and feed efficiency) without negatively affecting the health.

In a previous study, we chronically dietary exposed 32 wk-old hens to a dose of GBH of 47 mg/kg bw/d, which is close to half the No Observed Adverse Level (**NOAEL**) determined by EFSA in birds. The maximal blood plasma Gly concentration monitored was 1.5 mg/L (Fréville et al., 2022). Here, we assessed the impact of the GBHs from 0.036 to 36 mg of Gly equivalent/L on GCs viability, proliferation, oxidative stress and steroidogenesis after 24 h of exposure. Considering that the induction of an oxidative stress is probably the most described effect of GBH (Wang et al., 2022), we added 1 mg/L of VE in the culture medium to determine a possible alleviation of the GBH impacts in chicken GC. Thus, the aim of the present study was to assess the impact of growing doses of a GBH on chicken primary GCs functions and the potential effect of VE (1 mg/L) on the GBHs effects.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Ethical Issues

Fifty female broilers 26 wk-old of the commercial ROSS 308 breed (Hendrix Genetics, Saint Laurent de la Plaine, France) were reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) according to the standard breeding conditions. Animals were divided in groups of 5 in 10 pens, each pen with an area of 3 m2 and with thermostatically controlled air inlets and a dynamic cross-ventilation system. The animals were exposed to 15 h of light per day at 23 wk to induce the laying and they were maintained under this light regime until the end of the experiment. All animals received a restricted diet according to Hendrix Genetics recommendation. The composition of the diet (%) was (corn: 54.19; wheat: 8; Soybean meal: 13.95; Soy oil: 2; Sunflower oil: 5.8; Sodium Bicarbonate: 0.1; Calcium carbonate: 6.6; Phosphate: 2.2; Salt: 0.28; Methionine DL: 0.05; Mineral premix: 0.5; and Soybean: 6.33). Ovarian follicles have been collected during meat processing as local abattoir by-products by highly qualified and experienced laboratory staff. Thus, according to the ethical issues for the protection of animals, this project does not require the consent of the competent ethics committee for animal experiments.

Isolation of Chicken GC

After electronarcosis, the ovaries were immediately removed and placed in ice-cold sterile 1% NaCl saline solution for immediate use. GCs from the first (F1 = the largest follicle size), third and fourth (F3 and F4) largest hierarchical follicles were dissected as previously described (Tosca et al., 2006; Chabrolle et al., 2007). GCs from F3 and F4 follicle were pooled into 1 single group, hereinafter called F3/4 group. They were prepared for culture by being dispersed in 0.3% collagenase

type A (Roche Diagnostic, Meylan, France) in F12 medium containing 5% fetal bovine serum (**FBS**). Cells were recovered by centrifugation (10 min, 800 g at room temperature) washed with fresh medium, and counted in a haemocytometer. The viability of F1−F3/4 GCs was estimated by trypan blue exclusion at about 95%. The culture medium was DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/l streptomycin, 3 mmol/l L-glutamine and 5% FBS. Cells were initially cultured for 24 h with no treatment, then incubated in fresh culture medium with or without test reagents for the appropriate time. All of the cultures were maintained in a water-saturated atmosphere of 95% air:5% CO_2 at 37°C.

Chemicals

Gallup Super 360, hereinafter called GBH was obtained from Axereal (Monnaie, France). It contains 360 g/L of glyphosate (485.8 g/L of isopropylamine salt). Human recombinant IGF-1 was obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Purified ovine luteinizing hormone (**LH**) (lot 26) was obtained from Dr AF Parlow and the National Hormone and Pituitary Programme (Bethesda, MD). Vitamin E (VE, α-tocopherol acetate) was provided by Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France).

Cell Viability

GCs were treated in 96 wells plates with several dilutions of GBH; 0.036, 0.36, 3.6, and 36 mg gly eq/L and CT (0 mg gly eq/L) for 24 h, with or without addition of VE (1 mg/L). Cell viability was determined using a Cell Counting Kit-8 (**CCK8**) assay commercial kit (Sigma−Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The assay was performed according to the manufacturer recommendations. Absorbances were measured at a 450 nm wavelength using a spectrophotometer. Four biological replicates were created for each concentration (n = 4) and the assay was performed 4 times to obtain 4 statistical replicates (N = 4).

Cell Proliferation

GCs were treated in 96 wells plates with several dilutions of GBH; 0.036, 0.36, 3.6 and 36 mg gly eq/L and CT (0 mg gly eq/L) for 24 h, with or without addition of VE (1 mg/L). Cell proliferation was determined using a BRDU ELISA assay (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier). Absorbances were measured at a 405 and 492 nm wavelength using a spectrophotometer. The assay was performed according to the manufacturer recommendations. Four biological replicates were created for each concentration (n = 4) and the assay was performed 4 times to obtain 4 statistical replicates (N = 4).

TAS, TOS and OSI Determination

TAS (total antioxidant status) was determined using a commercial kit supplied by Randox (Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions. In this method, metmyoglobin is converted into ferrylmyoglobin in the presence of iron ions. The result of the reaction between ferrylmyoglobin with the Randox ABTS reagent was a green product, the absorbance of which was measured at 600 nm. The TOS (total oxidant status) was determined using the commercial kit Per-OX TOS/TOC (Immune Diagnostics, Bensheim, Germany). The reaction of peroxidase with lipid hydroperoxides led to the production of reduced phospholipid products of green color, which changes to yellow upon addition of the stop reagent. Absorbance was measured at 450 nm. The index of oxidative stress (**OSI**) was calculated based on the formula = TOS/TAS × 100.

Progesterone Assay

Progesterone concentration in hen GCs was determined in serum-free media after culturing for 24 h in the presence or absence of different doses of GBH; CT (0 mg gly eq/L), 0.036, 0.36, 3.6 and 36 mg gly eq/L with or without vitamin E (1 mg/L), and/or LH (10^{-8}M), and/or IGF (10^{-8}M) for 24 h. Initially, granulosa were grown in 48-well dishes (1.25×10^5 viable cells/250 μl medium per well) in DMEM and 5% FBS for 24 h. After overnight serum starvation, GCs were incubated with the appropriate treatment for 24 h. The concentration of progesterone derived from hen GCs, in the culture media was measured using an ELISA protocol as previously described (Canépa et al., 2008). The intra-assay coefficient of variation (**CV**) averaged <10%. The results are expressed as the amount (mean ± s.e.m.) of steroid (ng/ml)/ 100μg of total protein secreted per 24 h. There were 4 replicates for each treatment within each culture, and we performed 4 cultures. In each culture, we used 4 hens, and consequently we used a pool of GCs from 4 follicles of the same category (GC from 1 follicle per hen).

Measurement of Steroidogenesis Transcripts Expressions in GC

GC were treated in 6 wells plates with several dilutions of GBH; 0.036, and 36 mg gly eq/L and CT (0 mg gly eq/L) (n = 6) for 24 h, with and without vitamin E supplementation (1mg/L). Total RNA was extracted from each well using TRIzol RNA Isolation Reagents and an Ultra-Turrax instrument for grinding, according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). The purity and concentrations of the obtained RNA were checked via their A260/A280 ratios using a Nanodrop machine. cDNA was obtained by reverse transcription of 2 μg of the total RNA in 20 μL of a mix containing each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 0.5 mM), 2 M RT Buffer, 15 μg/μL oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (**MMLV**); the mixture was kept for 1 h at 37°C. Quantitative PCR was performed using a mix of 3 μL of

Table 1. Primer sequences used for qPCR analysis.

Gene	Primer F	Primer R	Reference
GAPDH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGATCTCGC	Grandhaye et al. (2020)
EEF1α	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TCACATGAGACAGACGGTTGC	
β-actin	ACGGAACCACAGTTTATCATC	GTCCCAGTCTTCAACTATACC	
StAR	TGCCATCTCCTACCAACA	CATCTCCATCTCGCTGAAG	Estienne et al. (2020)
HSD3β	TACTGCTGGAAGAAGATGAG	CAAGGTGTCAATGATGGAAG	
cyp11a1	TGAATATCATCAGCCCCCGC	GTAGGGCTTGTTGCGGTAGT	

cDNA and 8 μL of SYBR Green Supermix 1X Reagent (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) with 250 nM of specific primers (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) given in Table 1. Samples were set up in duplicate in a 384-well plate and a MyiQ Cycle Device (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used to apply the following procedure: incubation (2 min at 50°C), denaturation (10 min at 95°C) and 40 PCR cycles (30 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C). Relative expression of genes was related to the geometric mean of the expression of 3 reference genes (*GAPDH* [glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase], actin B [***ACTB***] and *EEF1α* [eukaryotic elongation factor 1 alpha]). Primer efficiency was calculated using a 5 points serial dilution for each gene, applying the formula $E = 10^{-1/\text{slope value}}$. Primer efficiencies were ranged between 1.85 and 2.00. For each target gene, expression was calculated according to primer efficiency (**E**) and quantification cycle (**Cq**), where expression $= E^{-Cq}$. Then, relative expression of the target gene to the 3 reference genes was analyzed according to the $\triangle$Cq method.

Statistical Analysis

GraphPad Prism (version 10) was used for each statistical test and graph generation. Data are presented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Dunn pair-wise comparison tests was performed to detect statistical differences between control and different concentrations of GBH in the absence or in the presence of LH and/or IGF-1 and without addition of VE. In the presence of VE, a student t test was used for the control and different concentrations of GBH except for Figure 6 where a 1-way ANOVA followed by Dunn pair-wise comparison tests was used to detect if the LH and/or IGF-1 effect on progesterone secretion was altered. Significant differences compared to control condition identified by 1-way ANOVA (Figure 6) are indicated by lowercase letters, and significant differences identified by student T test are indicated by stars. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ****$P < 0.0001$.

RESULTS

Effect of GBH Exposure With or Without VE Supplementation in Chicken F1 and F3/4 GC Viability

As shown in Figure 1, GBH exposure for 24 h did not affect cell viability whatever the concentration used (0.036 to 36 mg Gly eq/L) in both F1 (**A**) and F3/4 (**B**) GC. Similar data were obtained after the addition of VE (1 mg/L) whatever the GBH concentration (0.36 and 1.8 mg eq/L) exposure for 24 h in both F1 (**C**) and F3/4 (**D**) GCs. (Figures 1C and 1D).

Effect of GBH Exposure With or Without VE Supplementation in Chicken F1 and F3/4 GC Proliferation

As shown in Figure 2A, GBH exposure (24 h) increased cell proliferation from concentration of 0.036 until 36 mg of Gly eq /L in F1 GCs whereas it did not affect F3/4 granulosa cell proliferation as compared to the control (Figure 2B). The addition of VE increased F1 granulosa cell proliferation in control condition whereas it did significantly modify the effect of GBH at 0.36 or 1.8 mg Gly eq/L (Figure 2C). In F3/4 GC, VE supplementation did not alter cell proliferation in control condition and after 1.8 mg Gly eq/L of GBH exposure whereas it decreased number of proliferative cells in response to 0.36 mg Gly eq/L of GBH (Figure 2D).

Effect of GBH Exposure With or Without VE Supplementation in Chicken F1 and F3/4 on TOS, TAS and OSI

In both F1 (Figures 3A−C) and F3/4 (Figures 4A−C) GCs, GBH exposure increased the TOS, decreased the TAS and increased the OSI from 3.6 mg of Gly eq/mL in a dose dependent manner. Furthermore, the addition of vitamin E decreased TOS, increased TAS and decreased OSI in absence and in response to exposure to GBH at concentrations of 1.8 and 36 mg Gly eq/L in both F1 (Figures 3D−F) and F3/4 GCs (Figures 4D−F). Interestingly, VE reduced by 4 -fold OSI in response to GBH at 36 mg Gly eq/L whereas it decreased it by only by twice in the absence or in the presence of GBH 1.8 mg Gly eq/L in both F1 and F3/4 GCs.

Effect of GBH Exposure With or Without VE Supplementation in Chicken F1 and F3/4 on Progesterone Secretion and Expression of StAR, HSD3beta and CYP11A1

In both F1 (Figure 5A) and F3/4 (Figure 6A) GCs, GBH exposure reduced in a dose dependent manner progesterone (Pg) secretion from 0.36 until 36 mg Gly eq/L of GBH. The VE supplementation increased

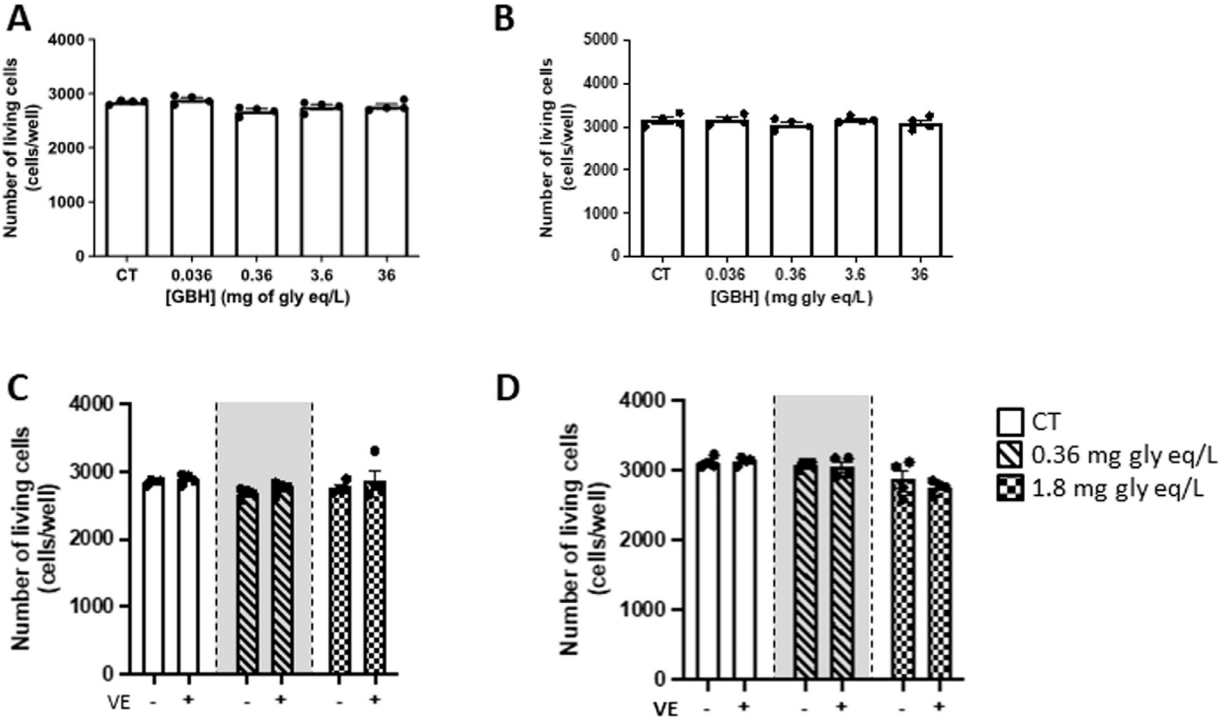


Figure 1. Viability of primary granulosa cells (GCs) from F1 (A) and F3/4 (B) follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N (number of experiment) = 4, n (number of replicates per experiment) = 4). Viability of primary GCs from F1 (C) and F3/4 (D) follicles, after a 24-h exposure to GBH 0 (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L) (N = 4, n = 4). Significant differences as compared to the control (CT, A and B) identified by 1-way ANOVA or to without VE condition for each GBH concentration identified by student T test (C and D) are indicated by stars. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

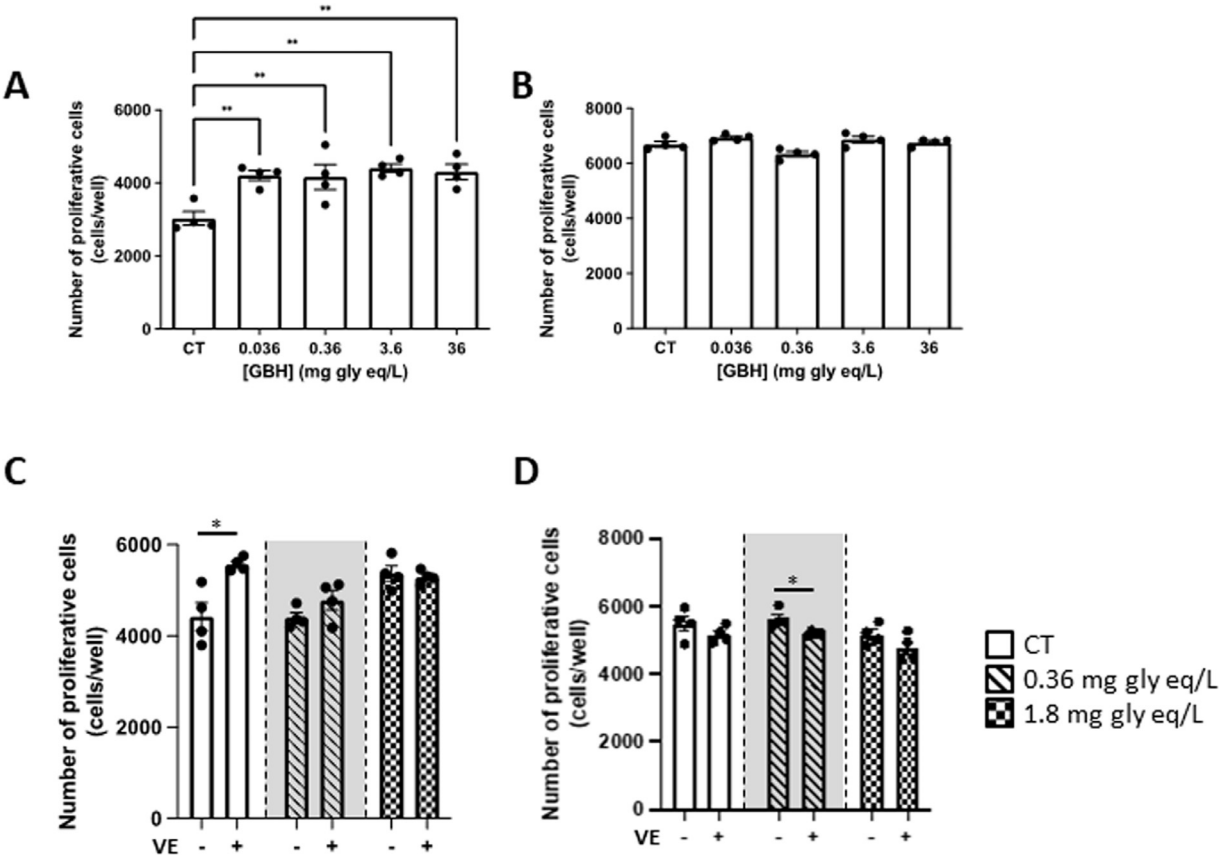


Figure 2. Proliferation of primary granulosa cells (GCs) from F1 (A) and F3/4 (B) follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N (number of experiment) = 4, n (number of replicates per experiment) = 4). Proliferation of primary GCs from F1 (C) and F3/4 (D) follicles, after a 24-h exposure to GBH 0 (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L) (N = 4, n = 4). Significant differences as compared to the control (CT, A and B) identified by 1-way ANOVA or to without VE condition for each GBH concentration identified by student T test (C and D) are indicated by stars. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

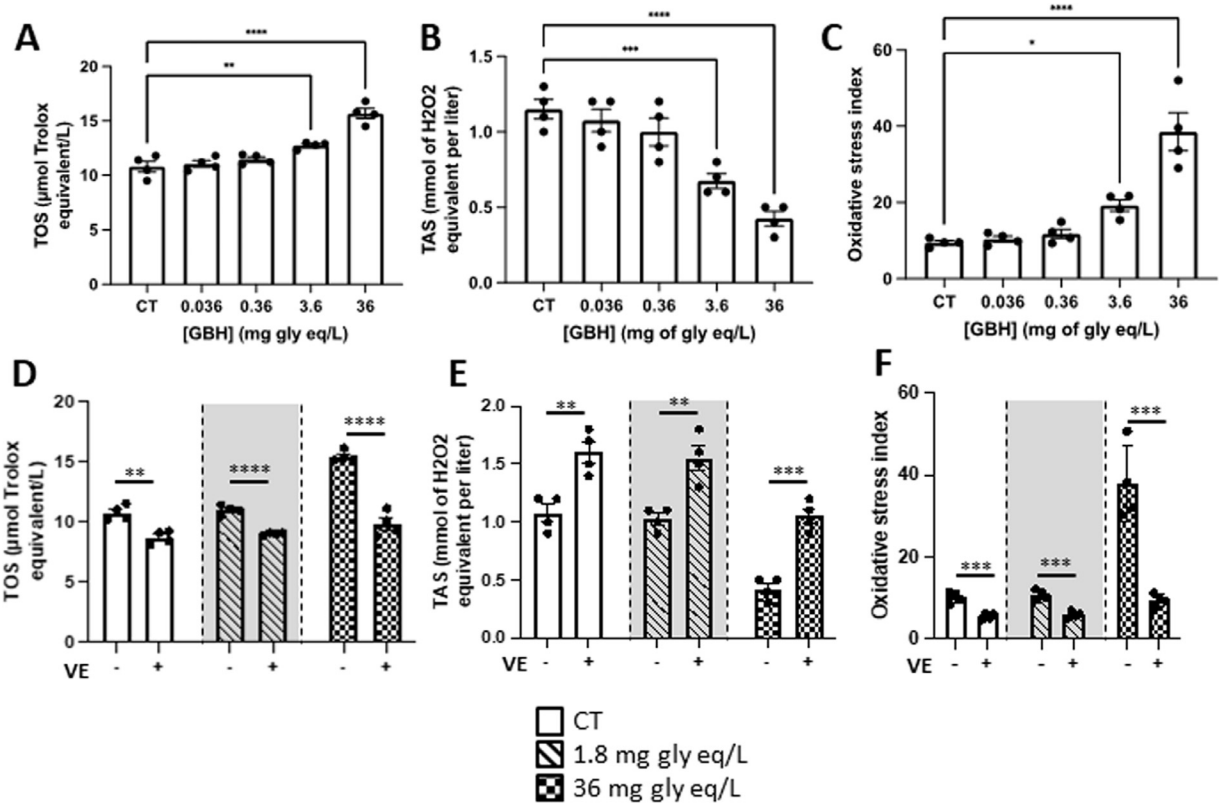


Figure 3. (A) Total oxidant status (TOS) in primary granulosa cells (GCs) from F1 follicles after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L(N (number of experiment) = 4, n (number of replicates per experiment) = 4). (B) Total antioxidant (TAS) status in primary GCs from F1 follicles after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N = 4, n = 4). (C) Oxidative stress index (TOS/TAS) in primary GCs from F1 follicles after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N = 4, n = 4). (D) TOS, (E) TAS and Oxidative stress index (TOS/TAS) in primary GCs from F1 follicles after a 24-h exposure to doses of GBH of 0 mg of gly eq/L (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L) (N = 4, n = 4). Significant differences as compared to the control (CT, A, B and C) identified by 1-way ANOVA or to without VE condition for each GBH concentration identified by student T test (D, E and F) are indicated by stars. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

progesterone secretion in the same way in the absence or the presence of GBH (0.36 and 1.8 mg Gly eq/L) in both F1 (Figure 5B) and F3/4 (Figure 6B) GCs. As shown in Figures 5C and 6C, GBH exposure (0.36 and 1.8 mg Gly eq/L) decreased not only in basal condition but also in response to LH or/and IGF-1 and this inhibitory effect was totally or strongly reduced after the addition of VE (Figures 5D and 6D) in both F1 and F3/4 GCs.

We next determined whether the effects of GBH and VE on progesterone secretion by F1 and F3/4 granulosa could be due to variations in mRNA expression of steroidogenesis factor (StAR, the cholesterol carrier) or enzymes (HSD3β and CYP11A1). However, as shown in Figure 7, neither GBH nor VE did significantly affect the expression of the steroidogenesis components in F1 (Figure 7A) and F3/4 (Figure 7B) GC.

DISCUSSION

Chicken is easily exposed to GBH through their diet and we previously observed that Gly accumulates in yolk (Estienne et al., 2022). GCs are a main component of the chicken follicle that are close to the yolk-filled oocyte suggesting that Gly exposure in yolk could affect the follicular development. GBH can induce the production of ROS and decrease SOD, CAT, and GST activities, as demonstrated on caprine GC in a previous study (Bhardwaj et al., 2022; Wang et al., 2022). On the other hand, VE's ability to scavenge peroxyl radical, most likely by the donation an hydrogen atom, has been described in previous studies (Traber and Atkinson, 2007). Therefore, VE could reduce TOS and increase TAS by neutralizing oxidant molecules. Thus, GBH could modulate the expression of several hormones, including progesterone according to the animal model, the age, the sex and the physiological status (Serra et al., 2021b). However, few works exploring the ability of GBHs to disturb reproductive functions have been performed in avian species. Serra et al. (2021a) showed that a GBH enriched diet (46.8 mg gly eq/kg bw/d) increases plasma testosterone and estradiol levels in roosters, while an exposure to 160 mg gly eq /kg bw/d of GBH decreased plasma testosterone levels in Japanese quail (Ruuskanen et al., 2020). The mechanisms and signaling pathways underlying these effects remain unclear, but alterations in signaling pathways such as ERα, VEGFR2, pERK and PI3K (p85) have been reported in hormone responsive cells (Muñoz et al., 2021). In the present study, we showed for the first time that 1 GBH increased oxidative stress and decreased progesterone secretion in chicken preovulatory F1 and F3/4 GCs

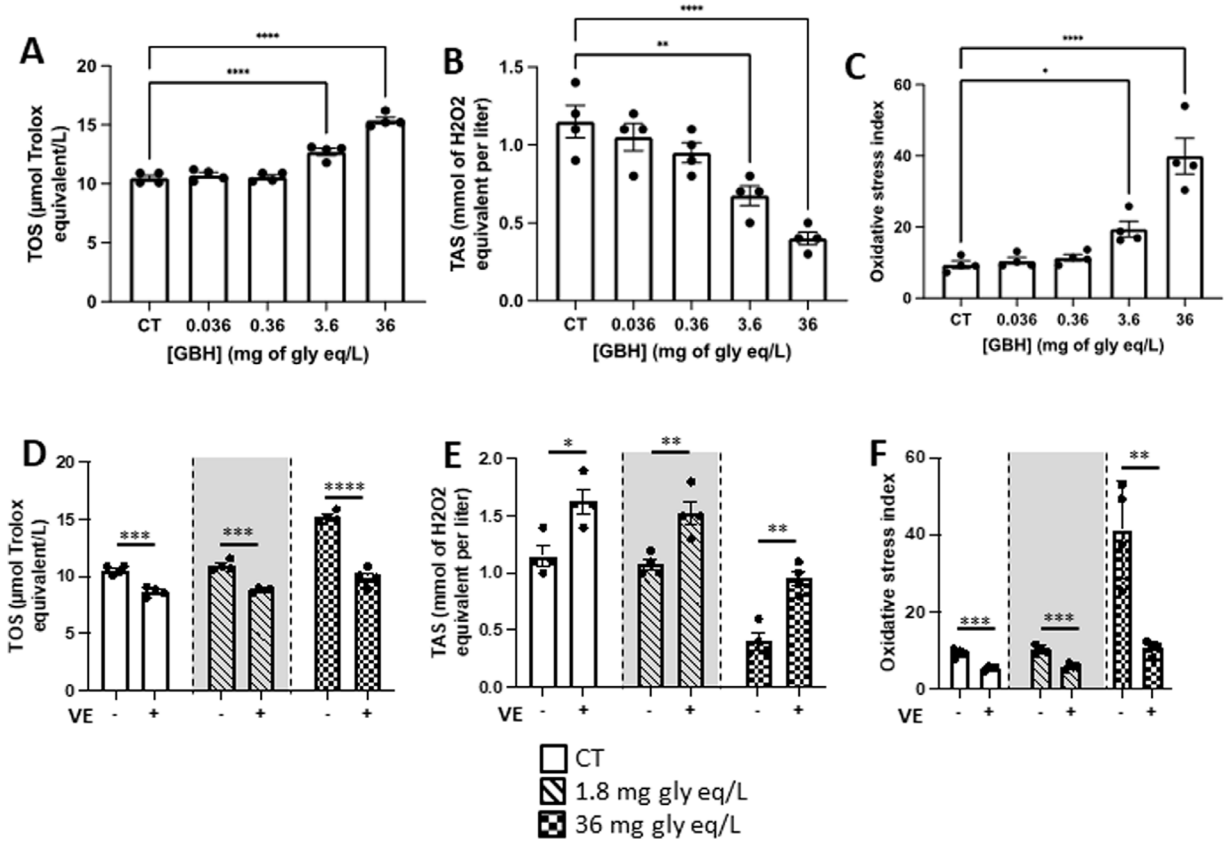


Figure 4. (A) Total oxidant status (TOS) in primary granulosa cells (GCs) from F3/4 follicles after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L(N (number of experiment) = 4, n (number of replicat per experiment) = 4). (B) Total antioxidant (TAS) status in primary GCs from F3/4 follicles after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N = 4, n = 4). (C) Oxidative stress index (TOS/TAS) in primary GCs from F3/4 follicles after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N = 4, n = 4). (D) TOS, (E) TAS and Oxidative stress index (TOS/TAS) in primary GCs from F3/4 follicles after a 24-h exposure to doses of GBH of 0 mg of gly eq/L (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L) (N = 4, n = 4). Significant differences as compared to the control (CT, A, B and C) identified by 1-way ANOVA or to without VE condition for each GBH concentration identified by student T test (D−F) are indicated by stars. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

without any cytotoxic effect. Furthermore, we demonstrated that VE was able to alleviate some of these negative effects.

We showed that a GBH exposure did not affect the cell viability in F1 and F3/4 GC whereas it increased and did not alter F1 and F3/4 GCs cell proliferation, respectively. Thus, we can conclude that a GBH exposure until 36 mg Gly Eq/L was not cytotoxic for chicken GC. These data are important because GC play a decisive role in follicular development and a GBH exposure could inhibit this process. Furthermore, GC differentiation regulates the initiation of primordial follicles. Our result is different from those obtained in bovine GC since Perego et al., 2017 showed that Round up exposure at 10 and 300 mg/L strongly decreased cell numbers. However, other studies showed that Gly induced cell proliferation in glioblastoma cells (Bianco et al., 2023) and GBH increased the growth of rat uterine subepithelial stroma cells (Zanardi et al., 2024). In our study, we showed that the GBH increased cell proliferation in F1 and not F3/4 GC suggesting that the effect of GBH on the preovulatory granulosa cell toxicity could be dependent not only the species but also on the differentiation follicle status. Indeed, in mature hen, the preovulatory follicles show a hierarchy according to their size (F5/6 to F1) (Etches and Petitte, 1990). The largest follicle (F1), filled of yolk is first to ovulate, followed by the second largest follicle (F2) approximately 24 to 26 h later and this continues down the hierarchy.

In the present study, we showed that the GBH exposure reduced progesterone secretion in basal state from 0.36 mg of Gly eq/L but also in response to LH and/or IGF-1 in both F1 and F3/4 GCs. These data are in good agreement with other studies including bovine GC (Perego et al., 2024; for review Kaboli Kafshgiri et al., 2022; Serra et al., 2021b) showing that Gly alone or GBH inhibited steroidogenesis. However, Gigante et al., observed that Gly increased progesterone secretion by porcine GCs whereas Ganesan et al. (2020) indicated no *in vivo* effect on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis. Thus, the effect of Gly and GBHs are very controversial in mammals. This difference may be due to the different effect of glyphosate on granulosa cells and steroidogenesis in *in vivo* studies compared to *in vitro* studies. The use of an *in vitro* model allowed to better target the desired cells, to control the experimental parameters and to minimize biological variations. Still, the obtained results should be confirmed *in vivo* experiments in the future.

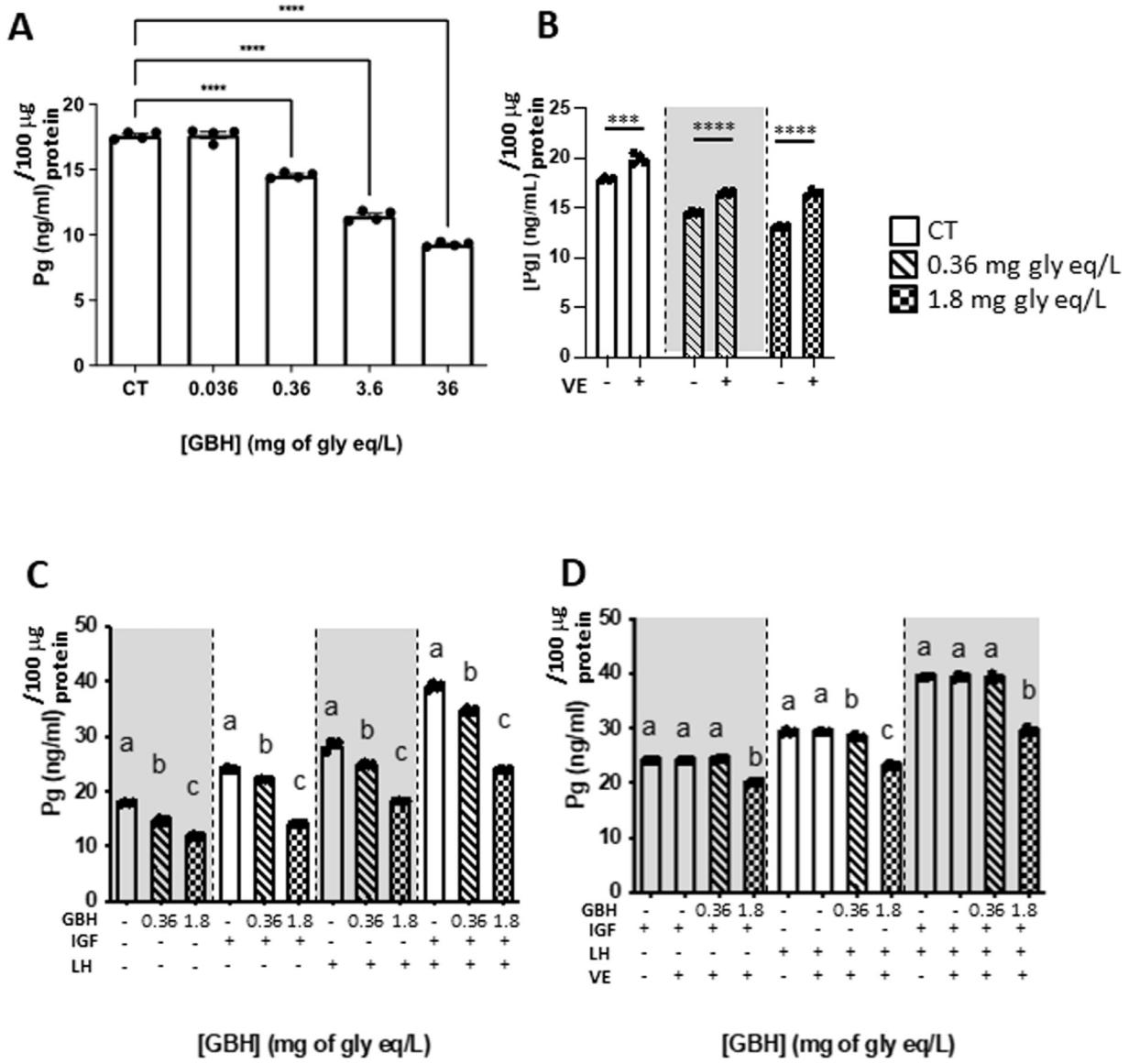


Figure 5. (A) Progesterone (Pg) secretion in culture medium by primary granulosa cells (GC) from F1 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N (number of experiment) = 4, n (number of replicates per experiment)). (B) Pg secretion in culture medium by primary GCs from F1 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT),), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L) (N = 4, n = 4). (C) Pg secretion by primary GCs from F1 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L in response to IGF-1 (10^{-8}M) and LH (10^{-8}M), (N = 4, n = 4). (D) Pg secretion by primary GCs from F1 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT),), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L in response to IGF-1 (10^{-8}M) and LH (10^{-8}M) with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L), (N = 4, n = 4). Significant differences as compared to the control (CT, A) identified by 1-way ANOVA or to without VE condition for each GBH concentration identified by student T test (B) are indicated by stars. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$. Significant differences as compared to without GBH, LH or/and IGF-1 and VE condition (B, C and D) identified by 1-way ANOVA are indicated by different lowercase letter at $P < 0.05$.

According to Muñoz et al., 2021, there are 10 key characteristics on which we should refer to state on the ED nature of a molecule (Muñoz et al., 2021). Among them, the alteration of hormone synthesis can be an easy parameter to assess with *in vitro* models. It has been shown that growing doses of a GBH applied on mouse MA-10 Leydig tumor cells for 2 h can reduce their production of progesterone in a dose dependent manner (Walsh et al., 2000). This could be due to a disruption of StAR protein expression, which mediates the rate-limiting step in steroidogenesis. StAR is a mitochondrial protein that is rapidly synthesized in response to stimulation of the cell to produce steroid. In our study, we observed that the GBH did not affect the mRNA expression of StAR and 2 enzymes named cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc or CYP11A1), and 3-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD or HSD3B) that are very well known regulated the progesterone production (Yamazaki et al., 2005). One hypothesis is that the reduction in progesterone production in response to the GBH exposure is due to an inhibition of the activity of CYP11A1 and/or HSD3B. A study performed on bovine GCs showed that growing doses of GBH (10 and 300 μg/mL) drastically reduced progesterone and E2 production, while Gly alone had no significant effect (Perego et al., 2017). Here in chicken GCs, we used a

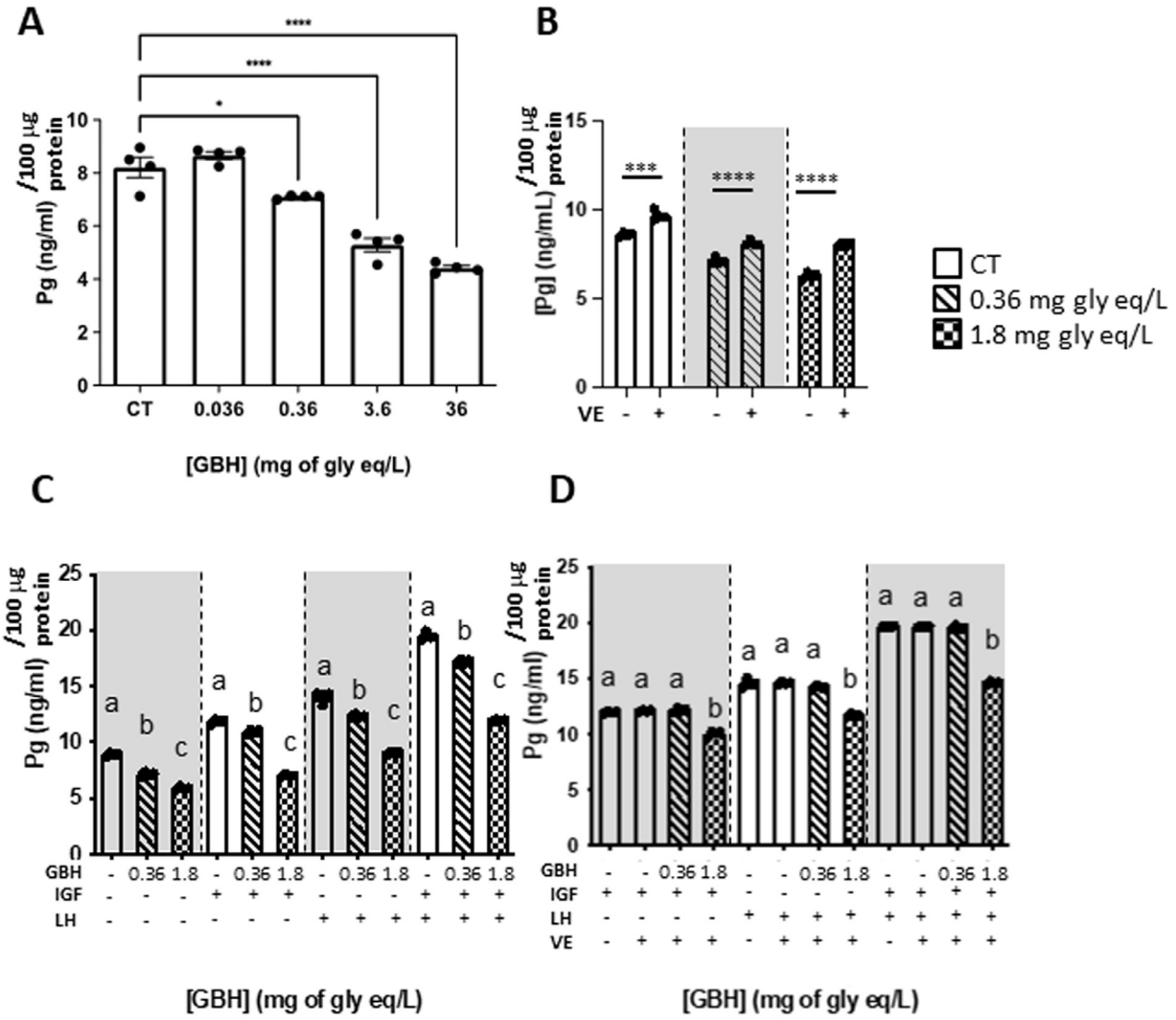


Figure 6. (A) Progesterone (Pg) secretion in culture medium by primary granulosa cells (GCs) from F3/4 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT) to 36 mg of gly eq/L (N (number of experiment) = 4, n (number of replicates per experiment)). (B) Pg secretion in culture medium by primary GCs from F3/4 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L) (N = 4, n = 4). (C) Pg secretion by primary GCs from F3/4 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L in response to IGF-1 (10^{-8}M) and LH (10^{-8}M), (N = 4, n = 4). (D) Pg secretion by primary GCs from F3/4 follicles, after a 24-h exposure to growing doses of GBH ranging from 0 mg of gly eq/L (control, CT), 0.36 and 1.8 mg of gly eq/L in response to IGF-1 (10^{-8}M) and LH (10^{-8}M) with or without addition of vitamin E (VE, 1 mg/L), (N = 4, n = 4). Significant differences as compared to the control (CT, A) identified by 1-way ANOVA or to without VE condition for each GBH concentration identified by student T test (B) are indicated by stars. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$. Significant differences as compared to without GBH, LH or/and IGF-1 and VE condition (B–D) identified by 1-way ANOVA are indicated by different lowercase letter at $P < 0.05$.

GBH and not Gly, 1 hypothesis is that the inhibition in progesterone secretion observed be due to the co-formulants and not Gly. Several reports showed that co-formulants could be more toxics than Gly (Mesnage et al., 2022; Makame et al., 2023; Defarge et al., 2016). We analyzed only progesterone secretion and not oestradiol. Indeed, in chicken, GCs are the source of progesterone, and estrogens are derived from theca cells by aromatase (Huang et al., 1979, Marrone and Hertelendy, 1983). Whereas, in the mammalian ovary, estrogens are produced in GCs, and there was no or less expression of CYP19A1 in theca cells (Magoffin, 2005).

We showed that the GBH exposure induced an increase in TOS, decrease in TAS and consequently an increase in OSI from 3.6 mg of Gly eq/L in both F1 and F3/4 GC. Since the effects of GBH on steroid production are observed with a lower concentration (0.36 mg of Gly eq/L), increased TOS, decreased TAS and thus increased OSI due to exposure of granulosa cells to GBH are certainly not responsible for this inhibition of steroidogenesis. Many studies reported that Gly or/and GBHs are able to increase oxidative stress (Wang et al., 2022; Cattani et al., 2023; Qi et al., 2023). Thus, we investigated if the antioxidant VE was able to alleviate the negative effects on the steroid production.

In mammals, some reports demonstrated a beneficial effect of VE after Gly or GBH exposure both in vivo (Chandran et al., 2023; Bhardwa et al., 2022; and in vitro (Ünlü Endirlik et al., 2022). In the present study we demonstrated that VE is able to alleviate the negative effects of GBH on the progesterone production and oxidative stress in chicken F1 and F3/4 GCs. However,

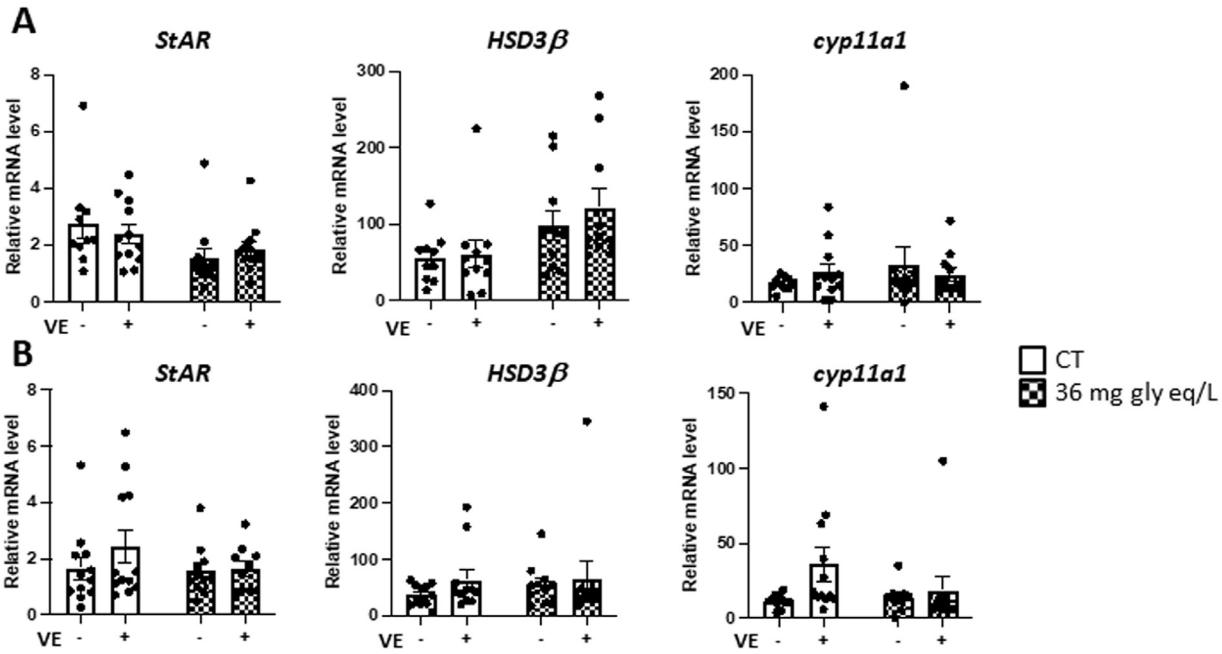


Figure 7. *StAR, HSD3β* and *cyp11a1* mRNA expression in primary granulosa cells from F1 (A) and F3/4 (B) follicles, after a 24-h exposure to GBH (36 mg gly eq/L) or not (Control, CT) with or without addition of vitamin E (1 mg/L); (N (number of experiment) = 4, n (number of replicates per experiment).

it remains to determine what are the molecular mechanisms involved. Other components such melatonin has been recently shown to alleviate negative effects of Gly or GBH. For example, melatonin alleviated Gly-induced testosterone synthesis inhibition via targeting mitochondrial function in roosters (Ren, 2024). It also alleviated the deterioration of oocytes and hormonal disorders from mice subjected to Gly (Zhang, 2021).

CONCLUSION

In this study, we demonstrated that a GBH can alter the physiological functions of chicken GCs. Progesterone production and oxidative stress were strongly affected by the GBH exposure. All these effects were at least partially reversed by the addition of VE in the culture medium. It remains to determine the molecular mechanisms and signaling pathways involved in the GBHs and VE effects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the technicians from "Pôle Expérimental Avicole de Tours" unit (INRAE, Nouzilly, France) for the care of animals. The authors thank to Région Centre Val de Loire for its support (Grant number 32000868).

DISCLOSURES

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

REFERENCES

Bai, S. H., and S. M. Ogbourne. 2016. Glyphosate: Environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. Environ. Sci. Pollut. Res. 23:18988–19001.

Bailey, D. C., C. E. Todt, S. L. Burchfield, A. S. Pressley, R. D. Denney, I. B. Snapp, R. Negga, W. L. Traynor, and V. A. Fitsanakis. 2018. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in Caenorhabditis elegans. Environ. Toxicol. Pharmacol. 57:46–52.

Bhardwaj, J. K., M. Mittal, and P. Saraf. 2019. Effective attenuation of glyphosate-induced oxidative stress and granulosa cell apoptosis by vitamins C and E in caprines. Mol. Reprod. Dev. 86:42–52.

Bhardwaj, J. K., M. Mittal, P. Saraf, and S. Sharma. 2022. Ameliorative potential of vitamin C and E against roundup-glyphosate induced genotoxicity triggering apoptosis in caprine granulosa cells. Environ. Mol. Mutagen. 63:246–254.

Bianco, C. D., F. Ourique, D. C. Dos Santos, R. C. Pedrosa, M. R. Kviecisnki, and A. Zamoner. 2023. Glyphosate-induced glioblastoma cell proliferation: Unraveling the interplay of oxidative, inflammatory, proliferative, and survival signaling pathways. Environ. Pollut. 338:122695.

Bradberry, S. M., A. T. Proudfoot, and J. A. Vale. 2004. Glyphosate poisoning. Toxicol. Rev. 23:159–167.

Canépa, S., A. L. Lainé, A. Bluteau, C. Fagu, C. Flon, and D. Monniaux. 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. Cahier des Techniques de l'INRA 64:19–30.

Cattani, D., P. Pierozan, A. Zamoner, E. Brittebo, and O. Karlsson. 2023. Long-Term Effects of Perinatal Exposure to a Glyphosate-Based Herbicide on Melatonin Levels and Oxidative Brain Damage in Adult Male Rats. Antioxidants 12:1825.

Chabrolle, C., L. Tosca, S. Crochet, S. Tesseraud, and J. Dupont. 2007. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. Domest. Anim. Endocrinol. 33:480–487.

Chandran, D., S. Jayaraman, K. Sankaran, and V. P. Veeraraghavan. 2023. Antioxidant vitamins attenuate glyphosate- induced development of type-2 diabetes through the activation of glycogen synthase kinase-3 β and forkhead box protein O-1 in the liver of adult male rats. Cureus 15:e51088.

Defarge, N., E. Takács, and V. L. Lozano. 2016. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in

human cells below toxic levels. Int. J. Env. Res. Public Health 13(3):264.

Dovolou, E., I. Nanas, T. Giannoulis, A. Fytsilli, A. Ntemka, G. Anifandis, I. Tsakmakidis, and G. S. Amiridis. 2024. The effects of a glyphosate-based herbicide on the bovine gametes during an in vitro embryo production model. Environ. Pollut. 350:123967.

Estienne, A., M. Fréville, G. Bourdon, C. Ramé, J. Delaveau, C. Rat, M. Chahnamian, A. Brionne, P. Chartrin, H. Adriensen, F. Lecompte, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. Ecotoxicol. Environ. Saf. 241:113741.

Estienne, A., M. Reverchon, A. Partyka, G. Bourdon, J. Grandhaye, A. Barbe, A. Barbe, E. Caldas-Silveira, C. Rame, W. Niżański, P. Froment, and J. Dupont. 2020. Chemerin impairs *in vitro* testosterone production, sperm motility, and fertility in chicken: possible involvement of its receptor CMKLR1. Cells 9:1599.

Etches, R. J., and J. N. Petitte. 1990. Reptilian and avian follicular hierarchies: Models for the study of ovarian development. J. Exp. Zool. 256:112–122.

European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. EFSA J. 13:1–107.

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, M. Chahnamian, C. Staub, E. Venturi, J. Lemarchand, E. Maximin, A. Hondelatte, O. Zemb, C. Canlet, R. Guabiraba, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. Front. Physiol. 13:974688.

Ganesan, S., B. C. McGuire, and A. F. Keating. 2020. Absence of glyphosate-induced effects on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis. Reprod. Toxicol. 96:156–164.

Gibaldi, M. 1996. Antioxidant vitamins and health. J. Clin. Pharmacol. 36:1093–1099.

Gigante, P., M. Berni, S. Bussolati, F. Grasselli, S. Grolli, R. Ramoni, and G. Basini. 2018. Glyphosate affects swine ovarian and adipose stromal cell functions. Anim. Reprod. Sci. 195:185–196.

Gill, J. P. K., N. Sethi, A. Mohan, S. Datta, and M. Girdhar. 2018. Glyphosate toxicity for animals. Environ. Chem. Lett. 16:401–426.

Grandhaye, J., V. Douard, A. Rodriguez-Mateos, Y. Xu, A. Cheok, A. Riva, R. Guabiraba, O. Zemb, C. Philippe, M. Monnoye, C. Staub, E. Venturi, A. Barbe, C. Ramé, J. Dupont, and P. Froment. 2020. Microbiota changes due to grape seed extract diet improved intestinal homeostasis and decreased fatness in parental broiler hens. Microorganisms 8:1141.

Guyton, K. Z., D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Scoccianti, H. Mattock, and K. Straif. 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. Lancet Oncol 16:490–491.

Huang, E. S., K. J. Kao, and A. V. Nalbandov. 1979. Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. Biol. Reprod. 20:454–461.

Ingaramo, P., R. Alarcón, M. Muñoz-de-Toro, and E. H. Luque. 2020. Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? Mol. Cell. Endocrinol. 518:110934.

Kaboli Kafshgiri, S., T. Farkhondeh, and E. Miri-Moghaddam. 2022. Glyphosate effects on the female reproductive systems: a systematic review. Rev. Environ. Health 37:487–500.

Magoffin, D. A. 2005. Ovarian theca cell. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37:1344–1349.

Makame, K. R., S. N. Masese, B. Ádám, and K. Nagy. 2023. Oxidative stress and cytotoxicity induced by co-formulants of glyphosate-based herbicides in human mononuclear white blood cells. Toxics 11:976.

Marrone, B. L., and F. Hertelendy. 1983. Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. Biol. Reprod. 29:953–962.

Mesnage, R. 2022. The surfactant co-formulant POEA in the glyphosate-based herbicide RangerPro but not glyphosate alone causes necrosis in Caco-2 and HepG2 human cell lines and ER stress in the ToxTracker assay. Food Chem. Toxicol. 168:113380.

Muñoz, J. P., T. C. Bleak, and G. M. Calaf. 2021. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. Chemosphere 270:128619.

Perego, M. C., F. Caloni, C. Cortinovis, L. F. Schutz, M. Albonico, D. Tsuzukibashi, and L. J. Spicer. 2017. Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. Chemosphere 188:274–279.

Perego, M. C., L. J. Spicer, C. Cortinovis, and A. Bertero. 2024. In vitro effects of two environmental toxicants, beauvericin and glyphosate in Roundup, on cell numbers and steroidogenesis of bovine ovarian cells. Vet. Res. Commun. 48:1769–1778.

Pereira, A. G., M. L. Jaramillo, A. P. Remor, A. Latini, C. E. Davico, M. L. Da Silva, Y. M. R. Müller, D. Ammar, and E. M. Nazari. 2018. Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the Danio rerio brain. Chemosphere 209:353–362.

Qi, L., Y.-M. Dong, H. Chao, P. Zhao, S.-L. Ma, and G. Li. 2023. Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through oxidative stress in mice liver. Chemosphere 315:137751.

Ren, Y. L. 2024. Melatonin alleviates glyphosate-induced testosterone synthesis inhibition via targeting mitochondrial function in roosters. Environ. Pollut. 348:123828.

Ren, X., R. Li, J. Liu, K. Huang, S. Wu, Y. Li, and C. Li. 2018. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. Environ. Pollut. 243:833–841.

Ruuskanen, S., M. J. Rainio, C. Gómez-Gallego, O. Selenius, S. Salminen, M. C. Collado, K. Saikkonen, I. Saloniemi, and M. Helander. 2020. Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. Environ. Pollut. 266:115108.

Schönbrunn, E., S. Eschenburg, W. A. Shuttleworth, J. V. Schloss, N. Amrhein, J. N. S. Evans, and W. Kabsch. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc. Natl. Acad. Sci 98:1376–1380.

Serra, L., A. Estienne, G. Bourdon, C. Ramé, C. Chevaleyre, P. Didier, M. Chahnamian, S. El Balkhi, P. Froment, and J. Dupont. 2021a. Chronic dietary exposure of roosters to a glyphosate-based herbicide increases seminal plasma glyphosate and AMPA concentrations, alters sperm parameters, and induces metabolic disorders in the progeny. Toxics 9:318.

Serra, L., A. Estienne, C. Vasseur, P. Froment, and J. Dupont. 2021b. Review: Mechanisms of glyphosate and glyphosate-based herbicides action in female and male fertility in humans and animal models. Cells 10:3079.

Tosca, L., S. Crochet, P. Ferré, F. Foufelle, S. Tesseraud, and J. Dupont. 2006. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. J. Endocrinol. 190:85–97.

Traber, M. G., and J. Atkinson. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radic. Biol. Med. 43:4–15.

Ünlü Endirlik, B., E. Bakır, A. Ökçesiz, A. Güler, Z. Hamurcu, A. Eken, and K. Dreij. 2022. Investigation of the toxicity of a glyphosate-based herbicide in a human liver cell line: Assessing the involvement of Nrf2 pathway and protective effects of vitamin E and α-lipoic acid. Environ. Toxicol. Pharmacol. 96:103999.

Walsh, L. P., C. McCormick, C. Martin, and D. M. Stocco. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environ. Health Perspect. 108:8.

Wang, X., Q. Lu, J. Guo, I. Ares, M. Martínez, M.-R. Martínez-Larrañaga, X. Wang, A. Anadón, and M.-A. Martínez. 2022. Oxidative stress and metabolism: A mechanistic insight for glyphosate toxicology. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 62:617–639.

Xing, C., S. Chen, Y. Wang, Z. Pan, Y. Zou, S. Sun, Z. Ren, and Y. Zhang. 2022. Glyphosate exposure deteriorates oocyte meiotic maturation via induction of organelle dysfunctions in pigs. J. Anim. Sci. Biotechnol. 13:80.

Yamazaki, T., M. Shimodaira, H. Kuwahara, H. Wakatsuki, H. Horiuchi, H. Matsuda, and S. Kominami. 2005. Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action. Steroids 70:913–921.

Zanardi, M. V., M. P. Gastiazoro, M. F. Rossetti, F. Doná, G. P. Lazzarino, O. Zierau, J. Varayoud, and M. Durando. 2024. Glyphosate-based herbicide worsens alterations induced by cafeteria diet on rat uterus. J. Endocrinol. 261:e240071.

Zhang, J. 2021. Melatonin alleviates the deterioration of oocytes and hormonal disorders from mice subjected to glyphosate. Mol. Cell. Endocrinol. 520:111073.

VI. Estienne et al., 2023

Estienne, A., **Fréville, M.**, Bernardi, O., Ramé, C., Calandreau, L., Cornilleau, F., et al. (2023). Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide in broiler hens has long-term impacts on the progeny metabolism. *Poultry Science*, 102877. doi: 10.1016/j.psj.2023.102877

Poultry Science®

Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide in broiler hens has long-term impacts on the progeny metabolism

Anthony Estienne,[*] Mathias Fréville,[*] Ophélie Bernardi,[*,†] Christelle Ramé,[*] Ludovic Calandreau,[*] Fabien Cornilleau,[*] Patrice Ganier,[‡] Marine Chahnamian,[‡] Pascal Froment,[*] and Joëlle Dupont[*,1]

[*]*CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, Nouzilly, F-37380, France;* [†]*SYSAAF, Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français, Centre INRA Val de Loire, Nouzilly, 37380, France; and* [‡]*INRAE - Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT 1295, Nouzilly, F-37380, France*

ABSTRACT Glyphosate-based herbicides (**GBH**) are the most commonly used herbicides in agriculture. Several studies reported possible adverse effects on human and animal models after a GBH exposure. However, the effects of a temporary maternal exposure on the progeny have been poorly documented, especially in avian models. We investigated the effects of a hen chronic dietary exposure to a GBH on the progeny, obtained during the period following the withdrawal of GBH from the diet. Hens were exposed to a GBH via their food for 6 wk, after which the GBH was removed from their food. Eggs from these hens were collected 3 wk after the GBH was withdrawn for 1 wk. We monitored the growth performances, metabolic parameters, and behavior from the progeny of the hens (Ex-GBH chicks, $n = 186$) and compared them with those of unexposed control-hen progeny (CT chicks, $n = 213$). Ex-GBH chicks were more likely to explore their new environment than CT chicks during the open-field test. In addition, they had an increased fattening and blood triglycerides level, whereas their food consumption was similar to CT chicks. Quantitative PCR on the chemerin system and *FASN* in chicks livers indicate a transcriptional activity in favor of fatty acid synthesis, and lipidomic analysis on chicks abdominal adipose tissue reveal a global increase in monounsaturated fatty acid and a global decrease in polyunsaturated fatty acids. Seven genes involved in the synthesis of fatty acids were identified with the open access LIPIDMAP software, and their disturbance in Ex-GBH chicks was confirmed via qPCR. Taken together, these results suggest that the progeny of hens temporarily exposed to a GBH are more likely to fatten, even with a balanced diet. The removal of GBH from their contaminated environment would therefore not be sufficient to completely restore their health, has it could induce transgenerational effects.

Key words: glyphosate, hen exposure, chick, fattening, behavior

2023 Poultry Science 102:102877
https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102877

INTRODUCTION

Glyphosate-based herbicides (**GBH**) are commonly used in conventional agriculture and are spread on all types of crops. They are nonspecific herbicides mainly composed of 36% to 48% of glyphosate (**Gly**), water, salt, and other coformulants such as polyoxyethylene tallow amine (**POEA**), a hydrophilic ethoxylated alkylamine, and of contaminants such as heavy metals or polycyclic aromatic hydrocarbons (**PAHs**), and quaternary ammonium (Defarge et al., 2018; Mesnage et al., 2019). Gly acts on the shikimate signaling pathway, which produces aromatic amino acids in plants and in some microorganisms only (Schönbrunn et al., 2001). In plants and animals, Gly is metabolized into CO_2 and aminomethylphosphonic acid (**AMPA**) by the enzyme glyphosate oxidoreductase (Mesnage et al., 2015). After its use in fields, Gly can be still found in soil and water, where its half-life is from 2 to 197 d and 91 d, respectively (Muñoz et al., 2021). Since animals do not use the shikimate pathway to produce amino acids, Gly is not supposed to have any adverse effect on their health. However, several studies have shown that GBH formulations can induce tissue damage (Jasper et al., 2012; Larsen et al., 2014), act as endocrine disruptors in various models (Walsh et al., 2000; Romano et al., 2010; Gill et al., 2018), and induce developmental issues in rats brain (Cattani et al., 2021). The use of GBH is therefore very controversial, since scientific organizations have drawn contrasting conclusions about its dangerousness and recent

© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Received May 17, 2023.
Accepted June 14, 2023.

[1]Corresponding author: joelle.dupont@inrae.fr

studies have shown that human populations are widely exposed to it (Grau et al., 2022).

Recent studies have been performed on poultry, because these animals are easily exposed to GBHs through their diet. Long-term exposure to GBH, with a concentration of Gly below to the one that causes observable adverse effects (NOAEL; 100 mg/kg/body weight/d [European Food Safety Authority {**EFSA**}]) in males Japanese quails showed that Gly and AMPA were found within the liver and reduced the plasma concentrations of testosterone at puberty (Ruuskanen et al., 2020a). Moreover, GBH seem to have epigenetic effects, with long-term effects on the offspring when the parents are exposed (Ruuskanen et al., 2020b). This last study highlighted that Gly residues were found within the eggs and that GBH caused both lipid damages within the brains of embryos and a reduced embryonic development. Studies about the direct in ovo exposure of chicken embryos to GBH reported that this herbicide had negative impacts on embryo development. Indeed, results showed that GBHs induced embryonic mortality (Szabó et al., 2018), reduced the hatching rate (Fathi et al., 2019), disrupted cytochrome P450 enzymes within the liver and the small intestine (Fathi et al., 2020), and increased reactive oxygen species (**ROS**) production (Fathi et al., 2019, 2020). An observational study performed in Denmark in breeding companies of broiler breeder egg production highlighted a negative association between residues of Gly commonly found in food for adults and egg hatchability. However, no association was found between residues of Gly in the food and the laying rate (Foldager et al., 2021). Results from our laboratory demonstrated that chickens exposed to GBH through their diet (46.8 mg/kg/d glyphosate) were not affected in terms of behavior or metabolism, for both males and females (Serra et al., 2021; Estienne et al., 2022). However, males exhibited a reduced sperm motility after 5 wk of exposure in association with higher plasma testosterone and estradiol levels (Serra et al., 2021). For females exposed to GBH at a concentration similar to males, we noticed an accumulation of Gly within the egg yolk, resulting in severe early embryonic mortality and a delayed embryonic development in survivors that were abolished 2 wk after the end of GBH exposure (Estienne et al., 2022). For the same animals, we also showed possible disturbances of the cecal microbiota associated with plasma oxidative stress and accumulation of glyphosate in metabolic tissues in response to dietary GBH exposure. Luckily, this concentration of GBH did not impair growth and most of these effects on the phenotypes were reversible (Fréville et al., 2022).

We decided to go further in our investigations by analyzing the putative long-term effects of maternal GBH exposure on the progeny. Indeed, in Serra et al. (2021), we demonstrated that chicks obtained from rooster exposed to GBH had a higher food consumption, body weight, subcutaneous adipose tissue content, and epigenome modifications. Also, the animals had higher plasma chemerin levels in their blood plasma, which could indicate reduced fattening processes, since it has been shown that chemerin is negatively correlated with fattening in hens (Estienne et al., 2020). In our study in female, all chicks died during the female exposure to GBH (Estienne et al., 2022). Therefore, the aim of the present study was to investigate the impact of GBH on the progeny obtained during the period following the withdrawal of GBH from the diet, when the embryo mortality within the Ex-GBH group was similar to the control group. The aim of this study was to determine if maternal GBH exposure had long-term effects on the progeny, even after the exposure arrest. For that, we proceeded to artificial inseminations of hens 2 wk after the GBH exposure arrest and collected the eggs during the fourth week following the withdrawal. Eggs were then put into artificial incubation and chicks obtained from these eggs were studied until d 10 of age to check their behavior and metabolism.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Issues

All experiments were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Val de Loire (CEEA Vdl) (APAFIS number 21549-2019071809504554v3). The CEEA vdl is registered by the National Committee 'Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale' under the number 19. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/UE. This study is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Animals

All animals (150 female chicks and 10 male chicks of the commercial breed ROSS 308) were obtained at 1 d of age from a local hatchery (Boye Accouvage La Villonniere 79310, La Boissière en Gatine, France) and reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) until 32 wk old according to the traditional breeding conditions. At 32 wk old, hens were divided into 2 homogenous groups: control ($n = 75$) and dietary GBH exposed ($n = 75$). For each group of hens, animals were distributed by 5 in 15 pens, each pen with an area of 3 m^2. Roosters ($n = 10$) were reared together. They were included in the study for sperm collection followed by artificial insemination. The design of the experiment is summarized in Figure 1. Seventy-five hens were exposed for 6 wk to GBH via the food (GBH group, 46.8 mg/kg bw/d), and 75 hens were fed with a regular diet without GBH (noted control or CT) (weeks 1−6 of the protocol). These weeks correspond to the egg laying peak period of the animals. After that, all animals (CT hens and ex-GBH hens) were fed with a regular diet (weeks 7−11 of the protocol). At wk 7, exposure to GBH was stopped. At the beginning of wk 9, hens were artificially inseminated with sperm from control roosters that were fed with regular diet (not GBH exposed). This 2-wk delay between exposure stop and artificial insemination was set up into the protocol to allow the total

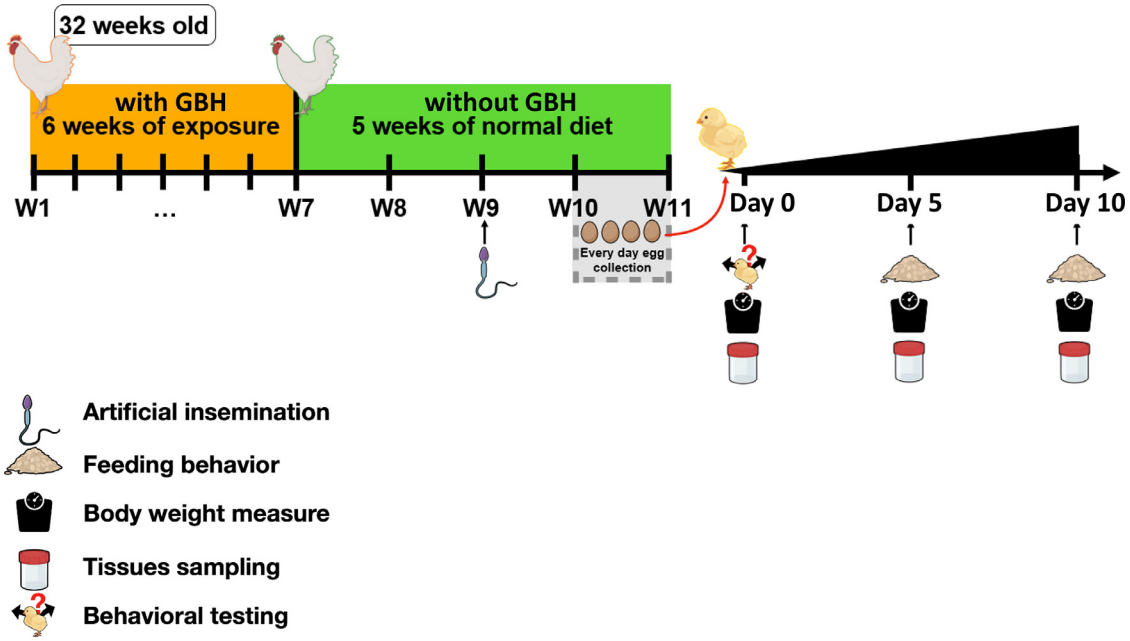


Figure 1. Experimental design. The timeline is represented in weeks (W) and days (Day). One hundred fifty 32-wk-old hens ROSS 308 were included in the study. Seventy-five GBH hens were exposed for 6 wk to GBH via the food (46.8 mg/kg bw/d), and 75 CT hens were fed with a regular diet without GBH. Then GBH was removed from the diet and animals were followed for 5 more wk (W7−W11) and named Ex-GBH group. At wk 9, hens were artificially inseminated with sperm from control roosters. The next week and for 1 wk (W10), eggs were collected daily and were artificially incubated for 21 d at the end of the week collection. At birth, all chicks ($n = 213$ for CT and $n = 186$ for Ex-GBH) were counted and weighed, sex was determined, and chicks from each group were slaughtered to collect samples and weigh organs at Day 0, Day 5, and Day10. At Day 0, some chicks were randomly selected to participate to an open-field test to measure their reactivity to a new environment.

elimination of Gly in eggs yolks as shown in Estienne et al. (2022). One week after the artificial insemination and for 1 wk (wk 10), eggs were collected. At the end of this week (wk 10), eggs fertilized with the sperm of CT roosters were incubated for 21 d. Before and during the whole experiment, we did not observe any significant differences between CT and GBH (wk 6: CT: 3,762 ± 18.9 g and GBH: 3,699 ± 18.9 g) and CT and ex-GBH (wk 11: CT: 3,996 ± 20.5 g and GBH: 3,920 ± 31.7 g) hens in terms of body weight. All animals were killed by electrical stunning and bled out, as recommended by the ethical committee.

Diet Composition of Adults

Hens (32 wk old) received a restricted laying diet according to Hendrix Genetics recommendation. They were fed with either GBH exposed feed ($n = 75$) or control feed ($n = 75$) from the first week of protocol to wk 6 (Figure 1). The control feed contained low measurable Gly and AMPA concentrations (0.21 mg/kg feed for Gly and undetectable levels for AMPA as determined by Phytocontrol, Nimes, France) (Estienne et al., 2022). The concentration of Gly in the GBH feed was 1,250 mg/kg feed for Gly and 0.30 mg/kg feed for AMPA, as determined by Phytocontrol. Gallup super 60, called GBH within the text, was obtained from Axereal (Monnaie, France); it contained 360 g/L Gly (485.8 g/L isopropylamine salt). Hens were food-restricted as recommended by Hendrix Genetics. Knowing that the hens weighed on average 3.45 kg over the exposure period and their food consumption was on average 130 g/d, the concentration in the feed thus corresponded to a dose of 47 mg Gly/kg body weight/d. The diet for the GBH group consists of regular broiler diet mixed with Gallup 360 in our laboratory in accordance with the directives of the "Directions Départementales de la Protection des Populations" (Departmental Directorate for the Protection of Populations). The mix was carried out by a technician with certification for the handling of phytosanitary products "Certiphyto," as recommended by the French law. The European Food Safety Authority (**EFSA**) has reported a NOAEL of 100 mg/kg body weight/d for poultry, with a maximum residue level (**MRL**) of 2.28 mg/kg bw/d. Therefore, our experiment tested a concentration of approximately 47% of the NOAEL threshold. From wk 7 to 11, all animals were fed with the control feed (CT $n = 63$ and Ex-GBH $n = 63$).

Determination of Mortality, Food Consumption, Body, and Different Organ Weights in Offspring

The chicks ($n = 213$ and 186 chicks from CT and Ex-GBH groups, respectively) were weighed at hatching (Day 0) as well as 5 and 10 d of age (Day 5 and Day 10). At hatching, chicks were divided into 10 pens (5 pens for 42/43 chicks from CT group and 5 pens for 37/38 chicks from Ex-GBH group). Each pen had almost the same number of male and female chicks. All animals were fed ad libitum with the same starting diet without GBH exposure. The amount of food was recorded at d 5 (Day

5) and 10 (Day 10) for each pen. Each day, the number of dead animals was recorded, and the mortality level was calculated from hatching to Day 10. At hatching as well as Day 5 and Day 10, 20 chicks (10 males and 10 females) from each group (from CT and Ex-GBH groups) were killed, and their organs or tissues (subcutaneous adipose tissue, brain, heart, liver, and digestive tract) were dissected and weighed.

Behavior (Open-Field Test)

Reactivity to a new environment was assessed in a square arena (80 × 80 × 29 cm) made of white wood with a floor made of yellow waterproof plastic surface under dim and dispersed light conditions when chicks were 1 days old. Chicks were carried individually in a room containing no other birds alternating between sex and treatment conditions. The room used for the test was at the same temperature than the home room (35°C). Each chick was placed in the center of the arena and allowed to freely explore for 6 min. At the end of the session, the arena was cleaned with water. A digital camera was mounted directly above the arena, capturing images at a rate of 5 Hz. The images were transmitted to a PC running the Ethovision tracking system (v XT8.0, Noldus Technology, Wageningen, The Netherlands). The locomotor activity (total distance traveled) and the velocity were obtained using the Ethovision tracking system. The total number of jumps and feces was also recorded manually by an experimenter blind to the sex or treatment.

Biological Samples

Blood samples from chicks were collected after slaughtering into heparin tubes on different days during the experiment (Day 0, Day 5, and Day 10 after chicks' birth). Blood samples were centrifuged (5,000 × g for 10 min at 4°C) and stored at −20°C before use for assays. Tissue samples were obtained at the same moments during the experiment (Day 0: CT $n = 20$ and Ex-GBH $n = 20$, Day 5: CT $n = 10$ and Ex-GBH $n = 10$, and Day 10: CT $n = 20$ and Ex-GBH $n = 20$) by dissection after slaughtering.

Gene Expression Analysis

Total RNA from 10 CT and 10 Ex-GBH chicks at Day 0, Day 5, and Day 10 were extracted from chicks' liver and abdominal adipose tissue using TRIzol RNA Isolation Reagents and an Ultra-Turax instrument for grinding, according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). The purity and concentrations of the obtained RNA were checked via their A260/A280 ratios using a Nanodrop machine. cDNA were obtained by reverse transcription of 2 μg of the total RNA in 20 μL of a mix containing each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 0.5 mM), 2 M RT Buffer, 15 μg/μL oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor, and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (**MMLV**); the mixture was kept for 1 h at 37°C. Quantitative PCR was performed using a mix of 3 μL of cDNA and 8 μL of SYBR Green Supermix 1X Reagent (Bio-Rad, Marnes-laCoquette, France) with 250 nM of specific primers (Invitrogen by Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) given in Table 1. Samples were set up in duplicate in a 384-well plate and a MyiQ Cycle Device (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used to apply the following procedure: incubation (2 min at 50°C), denaturation (10 min at 95°C), and 40 PCR cycles (30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C). Relative expression of genes was related to the geometric mean of the expression of 3 reference genes (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [**GAPDH**], actin B [**ACTB**], and eukaryotic elongation factor 1 alpha [**EEF1α**]). For each target gene, expression was calculated according to primer efficiency (E) and quantification cycle (Cq), where expression = E − Cq. Then, relative expression of the target gene to the 3 reference genes was analyzed.

Plasma Lipid and Uric Acid Assays

Plasma concentrations of triglycerides, uric acid, phospholipids, and cholesterol were determined by enzymatic assay using specific kits from Biolabo SAS (Maizy, France): triglycerides (reference: LP80519), uric acid (reference: 80,351), phospholipids (reference: 99,105), and cholesterol (reference: 80,106, Biolabo SAS, Maizy, France). The measurements were performed according to the manufacturer's protocol. For all these assays, the inter- and intra-assay coefficient variations were <15%.

Plasma Chemerin Assays

Chemerin concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assays using commercial kits (chicken chemerin: MBS738819 [sensitivity 0.1 ng/mL, MyBioSource, San Diego, CA]) according to the manufacturer's instructions. All assays were performed in 96-well plates and absorbance was measured at 450 nm using a Microplate Reader (Tecan, Magellan, Männedorf, Switzerland). A standard curve was drawn for the determination of hormone levels. The experiment was performed following the manufacturer's protocol with an intra-assay coefficient variation of < 15%.

Lipidomic Analysis

Quantitative analysis of neutral lipids: free cholesterol (cholesterol ester C16, C18, and C20:4; triacylglycerols C49, C51, C53, C55, C57, C59) and total conventional fatty acids: (c10:0, c12:0, c14:0, c15:0, c16:0, c17:0, c18:0, c20:0, c22:0, c23:0, c24:0, c14:1w5, c15:1, c16:1w7, c18:1w9, c18:1w7, c20:1w9, c22:1w9, c24:1w9, c18:2w6, c18:3w6, c18:3w3, c20:2w6, c20:3w3, c20:3w6, c20:4w6, c20:5w3, c22:2w6, c22:6w3, c22:4w6) were performed in

Table 1. List of primers sequences used for qRT-PCR.

Gene	Forward	Reverse
CCRL2	CACGCAGTGTTTGCTTTAAAAGC	CAACAGCCCACGTGACAATG
Chemerin	CGCGTGGTGAAGGATGTG	CGACTGCTCCCTAAAGAGGAACT
CMKLR1	CGGTCAACGCCATTTGGT	GGGTAGGAAGATGTTGAAGGAA
ELOVL3	TGGAGCAGAGCTTCAACGAG	CGCAGCTTGTAGCCTCTCTT
ELOVL5	AGCTACCTGGATGTTTGGCT	TCCGCATGTACTTTGGTCCT
ELOVL6	CATGTCCGTGTTGACTTTGC	AGCACACCATGTCCTTGTAGG
FADS1	TTGGGATTACGCTGCTCTCC	CTTGGCTACCCGGATGTCAG
FADS2	GCGAGAAAGGAGAGGAGTCCG	TCAGGTTGTGCTTCTGGATCTC
FASN	AGCCAAGGTCATTCTTTC	TTTCAATGATCCAAATCCAGATA
GPR1	ACCTGCCTGAGGAAGAAGAA	AAAGGCCAGTGGAAGCCCAT
SCD1	GTTCTCCCGTGGGTTGATGT	ACCTTAGGGCTCAATGCCAC
GAPDH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGATCTCGC
EEF1a	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TCACATGAGACAGACGGTTGC
β-actin	ACGGAACCACAGTTTATCATC	GTCCCAGTCTTCAACTATACC

abdominal adipose tissue from CT chicks at Day 5 ($n = 5$) and Ex-GBH ($n = 5$) by the lipidomic plateform (I2MC - MetaToul - Plateau Lipidomique, Toulouse, France).

Lipidomic Metabolism

The lipidomic datasets were analyzed by an openly available bioinformatics tools LIPIDMAP (https://lipidmaps.org/biopan) to produce a graphical representation of the results. BioPAN takes an input file in CSV (comma-separated values) format containing quantitative data. The file structure should be as follows:

- The first row contains sample labels (e.g., "wild_type_1," "wild_type_2," "control_1," "control_2"). The file must contain at least 2 conditions (e.g., "wild_type" and "control") and 2 samples per condition.
- The first column contains lipid molecular species. The lipid subclasses recognized by BioPAN are provided on the website.
- The second column contains molecular concentration quantification.

After loading a dataset, LipidLynxX2 is launched in the background. LipidLynxX takes the input file and converts the nomenclature of the lipid molecular species to BioPAN nomenclature. It will also equalize the structure of the lipid molecular species to the Bulk level if it not already (e.g., PE(34:1)). Within the graphical representation, the following information is presented:

1. Groups for comparison: interest condition and control condition. Choose the groups of samples that you want to compare.
2. Type: lipid and fatty acid. Visualize the fatty acid or lipid pathways.
3. Status 1: active, most active, suppressed, and most suppressed. View the pathways defined as having the selected status. The nodes of the lipids involved are stained blue with a red circle and the edges of the reactions are gray.

To search for active pathways which have changed in the samples of interest compared to the control samples, BioPAN compute a Z-score for each weighed pathway. Those with higher scores will be classified as active. The most active and the most suppressed are the most active/suppressed pathways in the active/suppressed identified pathways. That is, when there are several pathways that start with the same reactions, only one will be retained. For each step of the pathway, the Z-scores of the reactions are compared and the one with the highest Z-score will have its pathway considered as the most active/suppressed.

Statistical Analysis

The GraphPad Prism software (version 8) was used for all analyses. All data are reported as means ± standard error of mean. Bartlett's test was run to test the homogeneity of variance, and normal distribution was verified by the Shapiro−Wilk test. We performed one *t*-test or one-way analysis of variance (**ANOVA**) to compare the different means, when appropriate. When the ANOVA indicated significant effects at $P < 0.05$, the means were analyzed by using the Fisher's test. Stars (*) correspond to the unpaired *t*-test significance ($^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; $^{****}P < 0.0001$).

RESULTS

Long-Terms Effect of Hen GBH Exposure on the Progeny Behavior

After birth, chicks at Day 0 of age were tested with an open-field test to check their reactivity to a new environment. Male chicks from the Ex-GBH group exhibited a significant increased traveled distance (cm), velocity (cm/s), and number of feces when compared to the male chicks obtained from fertilized eggs from the CT group. However, the number of jumps during the test remained equal between the CT and the Ex-GBH groups. For female, results were similar with also a significant higher number of feces produced during the test by chicks from the Ex-GBH group. Finally, male and female chicks

Table 2. Long-term effects of maternal GBH exposure on the progeny behavior.

	Males			Females			All		
Behavior	CT ($n = 7$)	Ex-GBH ($n = 7$)	P value	CT ($n = 8$)	Ex-GBH ($n = 8$)	P value	CT ($n = 15$)	Ex-GBH ($n = 15$)	P value
Distance (cm)	**1,331 ± 152.7**	**1,890 ± 132.9***	**<0.05**	**1,199 ± 114.5**	**1,904 ± 231.7***	**<0.05**	**1,265 ± 93.7**	**1,897 ± 129.1*****	**<0.001**
Velocity (cm/sec)	**4.43 ± 0.51**	**6.30 ± 0.44***	**<0.05**	**3.99 ± 0.38**	**6.34 ± 0.77***	**<0.05**	**4.21 ± 0.31**	**6.32 ± 0.43*****	**<0.001**
Jumps (n)	0.37 ± 0.26	1.50 ± 0.57	NS	**0.37 ± 0.37**	**1.50 ± 0.44***	**<0.05**	**0.50 ± 0.22**	**1.81 ± 0.36****	**<0.01**
Faeces (n)	**0.12 ± 0.12**	**0.62 ± 0.18**	**<0.05**	0.37 ± 0.18	0.87 ± 0.23	NS	**0.25 ± 0.11**	**0.75 ± 0.14***	**<0.05**

Results of the open-field test to check the behavior of CT ($n = 7$ for males and $n = 8$ for female, total $n = 15$) and Ex-GBH ($n = 7$ for males and $n = 8$ for female, total $n = 15$) groups. The distance (cm), the velocity (cm/s), the number of jumps, and the number of feces were recorded. Values are expressed as mean ± standard errors of means. The P value shown corresponds to the unpaired t-test significance ($^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$). The bold values are those that are statistically significant between CT and Ex-GBH.

were compared altogether, and results demonstrated that chicks from the Ex-GBH group exhibited a significant increased traveled distance (cm), velocity (cm/s), number of jumps and number of feces when compared to the chicks from the CT group (Table 2).

Long-Term Effects of Hen GBH Exposure on the Growth, Mortality, and Food Intake of the Progeny

At Day 0, Day 5, and Day 10, all the chicks from the CT and the Ex-GBH groups were weighed and chicks from the Ex-GBH group exhibited a heavier body weight when compared to the CT group at Day 5 and Day 10. Moreover, during the same period, we measured the average quantity of food consumed per chick within the 5 CT pens and the 5 Ex-GBH pens and we noticed no differences between the food consumption between the 2 groups. Finally, we also checked the mortality rate within the 2 groups during the first 10 d of life and no significant results appeared between the 2 groups (Table 3).

Long-Term Effects of Hen GBH Exposure Induce a Fattening in the Offsprings

At Day 0, Day 5, and Day 10, tissue samples were collected and weighed from respectively 20, 10, and 20 chicks (50% of males and 50% of females). We collected the vitelline vesicle, the liver, the brain, the digestive tract, the heart, the subcutaneous adipose tissue, and the abdominal adipose tissue (except at Day 0 because it was absent). The total body weight of the chicks was also measured. Results showed that at Day 0, chicks from the Ex-GBH group have more subcutaneous adipose tissue compared to chicks from the CT group but with a similar body weight between the 2 groups. At Day 5, chicks from the Ex-GBH group exhibited a significant less heavy liver, digestive tract, and subcutaneous adipose tissue compared to the CT group. On the other hand, we noticed a significant increase of their abdominal adipose tissue compared to the CT group. At Day 10 of age, chicks from the Ex-GBH group exhibited a significant lighter digestive tract and heart but a heavier abdominal adipose tissue when compared to the chicks from the CT group (Table 4). We measured the blood plasma concentrations of triglycerides, phospholipids, uric acid, and cholesterol. Results showed a significant increase of triglycerides concentrations within the blood plasma of chicks from the Ex-GBH group at Day 0, Day 5, and Day 10 (Table 5), whereas the other parameters remained similar for both groups at the same ages (Table 5). We also determined plasma chemerin concentration since we have previously shown that it was negatively associated with the fattening in hen. As shown in Table 6, plasma chemerin concentrations were significantly decreased in chicks from Ex-GBH group compared to CT group at Day 0, Day 5, and Day 10.

Table 3. Phenotypical measures on CT and Ex-GBH chicks during their 10 firsts days of growth.

Chicks weight (g)	CT ($n = 213$)	Ex-GBH ($n = 186$)	P value
Day 0	44.19 ± 0.21	44.57 ± 0.22	NS
Day 5	**107.1 ± 0.80**	**112.5 ± 0.79***	**<0.05**
Day 10	**171.5 ± 1.39**	**176.1 ± 1.59***	**<0.05**
Food eaten (g)	**CT ($n = 5$)**	**Ex-GBH ($n = 5$)**	***P* value**
Day 5	2.67 ± 0.30	2.38 ± 0.11	NS
Day 10	2.74 ± 0.39	2.38 ± 0.08	NS
Mortality (%)	**CT**	**Ex-GBH**	***P* value**
	1.76 ± 0.09	1.80 ± 0.05	NS

Chicks from the CT group ($n = 213$) and from the Ex-GBH group ($n = 186$) were weighed (g) at Day 0, Day 5, and Day 10. Animals from CT and Ex-GBH were divided into 5 pens. Their daily food consumption (g) was estimated at Day 5 and Day 10. The percentage of mortality was calculated during this period for both groups. Values are expressed as mean ± standard errors of means. The P value shown corresponds to the unpaired t-test significance ($^*P < 0.05$). The bold values are those that are statistically significant between CT and Ex-GBH.

Lipidomic Measures in Abdominal Adipose Tissue in the Offsprings

We then focused on the lipidomic metabolism of chicks at Day 5 from CT ($n = 5$) and Ex-GBH ($n = 5$) animals by measuring the relative abundance of several lipids within the abdominal adipose tissue. Results showed decreased amounts of pentadecylic, palmitic, palmitoleic, hexadecatrienoic, linoleic, alpha linoleic, eicosadienoic, eicosapentaenoic, and docosapentaenoic acids within the abdominal adipose tissue of Ex-GBH chicks compared to CT chicks (Figure 2). The relative abundance of polyunsaturated and the ratio between PolyUnsaturated Fatty Acids/SAturated Fatty Acids (**PUFA/SAFA**) were also decreased within this group compared to the CT group. On the other hand, the relative abundance of monounsaturated and the ratios between MonoUnsaturated Fatty Acids/

Table 4. Phenotypical measures on CT and Ex-GBH chicks at Day 0, Day 5, and Day 10.

	Day 0			Day 5			Day 10		
	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value	CT ($n = 10$)	Ex-GBH ($n = 10$)	P value	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value
Chick (g)	44.79 ± 0.49	44.94 ± 0.45	NS	112.1 ± 3.29	114.4 ± 4.10	NS	168.3 ± 4.89	179.4 ± 5.02	NS
Vitelline vesicle/bw	6.46 ± 0.29	5.93 ± 0.28	NS	NA	NA		NA	NA	
Liver/bw	2.62 ± 0.05	2.66 ± 0.06	NS	**3.20 ± 0.10**	**2.79 ± 0.09***	**<0.01**	3.19 ± 0.08	2.93 ± 0.11	NS
Brain/bw	2.02 ± 0.06	2.01 ± 0.06	NS	1.04 ± 0.04	0.99 ± 0.04	NS	0.77 ± 0.02	0.75 ± 0.02	NS
Digestive tract/bw	12.22 ± 0.24	12.22 ± 0.14	NS	**24.44 ± 0.80**	**22.20 ± 0.64**	**<0.05**	**18.87 ± 0.26**	**16.53 ± 0.39****	**<0.0001**
Heart/bw	0.76 ± 0.02	0.80 ± 0.02	NS	0.75 ± 0.04	0.65 ± 0.05	NS	**0.69 ± 0.02**	**0.62 ± 0.02***	**<0.05**
Subcutaneous adipose tissue/bw	**0.44 ± 0.06**	**0.68 ± 0.07***	**<0.05**	**0.48 ± 0.07**	**0.27 ± 0.03***	**<0.05**	0.43 ± 0.03	0.46 ± 0.04	NS
Abdominal adipose tissue/bw	NA	NA		**0.24 ± 0.02**	**0.49 ± 0.06****	**<0.01**	**0.37 ± 0.02**	**0.47 ± 0.04***	**<0.05**

Abbreviation: NA, not detected.

Chicks were randomly selected at D0 ($n = 20$ for the CT group and $n = 20$ for the Ex-GBH group), 5 ($n = 10$ for the CT group and $n = 10$ for the Ex-GBH group) and 10 ($n = 20$ for the CT group and $n = 20$ for the Ex-GBH group) and were weighed and euthanized to collect their vitelline vesicle (only at Day 0), liver, brain, digestive tract, heart, subcutaneous adipose tissue and abdominal tissue (only at Day 5 and Day 10). Tissues were also weighed. Values are expressed as mean (Ratio organ weight/ total body weight (bw)) ± standard errors of means. The P value shown corresponds to the unpaired t-test significance (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ****$P < 0.0001$). The bold values are those that are statistically significant between CT and Ex-GBH.

PolyUnsaturated Fatty Acids (**MUFA/PUFA**) and MonoUnsaturated Fatty Acids/SAturated Fatty Acids (**MUFA/SAFA**) were increased in the Ex-GBH group when compared to the CT group (Figure 2). For other lipids with nonsignificant differences, data are given in a table (Supplemental data 1). These results were analyzed by an openly available bioinformatics tools LIPID-MAP (https://lipidmaps.org/biopan) to produce a graphical representation of the results and to predict the relative expression of enzymes involved within the lipids synthesis pathway. The predicted pathway indicates an expected down expression of *ELOVL3* and *FADS2* genes and an over expression of *SCD1, ELOVL6, FADS1*, and *ELOVL5* genes in Ex-GBH group when compared to CT group (Figure 3). To confirm these expected results, we proceeded to an analysis of these gene expressions by RT-qPCR within the adipose tissue of chicks from both groups at the same age (Day 5). Expressional results confirmed the predicted data by BIOPAN, RT-qPCR results showing a subexpression of *ELOVL3* and *FADS2* genes and an over-expression of *SCD1, ELOVL6, FADS1*, and *ELOVL5* genes in Ex-GBH adipose tissue when compared to CT group (Figure 4). We next determined which of the following gene expression (*SCD1, ELOVL6, FADS1, ELOVL5, ELOVL3*, and *FADS2*) was more associated with the amount of abdominal fat tissue. Once CT and Ex-GBH data were pooled, the Pearson correlation coefficient (r) between the amount of abdominal fat tissue and *ELOVL3* ; *FADS2* ; *SCD1* ; *ELOVL6, FADS1*, and *ELOVL5* gene expression was −0.58 ($P = 0.007$), −0.58 ($P = 0.007$), 0.59 ($P = 0.006$) ; 0.72 ($P = 0.0003$), 0.73 ($P = 0.0002$), 0.68 ($P = 0.001$), respectively. Thus, the correlation between the amount of abdominal fat content and *FADS1* gene expression was the highest and most significant.

Table 5. Metabolites concentration within the blood plasma of chicks from the CT and the Ex-GBH groups.

Triglycerides (g/L)	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value
Day 0	**0.23 ± 0.006**	**0.40 ± 0.023******	**<0.0001**
Day 5	**0.28 ± 0.012**	**0.42 ± 0.026******	**<0.0001**
Day 10	**0.36 ± 0.019**	**0.46 ± 0.009******	**<0.0001**
Phospholipids (g/L)			
	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value
Day 0	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.06	NS
Day 5	0.79 ± 0.01	0.85 ± 0.04	NS
Day 10	0.94 ± 0.03	0.89 ± 0.03	NS
Uric acid (mg/L)			
	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value
Day 0	21.56 ± 1.55	19.79 ± 1.44	NS
Day 5	21.08 ± 1.29	21.02 ± 1.36	NS
Day 10	22.49 ± 1.04	20.69 ± 0.90	NS
Cholesterol (g/L)			
	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value
Day 0	0.78 ± 0.03	0.76 ± 0.23	NS
Day 5	0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.01	NS
Day 10	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.01	NS

Chicks were randomly selected at Day 0, Day 5, and Day 10 ($n = 20$ for the CT group and $n = 20$ for the Ex-GBH group) to collect a sample of their blood that was used to measure triglycerides (g/L), phospholipids (g/L), uric acid (mg/L), and cholesterol (g/L) plasma concentrations. Values are expressed as mean ± standard errors of means. The P value shown corresponds to the unpaired t-test significance (****$P < 0.0001$). The bold values are those that are statistically significant between CT and Ex-GBH.

Expression of Chemerin and Chemerin Receptors and Fatty Acid Synthase in Liver of the Offsprings

Since lipogenesis takes place primarily in the liver and chemerin is a hepatokine, that is known to regulate

Table 6. Plasma chemerin concentrations (ng/mL) in chicks from the CT and the Ex-GBH groups.

Chemerin (ng/mL)	CT ($n = 20$)	Ex-GBH ($n = 20$)	P value
Day 0	3.26 ± 0.61	1.70 ± 0.023***	<0.001
Day 5	15.42 ± 2.87	8.33 ± 1.94**	<0.01
Day 10	21.91 ± 2.92	15.38 ± 1.84*	<0.05

Chicks were randomly selected at Day 0, Day 5, and Day 10 of age ($n = 20$ for the CT group and $n = 20$ for the Ex-GBH group) to collect a sample of their blood that was used to measure chemerin. Values are expressed as mean ± standard errors of means. The P value shown corresponds to the unpaired t-test significance (*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$).

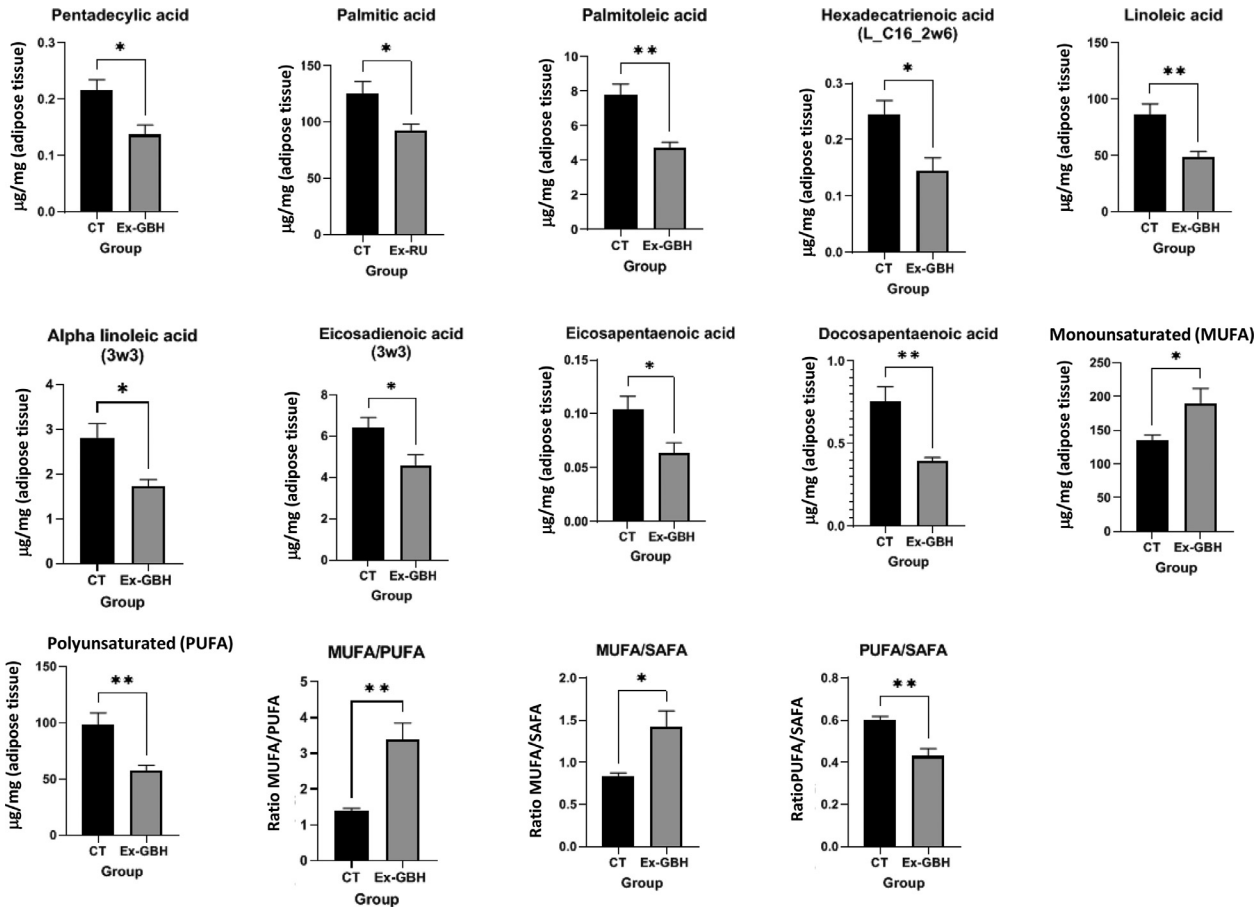


Figure 2. Lipidomic measures within the abdominal adipose tissue of chicks at Day 5 of age. The amount of several lipids (μg/mg adipose tissue) were determined and results for those with significant differences between CT ($n = 5$) and Ex-GBH ($n = 5$) groups are presented as diagrams (black bars for CT chicks and gray bars for Ex-GBH chicks). Stars (*) correspond to the unpaired t-test significance ($P < 0.05$) corresponding to the comparison between CT andEx-GBH chicks. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Abbreviations: MUFA, MonoUnsaturated Fatty Acids; PUFA, PolyUnsaturated Fatty Acids; SAFA, SatUrated Fatty Acids.

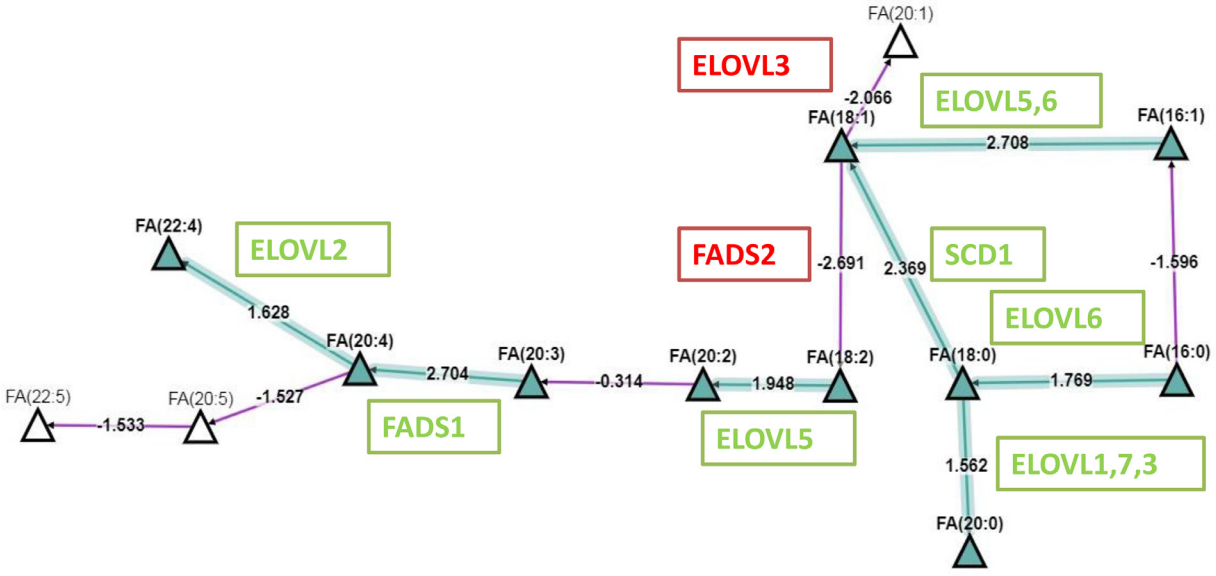


Figure 3. Prediction of the level expression of enzymes within the pathway of synthesis of the lipids. The lipidomic datasets were analyzed by an openly available bioinformatics tools LIPIDMAP (https://lipidmaps.org/biopan) to produce a graphical representation of the results. The figure is presented as the comparison of Ex-GBH data versus CT data. The genes in red are expected to be downregulated, whereas the genes in green are expected to be over expressed in the Ex-GBH group.

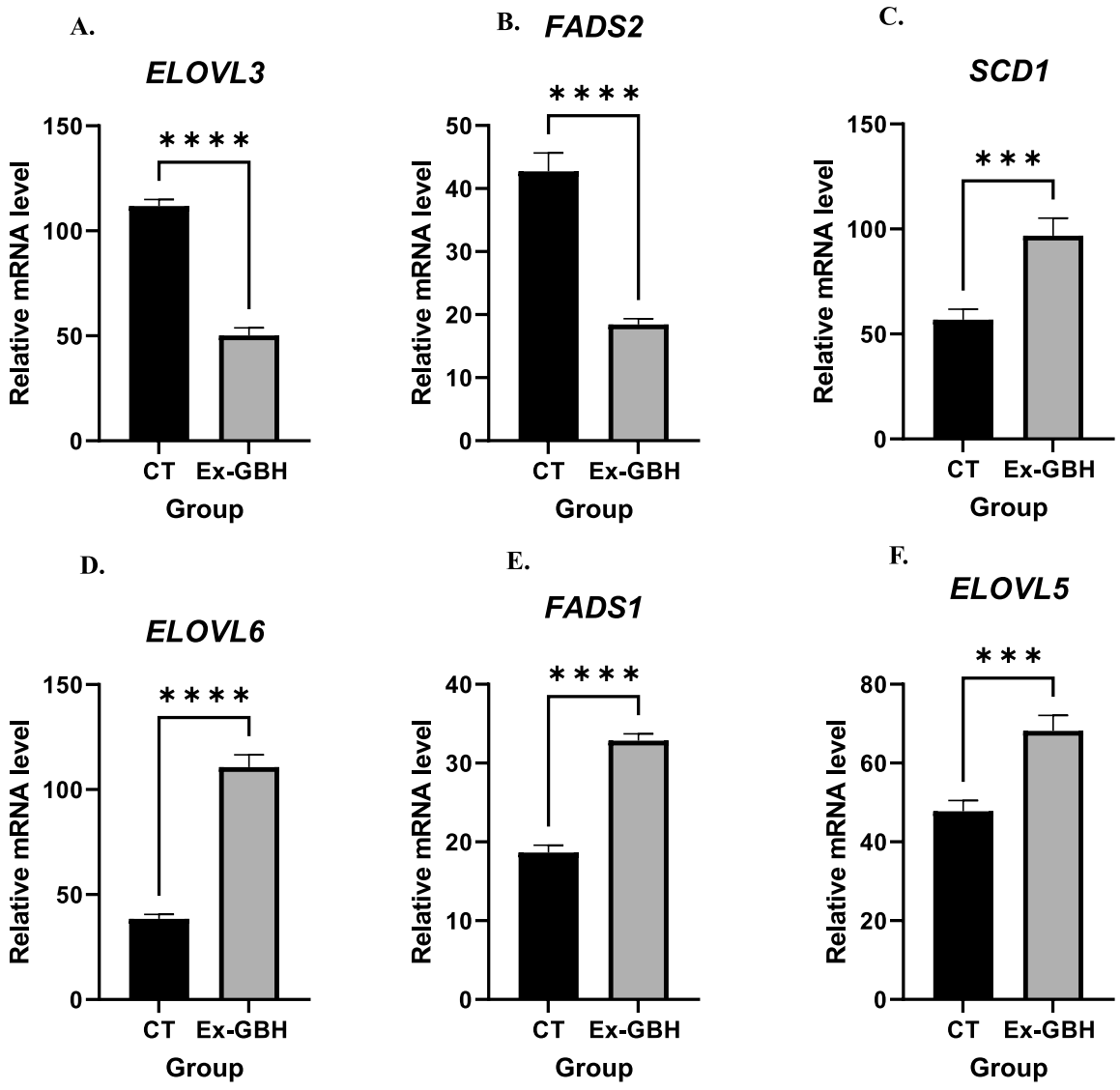


Figure 4. Expression of enzymes involved within the lipidomic pathway. A total of 20 chicks were randomly selected at Day 5 within the CT ($n = 10$) and the Ex-GBH ($n = 10$) groups and were euthanized to collect samples of abdominal adipose tissue. A. *ELOVL3*, B. *FADS2*, C. *SCD1*, D. *ELOVL6*, E. *FADS1*, and F. *ELOVL5* relative expression in the adipose tissue of chicks from the CT and the Ex-GBH groups quantified by RT-qPCR. Values are expressed as mean ± standard errors of means. * Indicates significant differences between the CT and Ex-GBH groups for unpaired *t*-test with significance at $P < 0.05$.

lipid metabolism, we further investigated the chemerin system expression within the liver of Ex-GBH and CT chicks at Day 0, Day 5, and Day 10. It appeared that *chemerin* expression was higher within the liver of the CT chicks at Day 0 and Day 5 compared to the Ex-GBH group. For *CMKLR1* expression, its expression was also significantly increased within the liver of CT chicks at Day 10 only and results were similar for *CCRL2* expression. Finally, *GPR1* expression appeared significantly increased within the liver of the chicks from the Ex-GBH group (Figure 5). We also measured the expression of fatty acid synthase (**FASN**) involved in the lipogenesis. Results showed *FASN* expressions were significantly lower and higher within the liver of Ex-GBH chicks at Day 5 and Day 10, respectively (Figure 5).

DISCUSSION

In the present study, we showed for the first time that a maternal dietary exposure of a GBH in chicken could affect the behavior and lipid metabolism of the offspring. These effects were associated with a variation of lipid composition in abdominal adipose tissue and some actors of lipid metabolism in liver including fatty acid synthase and chemerin system.

Indeed, behavioral measurements performed in chicks on Day 0 revealed that chicks from Ex-GBH group moved faster and farther than chicks from CT group. In the literature, GBH and other pesticides or endocrine disruptors have been already shown to alter the locomotion activity of the animals. In bees (Tetragonisca angustula), GBH increased the locomotion time (Sousa

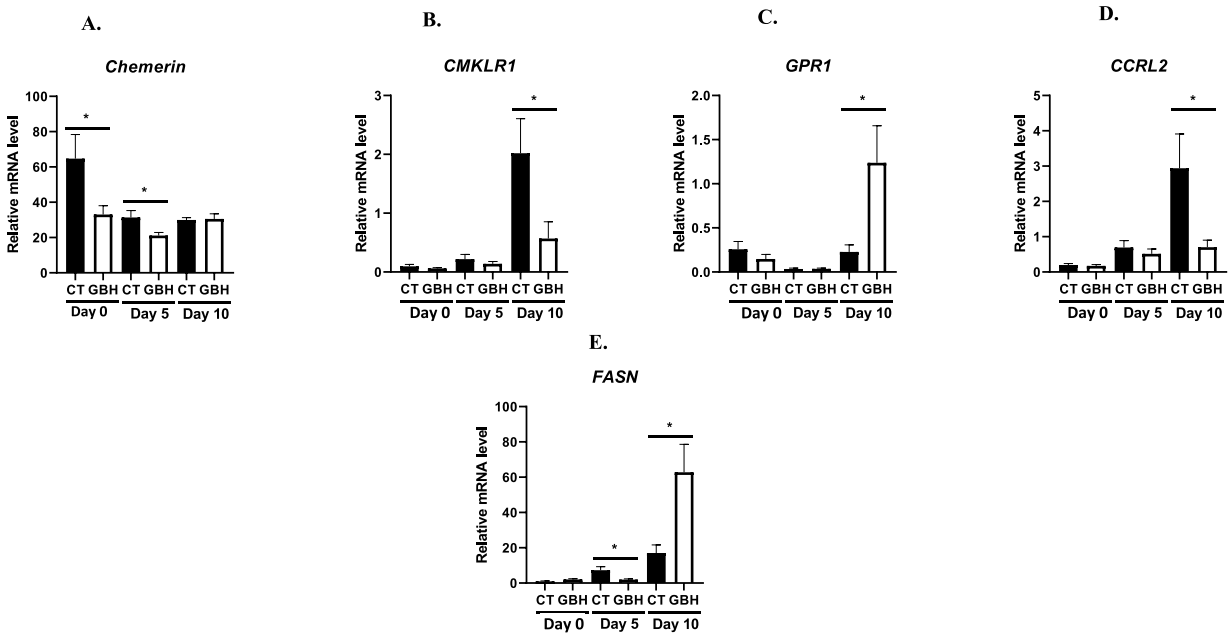


Figure 5. Expression of chemerin and chemerin receptors and fatty acid synthase (FASN) in the liver of CT and Ex-GBH groups of chicks. A total of 20 chicks were randomly selected at Day 0, Day 5, and Day 10 within the CT and the Ex-GBH groups and were euthanized to collect samples of liver tissue. A. *Chemerin*, B. *CMKLR1*, C. *GPR1*, D. *CCRL2*, and E. *FASN* relative expression in the liver tissue of chicks from the CT and the Ex-GBH groups ($n = 20$) quantified by RT-qPCR. Values are expressed as mean ± standard errors of means. * Indicates significant differences between the CT and Ex-GBH groups for unpaired *t*-test with significance at $P < 0.05$.

Prado et al., 2023). One explanation is that GBH like neonicotinoids, carbamates, pyrethroids, and organophosphates could alter sodium transport, compete with acetylcholine, and consequently collapse the nervous system causing poisoning symptoms such as hyperexcitation (Soderlund et al., 2002). In mice, in utero exposure to Mixture N1 (a mixture of phthalates, pesticides, and bisphenol A) results in behavioral changes in adults, including an increase in distance moved in the open-field test (Repouskou et al., 2020). In our study, the Ex-GBH animals produced more feces than the CT group. Active animals are considered to be more emotionally reactive than inactive animals (Pelhaitre et al., 2012). In other words, animals from Ex-GBH group would feel less fear in response to a new environment than CT animals. A previous study suggested that GBHs could increase anxiety in mice, by triggering dysbiosis in their gut microbiome (Aitbali et al., 2018). In Fréville et al. (2022), we showed disturbances of the cecal microbiome in exposed and formerly exposed hens. We also showed that these disturbances correlate with a reduction in short-chain fatty acids levels, and that this reduction could possibly induce mental disorders and depressive-like behavior (Cattani et al., 2017; Silva et al., 2020). However, here, we observed what rather looks like a reduction in anxiety. Another mechanism would therefore better explain our observations.

We also observed an increase in body weight at Day 5 and Day 10 in Ex-GBH chicks, which was not explained by an increase in the food intake by the chicks. Still, Ex-GBH chicks exhibited a heavier abdominal adipose tissue, and this was coherent with a higher triglycerids concentration in their blood plasma from Day 0 to Day 10. A study on cockerels brought similar results after dietary administration of 125 mg/kg/d of glyphosate for 15, 30, and 45 d (Hussain, 2019). The lipidomic profile of a chicken may depend on several factors, including the diet. During fattening, chicks accumulate an increased amount of triglycerides and fatty acids in their body (hence the increased amount of triglycerides in chicks plasma), which can be stored in fatty tissue. This can lead to an increase in the saturated fatty acid and unsaturated fatty acid content of the chick's body fat. In hens, the fatty acid profile is greatly influenced by the one from the diet, to which it tends to look like. Moreover, PUFA mainly originate from the alimentation (Villaverde et al., 2006). In our case, CT and Ex-GBH animals received the very same diet, of which they ate similar amounts each day. Lipidomic analysis of chicks abdominal adipose tissue reveals that monounsaturated fatty acids abundance is globally increased and PUFA abundance is globally decreased in Ex-GBH animals. It is well known that when PUFA are supplemented in the diet, there is decreased abdominal fat (Crespo and Esteve-Garcia, 2001) compared to supplementation with saturated or monounsaturated fats. These data may be explained by results from studies suggesting that PUFA suppress fat synthesis in birds (Sanz et al., 2000). Even if the increase in fat in adipose tissue is mainly due to hepatic lipogenesis in chicken, we can suggest that the higher MUFA/PUFA ratio could promote fattening in Ex-GBH animals by reducing fat synthesis.

A recent study performed on human serum reports disturbances of the lipidomic profile following to an occupational exposure to glyphosate leading to potential severe health effects (Zhang et al., 2023). Beside the effect for the health of the chick itself, a change in fatty acid content in farm animals must be taken seriously, as

the relative amount of saturated, mono, and PUFA must range in the proper interval for a safe and healthy human consumption (Milićević et al., 2014). Open-source software LIPIDMAP allows to make predictions on the expression levels of enzymes involved in the synthesis of fatty acids. Several enzymes were predicted to be affected (ELOV3 and FADS2 were predicted to be downregulated, and FADS1, SCD1, ELOVL2, ELOVL1, 2, 3, 5, and 6 were predicted to be upregulated), which was confirmed by the qPCR analysis on chicks abdominal adipose tissue. After Pearson correlation analyses, we showed that correlation between the amount of abdominal fat content and FADS1 gene expression was the most significant.

Considering that the moment when the eggs were collected is far enough from the parental exposure for the eggs to be considered noncontaminated by glyphosate residues (Estienne et al., 2022), we make the assumption that the regulation of these enzymes is done by a transgenerational mechanism such as an epigenetic reprogramming, which is known for being a potential link between the exposure to environmental pollutants and metabolic diseases (Lian et al., 2023). Moreover, a previous study from our laboratory showed epigenetic modifications in GBH-exposed roosters spermatozoa (Serra et al., 2021). Interestingly, the progeny from these roosters also had higher growth performances and fattening than its unexposed control. Similar modifications could possibly therefore occur in female reproductive cells. The hypothesis that the absorption of fatty acids in the digestive tract would be modified by the parental exposure remains to be explored in future studies as well.

The accumulation of lipids could also be the result of a disruption of liver functions, as it has been reported that glyphosate exposure could lead to fatty liver diseases (Mesnage et al., 2017). We measured the mRNA expression of the chemerin system in chicks liver. Chemerin is an adipokine but also a hepatokine involved in several metabolic processes. In chicken, chemerin injections are negatively correlated with body weight (Estienne et al., 2021) and plasma chemerin is negatively associated with fattening in hen (Estienne et al., 2021). *Chemerin* mRNA level was reduced in Ex-GBH animals during Day 0 and Day 5, but not on Day 10. Its main receptor *CMKLR1* mRNA expression was reduced, just like *CCRL2* which is another receptor for chemerin. Therefore, it seems that the expression of the chemerin system is reduced in Ex-GBH animals which would explain their increase in body weight and fattening. However, the higher expression of *GPR1* mRNA in Ex-GBH animals during Day 10 does not support this hypothesis. We also measured a higher expression of *FASN* mRNA expression in Ex-GBH animals liver at Day 10, which is consistent with their higher adiposity, since FASN stimulates fatty acid synthesis (Anderson and Hammes, 1984). However, this was not true at Day 5 where FASN expression was lower in Ex-GBH animals suggesting that the activity of FASN could be increased in this condition. It therefore seems that several key regulators of fattening are affected by the maternal exposure to the GBH.

CONCLUSIONS

The present study demonstrates that an exposure to a GBH in hens has behavioral and metabolic outcomes on the progeny. We show that chicks whose mothers are exposed to a GBH do not have the appropriate fear response to the discovery of a new environment. We also show that despite a normal alimentation, they gain more body weight and they are fatter than chicks whose parents would not have been exposed. Moreover, the fatty acids composition of their abdominal adipose tissue is disturbed, which could have bad consequences on their health as growing animals and later as adults.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Région Centre Val de Loire for the financial support (Project number 32000858, HAPOFERTI).

Author Contributions: AE, MF, OB, CR, LC, FC, PF, and JD contributed to the overall approach and design of experiments. AE, MF, and JD performed statistical data analysis. LC and FC contributed to the analyses of behavior. PG and MC took care of animals. AE, OB, and CR performed RT-qPCR. AE, MF, and JD wrote the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved the final version.

DISCLOSURES

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

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.psj.2023.102877.

REFERENCES

Aitbali, Y., S. Ba-M'hamed, N. Elhidar, A. Nafis, N. Soraa, and M. Bennis. 2018. Glyphosate based- herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. Neurotoxicol. Teratol. 67:44–49.

Anderson, V. E., and G. G. Hammes. 1984. Stereochemistry of the reactions catalyzed by chicken liver fatty acid synthase. Biochemistry 1984:2088–2094.

Cattani, D., P. A. Cesconetto, M. K. Tavares, E. B. Parisotto, P. A. De Oliveira, C. E. H. Rieg, M. C. Leite, R. D. S. Prediger, N. C. Wendt, G. Razzera, D. W. Filho, and A. Zamoner. 2017. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. Toxicology 387:67–80.

Cattani, D., N. Struyf, V. Steffensen, J. Bergquist, A. Zamoner, E. Brittebo, and M. Andersson. 2021. Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysregulation of dynorphins and an increase of neural precursor cells in the brain of adult male rats. Toxicology 461:152922.

Crespo, N., and E. Esteve-Garcia. 2001. Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. Poult. Sci. 80:71–78.

Defarge, N., J. Spiroux De Vendômois, and G. E. Séralini. 2018. Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. Toxicol. Rep. 5:156–163.

Estienne, A., M. Fréville, G. Bourdon, C. Ramé, J. Delaveau, C. Rat, M. Chahnamian, A. Brionne, P. Chartrin, H. Adriensen, F. Lecompte, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken. Ecotoxicol. Environ. Saf. 241:113741.

Estienne, A., C. Ramé, P. Ganier, M. Chahnamian, A. Barbe, J. Grandhaye, J.-P. Dubois, M. Batailler, M. Migaud, F. Lecompte, H. Adriaensen, P. Froment, and J. Dupont. 2021. Chemerin impairs food intake and body weight in chicken: focus on hypothalamic neuropeptides gene expression and AMPK signaling pathway. Gen. Comp. Endocrinol. 304:113721.

Estienne, A., M. Reverchon, A. Partyka, G. Bourdon, J. Grandhaye, A. Barbe, E. Caldas-Silveira, C. Rame, W. Nižański, P. Froment, and J. Dupont. 2020. Chemerin impairs in vitro testosterone production, sperm motility, and fertility in chicken: possible involvement of its receptor CMKLR1. Cells 9:1599.

Fathi, M. A., E. Abdelghani, D. Shen, X. Ren, P. Dai, Z. Li, Q. Tang, Y. Li, and C. Li. 2019. Effect of in ovo glyphosate injection on embryonic development, serum biochemistry, antioxidant status and histopathological changes in newly hatched chicks. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 103:1776–1784.

Fathi, M. A., G. Han, R. Kang, D. Shen, J. Shen, and C. Li. 2020. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. Environ. Sci. 27:16865–16875.

Foldager, L., J. F. M. Winters, N. P. Nørskov, and M. T. Sørensen. 2021. Impact of feed glyphosate residues on broiler breeder egg production and egg hatchability. Sci. Rep. 11:19290.

Fréville, M., A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, M. Chahnamian, C. Staub, E. Venturi, J. Lemarchand, E. Maximin, A. Hondelatte, O. Zemb, C. Canlet, R. Guabiraba, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens. Front. Physiol. 13:974688.

Gill, J. P. K., N. Sethi, A. Mohan, S. Datta, and M. Girdhar. 2018. Glyphosate toxicity for animals. Environ. Chem. Lett. 16:401–426.

Grau, D., N. Grau, Q. Gascuel, C. Paroissin, C. Stratonovitch, D. Lairon, D. A. Devault, and J. Di Cristofaro. 2022. Quantifiable urine glyphosate levels detected in 99% of the French population, with higher values in men, in younger people, and in farmers. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 29:32882–32893.

Hussain, R. 2019. Exposure to sub-acute concentrations of glyphosate induce clinico-hematological, serum biochemical and genotoxic damage in adult cockerels. PVJ 39:181–186.

Jasper, R., G. O. Locatelli, C. Pilati, and C. Locatelli. 2012. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. Interdiscip. Toxicol. 5:133–140.

Larsen, K., R. Najle, A. Lifschitz, M. L. Maté, C. Lanusse, and G. L. Virkel. 2014. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. Int. J. Toxicol. 33:307–318.

Lian, C.-Y., S. Wei, Z.-F. Li, S.-H. Zhang, Z.-Y. Wang, and L. Wang. 2023. Glyphosate-induced autophagy inhibition results in hepatic steatosis via mediating epigenetic reprogramming of PPARα in roosters. Environ. Pollut. 324:121394.

Mesnage, R., C. Benbrook, and M. N. Antoniou. 2019. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. Food Chem. Toxicol. 128:137–145.

Mesnage, R., N. Defarge, J. Spiroux De Vendômois, and G. E. Séralini. 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. Food Chem. Toxicol. 84:133–153.

Mesnage, R., G. Renney, G.-E. Séralini, M. Ward, and M. N. Antoniou. 2017. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. Sci. Rep. 7:39328.

Milićević, D., D. Vranić, Z. Mašić, N. Parunović, D. Trbović, J. Nedeljković-Trailović, and Z. Petrović. 2014. The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. Lipids Health Dis. 13:42.

Muñoz, J. P., T. C. Bleak, and G. M. Calaf. 2021. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: a review. Chemosphere 270:128619.

Pelhaitre, A., S. Mignon-Grasteau, and A. Bertin. 2012. Selection for wheat digestibility affects emotionality and feeding behaviours in broiler chicks. Appl. Anim. Behav. Sci. 139:114–122.

Repouskou, A., A. K. Papadopoulou, E. Panagiotidou, P. Trichas, C. Lind, A. Bergman, C. Gennings, C. G. Bornehag, J. Rüegg, E. Kitraki, and A. Stamatakis. 2020. Long term transcriptional and behavioral effects in mice developmentally exposed to a mixture of endocrine disruptors associated with delayed human neurodevelopment. Sci. Rep. 10:9367.

Romano, R. M., M. A. Romano, M. M. Bernardi, P. V. Furtado, and C. A. Oliveira. 2010. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Arch. Toxicol. 84:309–317.

Ruuskanen, S., M. J. Rainio, C. Gómez-Gallego, O. Selenius, S. Salminen, M. C. Collado, K. Saikkonen, I. Saloniemi, and M. Helander. 2020a. Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: a long-term experiment in an avian model. Environ. Pollut. 266:115108.

Ruuskanen, S., M. J. Rainio, M. Uusitalo, K. Saikkonen, and M. Helander. 2020b. Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: a long-term experiment in a bird model. Sci. Rep. 10:6349.

Sanz, M., C. J. Lopez-Bote, D. Menoyo, and J. M. Bautista. 2000. Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and beta-oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. J. Nutr. 130:3034–3037.

Schönbrunn, E., S. Eschenburg, W. A. Shuttleworth, J. V. Schloss, N. Amrhein, J. N. S. Evans, and W. Kabsch. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:1376–1380.

Serra, L., A. Estienne, G. Bourdon, C. Ramé, C. Chevaleyre, P. Didier, M. Chahnamian, S. El Balkhi, P. Froment, and J. Dupont. 2021. Chronic dietary exposure of roosters to a glyphosate-based herbicide increases seminal plasma glyphosate and AMPA concentrations, alters sperm parameters, and induces metabolic disorders in the progeny. Toxics 9:318.

Silva, Y. P., A. Bernardi, and R. L. Frozza. 2020. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. Front. Endocrinol. 11:25.

Soderlund, D. M., J. M. Clark, L. P. Sheets, L. S Mullin, V. J. Piccirillo, D. Sargent, J. Steves, and M. L. Weiner. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology 171:3–59.

Sousa Prado, I., A. Alves da Rocha, L. Alves Silva, and V. Cunha Gonzalez. 2023. Glyphosate-based formulation affects Tetragonisca angustula worker's locomotion, behavior and biology. Ecotoxicology 32:513–524.

Szabó, R., G. Szemerédy, É. Kormos, J. Lehel, and P. Budai. 2018. Studies on joint toxic effects of a glyphosate herbicide (FOZÁT 480) and a heavy metal (cadmium) on chicken embryos. AGR 2:37–43.

Villaverde, C., M. D. Baucells, L. Cortinas, and A. C. Barroeta. 2006. Effects of dietary concentration and degree of polyunsaturation of dietary fat on endogenous synthesis and deposition of fatty acids in chickens. Br. Poult. Sci. 47:173–179.

Walsh, L. P., C. McCormick, C. Martin, and D. M. Stocco. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. Environ. Health Perspect. 108:8.

Zhang, F., Q. Zhang, X. Liu, M. Gao, X. Li, Y. Wang, Y. Chang, X. Zhang, Z. Huo, L. Zhang, J. Shan, B. Zhu, and W. Yao. 2023. Human serum lipidomics analysis revealed glyphosate may lead to lipid metabolism disorders and health risks. Environ. Int. 171:107682.

Autres articles publiés au cours de la thèse

I. Serra et al., 2023

Serra, L., Bourdon, G., Estienne, A., **Fréville, M.,** Ramé, C., Chevaleyre, C., et al. (2023). Triazole pesticides exposure impaired steroidogenesis associated to an increase in AHR and CAR expression in testis and altered sperm parameters in chicken. Toxicology Reports 10, 409–427. doi: 10.1016/j.toxrep.2023.03.005

Toxicology Reports 10 (2023) 409–427

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Reports

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

Triazole pesticides exposure impaired steroidogenesis associated to an increase in AHR and CAR expression in testis and altered sperm parameters in chicken☆

Loïse Serra [a], Guillaume Bourdon [a], Anthony Estienne [a], Mathias Fréville [a], Christelle Ramé [a], Claire Chevaleyre [a], Philippe Didier [b], Marine Chahnamian [b], Patrice Ganier [b], Florine Pinault [b], Pascal Froment [a], Joëlle Dupont [a,*]

[a] CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, F-37380 Nouzilly, France
[b] INRAE - Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT 1295, F-37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Rooster
Chicken
Sperm
Steroidogenesis
Triazole
CAR
AHR

ABSTRACT

Since several decades, we observe the decline of various bird populations that could be partly linked to the agricultural intensification and the use of large amount of pesticides. Even if triazoles compounds are the most widely used fungicides, their effects on the reproductive parameters in birds are not clearly known. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of 8 triazoles compounds alone (propiconazole (PP, from 0 to 10 μM), prothioconazole (PT), epoxiconazole (Epox), tetraconazole (TT), tebuconazole (TB), difenoconazole (Dif), cyproconazole (Cypro), metconazole (MC) (from 0 to 1 mM)) on the male chicken reproductive functions by using testis explants, primary Sertoli cells and sperm samples. In testis, all triazoles at the higher concentrations for 48 h inhibited lactate and testosterone secretion mostly in association with reduced expression of *HSD3B* and/or *STAR* mRNA levels. These data were also associated with increased expression of the nuclear receptors *Aryl Hydrocarbon Receptor* (*AHR*) and *Constitutive Androstane Receptor* (*CAR*) mRNA levels in testis and for all triazoles except for PP a reduction in Sertoli cell viability. When focusing on the sperm parameters, we demonstrated that most of the triazoles (MC, Epox, Dif, TB, TT and Cypro) at 0.1 or 1 mM for either 2, 12 or 24 min of exposure decreased sperm motility and velocity and increased the percentage of spermatozoa abnormal morphology. At the opposite, PP increased sperm motility in a dose dependent manner after 2 min of exposure whereas no significant effect was observed in response to PT whatever the dose and the time of exposure. Moreover, these effects were associated with an increase in the production of reactive oxygen species in spermatozoa. Taken together, most of the triazoles compounds impair testis steroidogenesis and semen parameters potentially through an increase in *AHR* and *CAR* expression and in oxidative stress, respectively.
Data Availability Statement: All the data will be available.

Abbreviations: AHR, aryl hydrocarbon receptor; CAR, constitutive androstane receptor; CASA, computer-assisted sperm assessment; Cypro, cyproconazole; CYP19A1, cytochrome P450 Family 19 subfamily A member 1; CYP51, ergosterol/sterol14(-demethylase); Dif, difenoconazole; DMR, distal Mid-piece Reflex; E2, estradiol; ED, endocrine disruptor; EEF1-α, eukaryotic translatation elongation factor 1 alpha 1; ER, estrogen receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; H295R, human adrenocortical carcinoma cell line; H2O2, ROS hydrogen peroxide; hCG, human chorionic gonadotropin; HSD3B, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase; IVOS, integrated Visual Optical System; JEG-3, human choriocarcinoma JEG-3 cells; MC, metconazole; Pg, progesterone; PP, propiconazole; PT, prothioconazole; ROS, reactive oxigen species; StAR, Steroidogenic acute regulatory; TB, tebuconazole; TT, tetraconazole; VAP, average path velocity, in μm/s; VCL, curvilinear velocity, in μm/s; VSL, straight line velocity in μm/s.

☆ In the present study, we have shown for the first time that exposure to triazoles compounds reduced testosterone production by chicken testis explants and this was associated not only with an inhibition of gene expression of some key components of the steroidogenesis such as HSD3B and STAR but also with an increase of two nuclear receptors expression, AHR and CAR. Moreover, we observed that these fungicides were also able to modify some sperm parameters including motility, velocity and morphology that were associated to an increase of the Reactive Oxygen Species within the spermatozoa.

* Correspondence to: INRAE UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly, France.
E-mail address: joelle.dupont@inrae.fr (J. Dupont).

https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.03.005

Available online 21 March 2023
2214-7500/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Broiler chickens are the main consumed meat in the world [5]. However the intensive use of pesticides these last years increased the possible contamination of wheat diet used for birds [50,61]. Moreover, the wild birds population decline has been linked to agricultural intensification, and the use of pesticides such as herbicides, insecticides and fungicides [19,22,46,52]. In previous studies, we have shown that a chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide alters female and male fertility of broiler chicken by increasing the early embryo mortality [17], and by decreasing the sperm motility in association with metabolic disorders in the progeny [61]. Furthermore, we observed that these negative effects were associated to ceca microbiota disturbances [21]. These data confirm the need to study the impact of other pesticides such as triazoles on the fertility of birds. Moreover, many data in the literature illustrated the environmental effects of the pesticides, but the effects of the triazoles have received less attention even if their persistence in soil is important [59] and they could be found in seeds [50].

Triazoles are the main components of some fungicides used in conventional agriculture. Their antifungal activity enables the disturbance of the cell membrane assembly of fungi and yeast by blocking the synthesis of the ergosterol/sterol14(-demethylase)/CYP51, an essential membrane component. However, CYP51 is also found in mammalian and avian species for the synthesis of cholesterol, so fungicides containing triazole are considered as endocrine disruptors (ED) [40,41]. Triazoles compounds such as propiconazole (PP), metconazole (MC), epoxiconazole (Epox), prothioconazole (PT), difenoconazole (Dif), tebuconazole (TB), tetraconazole (TT) and cyproconazole (Cypro) analysed in the present study are able to disturb various physiological processes including reproductive function when used alone or in mixture *in vitro* and *in vivo* in mammals. They have been found in the environment at around 295 μM[1] in wheat seed for Dif [45], 5 nM[2] in German land water for TB [6], 54 nM[3] in enible snails for TT [9], 0.27[4] μM for Cypro in table grapes, 0.15 μM[5] in leek for Epox [14], 3.75 nM[6] of MC in the mean dietary exposure of the general population [18], 1 μM[7] of PP in broccoli [14] and 0.58 nM[8] in the estimated daily intake in Australia for PT [1]. In Reif et al.'s study [56], they analysed the endocrine profile of environmental chemicals using the ToxCast data, including Cypro, PP, TT and Dif and found profile for estrogen receptor, androgen receptor and receptors binding to toxics ligands such as aryl hydrocarbon receptor (AHR) and constitutive androstane receptor (CAR). Dietary exposure to Epox altered testis histology and sperm parameters in Japanese quail [24] and reduced *in vitro* progesterone (Pg) secretion by human adrenocortical carcinoma cell line H295R [35]. Similarly, dietary exposure to TB decreased plasma estradiol secretion (E2) and delayed the laying onset in the red-legged partridge [19]. The TB [36] and Cypro [57] compounds reduced the *in vitro* secretion of Pg by human choriocarcinoma JEG-3 cells. Dietary exposure to Dif decreased the egg size and the number of fertile eggs in red-legged partridges [45]. Moreover, Dif inhibited the aromatase expression in H295R Cells [60], increased the reactive oxygen species (ROS) levels [67] and it exhibited agonist effects with ERα [67] like Cypro [69] in HepG2 hepatocytes. PT and PP compounds reduced the activation of the estrogen receptor (ER) in JEG-3 [36] and H295R cells [35,36,60], respectively. Concerning TT and MC compounds, very few studies analysed their effects on animal cells. Wang et al. observed a low toxicity for TT alone but exhibited an higher toxicity in combination with pyrethroids such as cypermethrin in honey bees [66,68]. Metconazole treatment reduced *in vitro* testosterone secretion by isolated rat Leydig cells [8].

At the molecular levels, it has been showed that the toxicity of several triazoles involves different nuclear receptor such as the Constitutive Androstane Receptor (CAR) [29,38] and the Aryl hydrocarbon Receptor (AHR) [39]. This has been demonstrated mainly in liver but never in gonads. Thus, very few studies investigated the effect of triazoles on male chicken reproductive parameters and even fewer at the molecular level. Consequently, the aim of our study was to investigate the dose effect of eight triazoles (PP, MC, Epox, PT, Dif, TB, TT and Cypro) alone on some testicular functions (testosterone and lactate production) by using explants, cytotoxic effect by using primary Sertoli cells and sperm parameters (motility and velocity) in chicken. Furthermore, we evaluated the consequences of triazoles exposure on the testicular expression of *AHR* and *CAR* and ROS production in spermatozoa.

2. Material and methods

2.1. Ethical issues

All experimental procedures were performed in accordance with the French National Guidelines for the care and use of animals for research purposes (certificate of authorization to experiment on living animals APAFIS number 21549–2019071809504554v2), Ministry of Agriculture and Fish Products, and a favourable notice of ethics committee of Val de Loire N◦19.

2.2. Animals

All animals (chicks and roosters) (ROSS 308 breed from Boye Accouvage La Villonniere 79310 La Boissière en Gatine, France) were reared at "Pôle Expérimental Avicole de Tours" (INRAE, Nouzilly, France) according to the traditional conditions of breeding. They were killed by electrical stunning and bled out as recommended by the ethical committee.

To analyze the *in vitro* effects of triazoles compounds on testosterone production, 192 5-weeks-old male chickens were used to perform testes explants. To investigate the cytotoxicity of triazoles compounds, twelve 5 weeks-old male chickens were used to perform primary Sertoli cell cultures. Testes were collected after slaughtering and kept in a cold saline buffer during the dissection. Twenty-six 24-week-old roosters were used to study the effect of triazoles compounds on sperm motility. The roosters were rationed with 120 g of food per day. The composition of the diet is showed in the Table 1 in supplemental data. The design of the experiment is illustrated in Fig. 1.

2.3. Triazoles used

Tebuconazole (reference: 112281–77–3), Epoxiconazole (reference:

[1] We assumed that 1 kg = 1 L so 120 mg/kg = 120 mg/L, Dif Molar mass = 406.26 g/mol, so we did (120 *10^−3) g/L /406.26 g/mol= 295 * 10^− 6 mol/L= 295 μM

[2] 1.56 * 10^− 6 g/L in water and TB Molar mass= 307.82 g/mol so we did (1.56 *10^−6) g/L/307.82 g/mol= 5.068 * 10^− 9 M = 5 nM

[3] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.02 mg/kg = 0.02 mg/L, TT Molar mass = 372.15 g/mol, so we did (0.02 *10^−3) g/L /372.15 g/mol= 5.37 * 10^− 8 mol/L= 54 nM

[4] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.08 mg/kg = 0.08 mg/L, Cypro Molar mass = 291.78 g/mol, so we did (0.08 *10^−3) g/L /291.78 g/mol= 2.742 * 10^− 7 mol/L= 0.27 μM

[5] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.05 mg/kg = 0.05 mg/L, Epox Molar mass = 329.76 g/mol, so we did (0.05 *10^−3) g/L /329.76 g/mol= 1.51 * 10^− 7 mol/L= 0.15 μM

[6] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.0012 mg/kg = 0.0012 mg/L, MC Molar mass = 319.83 g/mol, so we did (0.0012 *10^−3) g/L /319.83 g/mol= 3.75 * 10 * −9 mol/L= 3.75 nM

[7] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.35 mg/kg = 0.35 mg/L, PP Molar mass = 342.22 g/mol, so we did (0.35 *10^−3) g/L /342.22 g/mol= 1 * 10^− 6 mol/L= 1 μM

[8] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.000002 mg/kg = 0.000002 mg/L, PT Molar mass = 344.26 g/mol, so we did (0.000002 *10^−3) g/L /344.26 g/mol= 5.81 * 10^− 11 mol/L= 0.58 nM

Table 1
Relative mRNA expressions of *STAR*, *HSD3B* and *CYP19A1* in chicken testis explants after exposure to triazoles (propiconazole (PP), metconazole (MC), epoxiconazole (Epox), prothioconazole (PT), difenoconazole (Dif), tebuconazole (TB), tetraconazole (TT) and cyproconazole (Cypro)) for 48h. For each triazole compound, each triazole concentration was compared to the control (without triazole). Four samples per concentration for each triazole and each culture were analysed and a total of 6 independent cultures was performed.

Gene	*Triazoles*	0 μM	0.1 μM	1 μM	*P-value*
	PP	0.0161 ±0.0067	0.0296 ±0.0117	0.0040 ±0.0010	0.016
		0 μM	100 μM	1 mM	
	PT	0.0260 ±0.0034	0.0147 ±0.0019	**0.0031 ±0.0007****	**<0.000**
		0 μM	100 μM	1 mM	
	MC	0.0076 ±0.0017	0.0077 ±0.0015	0.0044 ±0.0007	0.131
		0 μM	10 μM	100 μM	
StAR	Epox	0.0175 ±0.0050	0.0207 ±0.0035	**0.0025 ±0.0004***	*0.003*
		0 μM	100 μM	1 mM	
	Dif	0.0352 ±0.0050	0.0523 ±0.0067	*0.0045 ±0.0013*	*0.001*
		0 μM	10 μM	100 μM	
	TB	0.0160 ±0.0058	0.0145 ±0.0058	0.0046 ±0.0007	0.231
		0 μM	100 μM	1 mM	
	TT	0.0213 ±0.0034	0.0336 ±0.0055	*0.0087 ±0.0016*	*0.002*
		0 μM	100 μM	1 mM	
	Cypro	0.0630 ±0.0101	**0.0268 ±0.0029****	**0.0158 ±0.0061****	**0.000**
		0 μM	*0.1 μM*	*1 μM*	
	PP	0.0046 ±0.0010	0.0064 ±0.0026	0.0063 ±0.0017	0.708
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	PT	0.0084 ±0.0015	0.0082 ±0.0023	0.0072 ±0.0022	0.890
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	MC	0.0043 ±0.0014	0.0039 ±0.0009	0.0056 ±0.0015	0.613
		0 μM	*10 μM*	*100 μM*	
H3SD3B	Epox	0.0089 ±0.0021	0.0058 ±0.0016	0.0080 ±0.0016	0.930
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	Dif	0.0127 ±0.0037	0.0161 ±0.0033	0.0087 ±0.0023	0.221
		0 μM	*10 μM*	*100 μM*	
	TB	0.0059 ±0.0022	0.0038 ±0.0016	0.0056 ±0.0023	0.698
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	TT	0.0122 ±0.0021	0.0070 ±0.0014	**0.0046 ±0.00014****	**0.006**
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	Cypro	0.0222 ±0.0057	0.0198 ±0.0049	0.0239 ±0.0097	0.906
		0 μM	*0.1 μM*	*1 μM*	
	PP	0.0975 ±0.0349	0.0440 ±0.0073	**0.0193 ±0.0076***	**0.042**
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	PT	0.0533 ±0.0096	0.0375 ±0.0098	**0.0010 ±0.00026****	**0.002**
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	MC	0.0166 ±0.0063	0.0297 ±0.0084	0.0073 ±0.0014	0.025
		0 μM	*10 μM*	*100 μM*	
CYP19A1	Epox	0.0502 ±0.0164	0.0428 ±0.0128	**0.0031 ±0.00061****	**0.003**
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	Dif	0.0909 ±0.0323	0.0710 ±0.0241	**0.0025 ±0.00055****	**0.003**
		0 μM	*10 μM*	*100 μM*	
	TB	0.0787 ±0.0383	0.0194 ±0.0099	**0.0040 ±0.0009***	**0.021**
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	TT	0.0316 ±0.0107	0.0267 ±0.0059	**0.0053 ±0.0006****	**0.003**
		0 μM	*100 μM*	*1 mM*	
	Cypro	0.1400 ±0.0524	0.0639 ±0.0230	**0.0082 ±0.0034****	**0.010**

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; ***$p<0.001$

PESTANAL™ 133855–98–8,), Tetraconazole (reference: PESTANAL™ 112281–77–3), Cyproconazole (reference: PESTANAL™ 94361–06–5), Difenoconazole (reference: PESTANAL™ 119446–68–3), Metconazole (reference: PESTANAL™ 125116–23–6), Propiconazole (reference: PESTANAL™ 60207–90–1) and Prothioconazole (reference: PESTANAL® 178928–70–6) were purchased from Sigma-Aldrich and diluted with methanol 100%.

2.4. Testis explants in vitro culture

Testes from 192 5-week-old males chicken (32 animals for one culture) have been collected by dissection after slaughtering and kept in PBS 1X with 2% of 100 UI/mL of penicillin with 100 mg/mL of streptomycin (Eurobio, Les Ulis, France) for about 30 min at room temperature before use. For each culture, 64 testes have been pooled together and have been finely cut in small pieces of 1 mm of diameter. The equivalent of 1 testis was put in culture in six wells of one 48 wells culture plate. Testis explants were exposed to eight triazoles at various concentrations (0, 0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM for PP or 0, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM and 1 mM for Epox, MC, TB, TT, PT, Cypro and Dif) for 48 h at 37 °C in the presence or absence of human Chorionic Gonadotropin (hCG) (2 UI/mL, Sigma-Aldrich, l′Isle d′Abeau Chesnes) in DMEM culture medium (Sigma-Aldrich, l′Isle d′Abeau Chesnes) without serum. At the end of triazoles exposure, the conditioned culture medium was recovered and kept at − 20 °C before use for testosterone assays. Testes explants were kept at − 80 °C before their use for RT-qPCR experiments. Six independent cultures have been performed.

2.5. Isolation and primary culture of chicken Sertoli cells

Testes from 4 weeks-old roosters were decapsulated, slightly minced, and incubated for 15 min at 37 °C with DNase (20 μg/mL, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and type Ia collagenase (0.4 mg/mL; Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Cells were centrifuged to remove collagenase and were allowed to sediment by gravity to separate seminiferous tubules, in the pellet, and Leydig cells, in the supernatant. The pelleted seminiferous tubules containing sertoli cells were resuspended and digested by 2 collagenase baths (0.6 mg/mL and 0.8 mg/mL for 15 min at 37 °C each digestion) added with DNase (20 μg/mL) and followed by 0.1% hyaluronidase treatment (Sigma Aldrich) for 10 min at 37 °C to eliminate peritubular cells. The sertoli cells were counted and seeded to appropriate density in HEPES-buffered F12/DMEM supplemented with antibiotics and 5% fetal calf serum (FCS) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air. Ninety-six-well plates were used for cell viability/cytotoxicity analysis determined by the Cell Counting Kit-8 (CCK8) assay (5×10^3 cells/well).

2.6. Cell viability

Chicken primary Sertoli cells seeded in 96 wells were exposed to eight triazoles individually at various concentrations (0, 0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM for PP or 0, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM and 1 mM for Epox, MC, TB, TT, PT, Cypro and Dif) at 37 °C for 24 h. Cell counting-kit 8 (CCK-8; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) was used for the cell viability assay. Ten microliters were added per well and

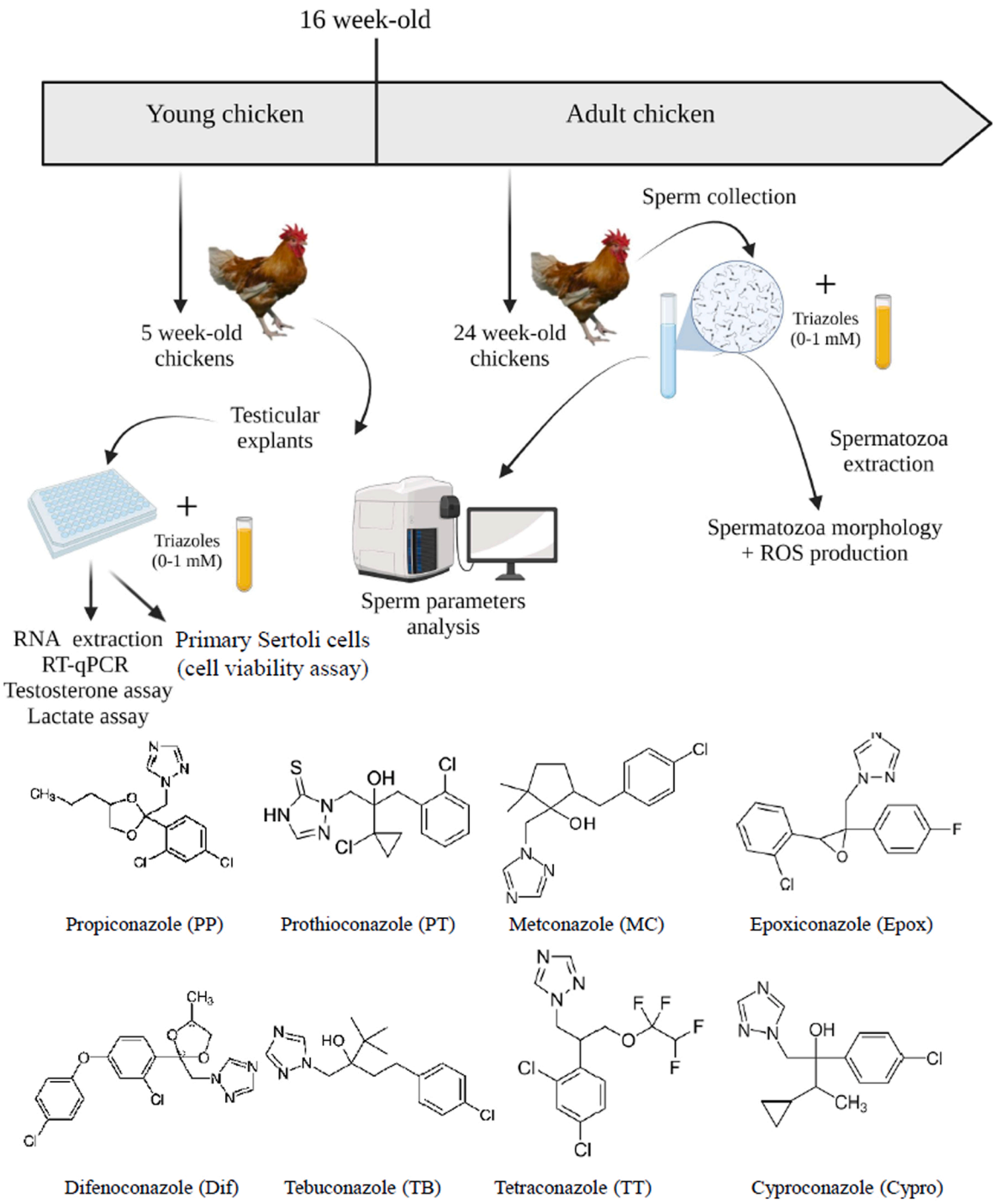


Fig. 1. Experimental design. The study was designed in two parts. The first part focused on the young animals. A total of 192 5-week-old chickens was sacrificed and testes were collected to perform testis explants in order to analyse the *in vitro* effects of triazoles on the testosterone and lactate secretion and a total of 12 5-week-old chickens were used to analyse the effects of triazoles on the viability of Sertoli cells. After exposure, we also determined the mRNA expression of different genes involved in the steroidogenesis and genes of two nuclear receptors potentially regulated by triazoles compounds. In rooster (adult chicken, n = 26), we collected sperm by manual stimulation and exposed *in vitro* spermatozoa to triazoles to analyse sperm motility, velocity and abnormal morphology but also the content of Reactive Oxygen Species (ROS) in spermatozoa.

plates were incubated for 3 h at 37 °C, CO2 5% before optic density reading at 450 nm wavelength.

2.7. Testosterone and lactate assays

Testosterone and lactate concentrations in the conditioned culture media of chicken testis explants were determined following the manufacturer instructions using commercial ELISA assays from Cayman Chemicals (Montigny-le-Bretonneux, Catalog Number 582701), and Lactate Assay Kit from Sigma Aldrich (l'Isle d'Abeau Chesnes, France, Catalog Number MAK064,), respectively. For testosterone and lactate, the sensitivity of the assay was 6 pg/mL and 1 ng/mL, respectively. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) for each assay averaged < 10%.

2.8. Measurement of the gene expression in testis explants

Total RNA from testis explants (n = 4 per concentration of each triazole for one culture and six independent cultures were performed) exposed to triazoles in response to hCG for 48 h (0 μM, 0.1 μM, 1 μM for PP or 0 μM, 10 μM, 100 μM for Epox and TB or 0 μM, 100 μM and 1 mM for TT, Dif, Cypro, MC and PT) was extracted with QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen Sciences, Maryland) following manufacturer recommendations. The cDNA was obtained by reverse transcription (RT) of total RNA (2 μg). Briefly, a mix of RT buffer (2 M), deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP; 0.5 mM each), 15 μg/μL of oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV) was prepared and mixed with samples before an incubation for 1 h at 37 °C. The efficiency of primers was tested before the qPCR as explained in Estienne et al [16]. The primers used are for reference genes: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (F: 5′-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3′; R: 5′-TGATTTTGGAGGATCTCGC-3′); *Eukaryotic translatation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1-α)* (F: 5′-AGCAGACTTTGTGACCTTGCC-3′; R: 5′-TCACATGAGACAGACGGTTGC-3′); *BACTIN* (F: 5′-ACGGAACCACAG TTTATCATC-3′; R: 5- GTCCCAGTCTTCAACTATACC-3′) and target genes: *3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3B)* (F: 5′- GGTTT GTTTAGCACTGAGGCAAGAG-3′; R: 5′- TCCCTGCTGAAGTCTTT GTCC-3′); *Steroidogenic acute regulatory (STAR)* (F: 5-CCAGCG TCAAAGAGGTGAA-3′; R: 5- GAGCACCGAACACTCACAAA-3′); *Cytochrome P450 Family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1)* (F: 5′-AATGCCCTTCATTCCCAGGT-3′; R: 5′-GGCATCACCTGACAACAGGA-3′); *Aryl hydrocarbon receptor (AHR)* (R: 5′-GAATGTTCCCAA ACCACCTG-3′; F: 5′CTGCTGCAAACAACCGAGAA-3′), *Constitutive androstane receptor (CAR)* (R: 5′-AATTCGCCAAGGAGATCCCG-3′; F: 5′-GTCTCCTCGTTGAACACGGT-3′).

The cDNAs were diluted 5-fold and the samples were duplicated on the same plate and the following PCR procedure was used. After an incubation of 2 min at 50 °C and a denaturation step of 10 min at 95 °C, samples were subjected to 40 cycles (30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C). The levels of expression of messenger RNA of target genes were standardized to the geometric mean of three reference genes (*EEF1a, GAPDH and BACTIN*). For each target gene (*HSD3B*, *CYP19A1*, *STAR, AHR, and CAR*) mRNA expression was calculated according to primer efficiency (E) and quantification cycle (Cq), where expression $= E^{-Cq}$. Then, the relative expression of the target gene to the geometric mean of reference genes was analyzed.

2.9. Evaluation of sperm parameters using IVOS (Integrated Visual Optical System)

Semen from 26 individual adult roosters (24-week-old) has been collected and exposed with.

the eight triazoles individually at different concentrations (0 μM, 0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM and 10 μM for PP or 0 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM and 1 mM for Epox, TB, TT, Dif, Cypro, MC and PT) for 2, 12 and 24 min at 37 °C. Computer-assisted sperm assessment (CASA) was performed by using a Hamilton-Thorne motility analyzer (Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) to determine total motility and kinematic characteristics of sperm movement. For each sample, sperm rapid and progressive velocity parameters were measured as indicators of sperm movement. The IVOS settings and protocol of analysis used were similar to [16] (E[16]). Motility parameters were evaluated as follows: Percentage of motile sperm, VCL (curvilinear velocity, in μm/s), VSL (straight line velocity in μm/s), and VAP (average path velocity, in μm/s). Moreover, we also analysed the percentage of spermatozoa with abnormal morphology including percentage of bent tail, coiled tail and Distal Mid-piece Reflex (DMR), the most common abnormality of the sperm tail. Parameter means were calculated by the average of summary values obtained from each sample. For each sample, 1000 spermatozoa were analyzed at 37 °C in 100 μm standard counting chambers (Makler® Counting Chamber, Clinisciences, Nanterre, France). For each triazole compound, the experiment was repeated 4 times for all the concentrations.

2.10. Measurement of Reactive Oxygen Species (ROS) in chicken spermatozoa

The content of the ROS hydrogen peroxide (H2O2) in chicken spermatozoa exposed with the eight triazoles at different concentrations (0 μM, 0.1 μM, 1 μM and 10 μM for PP or 0 μM, 10 μM, 100 μM and 1 mM for Epox, TB, TT, Dif, Cypro, MC and PT)) was measured by Ros-Glo H2O2 assay kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). About two millions of spermatozoa previously exposed to each triazole were incubated with H2O2 substrate solution during 4 h. H2O2 present in samples degrades the H2O2 substrate into Luciferin Precursor and produces luminescence which is measured with a luminometer Luminoskan Ascent (Thermo-Fisher, USA). Luminescence is correlated with the concentration of H2O2 and the ROS activity as detailed in the Ros-Glo H2O2 assay kit. The ratio luminescence measured/protein content of spermatozoa is represented for each concentration of each triazole compound. The experiment was repeated 4 times for all the concentrations and for each triazole.

2.11. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6® (San Diego, California USA). Data are presented as mean ± SEM. The means of independent and random replicates were used. Bartlett's test was run to test the homogeneity of variance, and normal distribution was verified by the Shapiro-Wilk test. For parametric values, unpaired test of Student or one-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparison test were applied as appropriate. Non-parametric values were analysed through Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test. Means were considered different at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of the triazoles exposure on chicken Sertoli cells viability

We firstly investigated the cytotoxicity of each triazole in primary chicken Sertoli cells by using the CCK8 assay. The results are shown on supplemental data 1. No significant effect was observed after the exposure to PP, MC, Dif and TT (Supplemental data 1A, 1 C, 1E and 1 G) but a tendency to decrease was observed after 1 mM of MC ($p = 0.1$), Dif ($p = 0.1$) and TT ($p = 0.09$) (Supplemental data 1C, 1E and 1G). At 1 mM of PT ($p < 0.0001$), TB ($p < 0.0001$) and Cypro ($p < 0.05$), a significant decrease of the cell viability was observed (Supplemental data 1B, 1F and 1H). An increase of the cell viability was observed after 0.1 μM ($p < 0.01$), 1 μM ($p < 0.01$) and 10 μM ($p < 0.05$) of Epox and a decrease after 1 mM of Epox ($p < 0.01$) (Supplemental data 1D).

3.2. Effect of the triazoles exposure in basal and hCG-stimulated testosterone secretion in chicken testis explants

We studied the dose effect of 8 triazoles on the production of testosterone by chicken testis explants in the absence or in the presence of hCG. As shown in Fig. 2, at basal state (without hCG), the exposure to PP from 1 μM; Epox, TB and TT from 100 μM and MC from 1 mM reduced the secretion of testosterone ($p < 0.05$) (Fig. 2A, D, F, G and C). No effect was observed after the exposure to PT, Dif and Cypro ($p < 0.05$) (Fig. 2B, E and H). In the presence of hCG within the medium, the exposure to PP from 1 μM and Epox and TB from 100 μM decreased the level of testosterone secreted ($p < 0.05$) (Fig. 2A, D and F) and PT, MC, Dif, TT and Cypro reduced it from 1 mM ($p < 0.05$) (Fig. 2B, C, E, G and H).

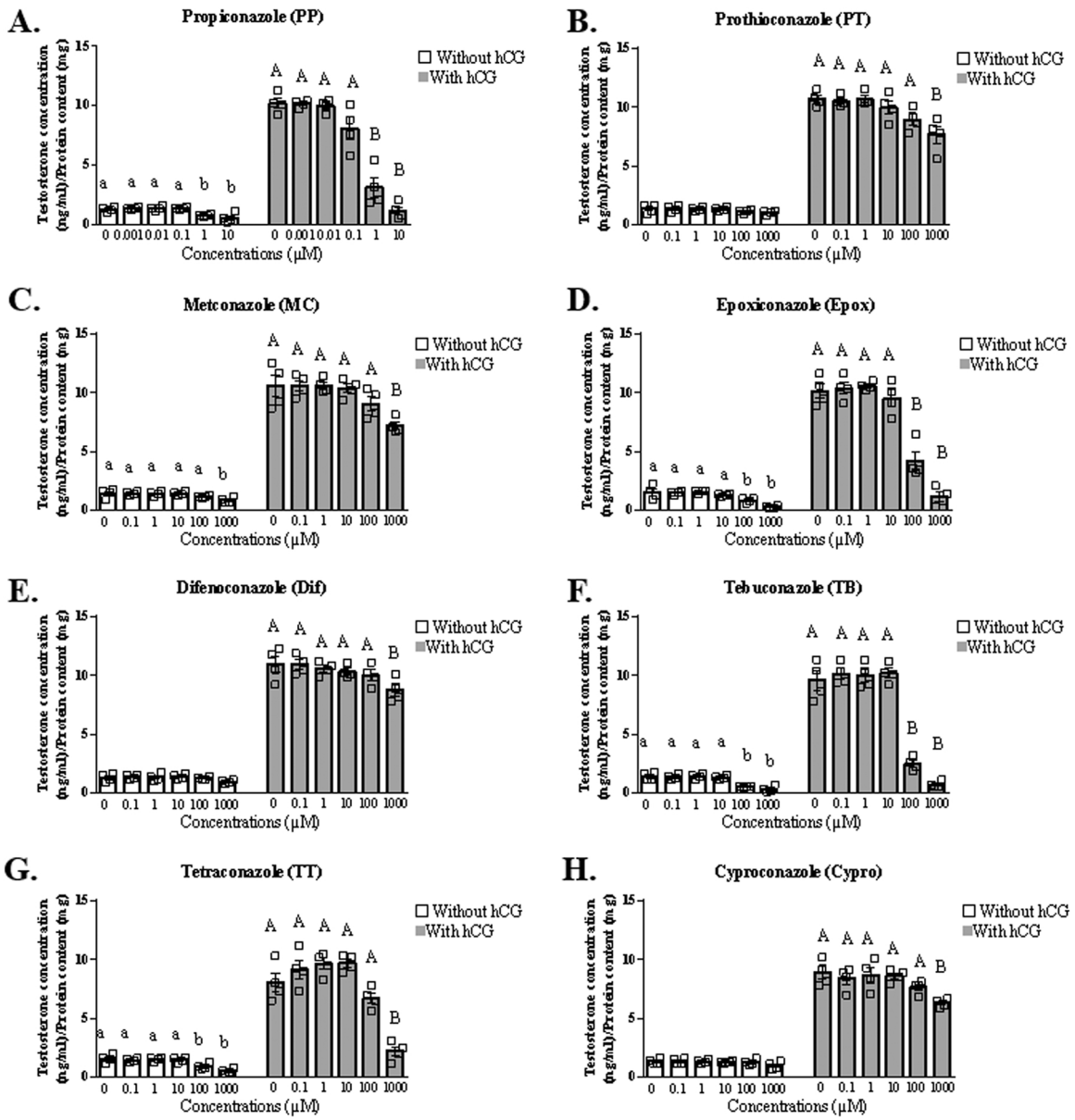


Fig. 2. Effect of triazoles exposure on basal and hCG-stimulated testosterone production by *in vitro* chicken testis explants. Effect of eight triazoles (propiconazole (PP, A), prothioconazole (PT, B), metconazole (MC, C), epoxiconazole (Epox, D), difenoconazole (Dif, E), tebuconazole (TB, F), tetraconazole (TT, G) and cyproconazole (Cypro, H) exposure at different concentrations (0.001 µM to 1 mM) for 48 h on *in vitro* testosterone production by chicken testis explants with or without the addition of hCG (2 UI/mL). Conditioned culture media were collected, and testosterone concentrations measured by ELISA assay as described in the materials and methods. Data are means ± SEM of 4 independent experiments. Different lower case and upper case letters indicate significant differences in triazole concentration compared to control with and without hCG, respectively. * $p < 0.05$.

We then investigated whether this inhibitory effect of triazoles on the production testosterone induced by hCG resulted from the lower mRNA expression of the two key enzymes in steroidogenesis (*HSD3B* and *CYP19A1*) and of *STAR*, an important cholesterol carrier. As shown in Table 1, Epox ($p < 0.05$), and Cypro ($p < 0.01$) decreased *STAR* expression from 100 µM and PT ($p < 0.001$) decreased it from 1 mM. No difference was observed in *STAR* expression for PP, MC and TB. Tendency of decrease was observed for Dif and TT at 1 mM ($p = 0.06$) (Table 1). TT decreased the expression of *HSD3B* at 1 mM ($p < 0.01$) and no significant difference was detected for the other triazoles. PP inhibited the expression of *CYP19A1* at 1 µM ($p < 0.05$), Epox ($p < 0.01$) and TB ($p < 0.05$) also from 100 µM and Dif, TT and Cypro it decreased at 1 mM ($p < 0.01$) (Table 1). No difference was observed after the exposure to MC.

3.3. Effect of the triazoles exposure on the lactate production in response to hCG in chicken testis explants

As shown in Fig. 3, the highest concentration tested for each studied triazole significantly decreased the lactate production by testis explants after 48 h of exposure ($p < 0.0001$, Fig. 3A to H). However, this inhibitory effect was already observed at 1 µM for PP ($p < 0.0001$) and at 100 µM for MC ($p < 0.0001$), Epox ($p < 0.001$) and TB ($p < 0.0001$) (Fig. 3A, C, D and F).

3.4. Effect of the triazoles exposure on the AHR and CAR mRNA expression in response to hCG in chicken testis explants

As shown in Fig. 4, *AHR* mRNA expression was enhanced by PP at 1 µM ($p < 0.001$) (Fig. 4A), Epox ($p < 0.05$) and TB ($p < 0.01$) at

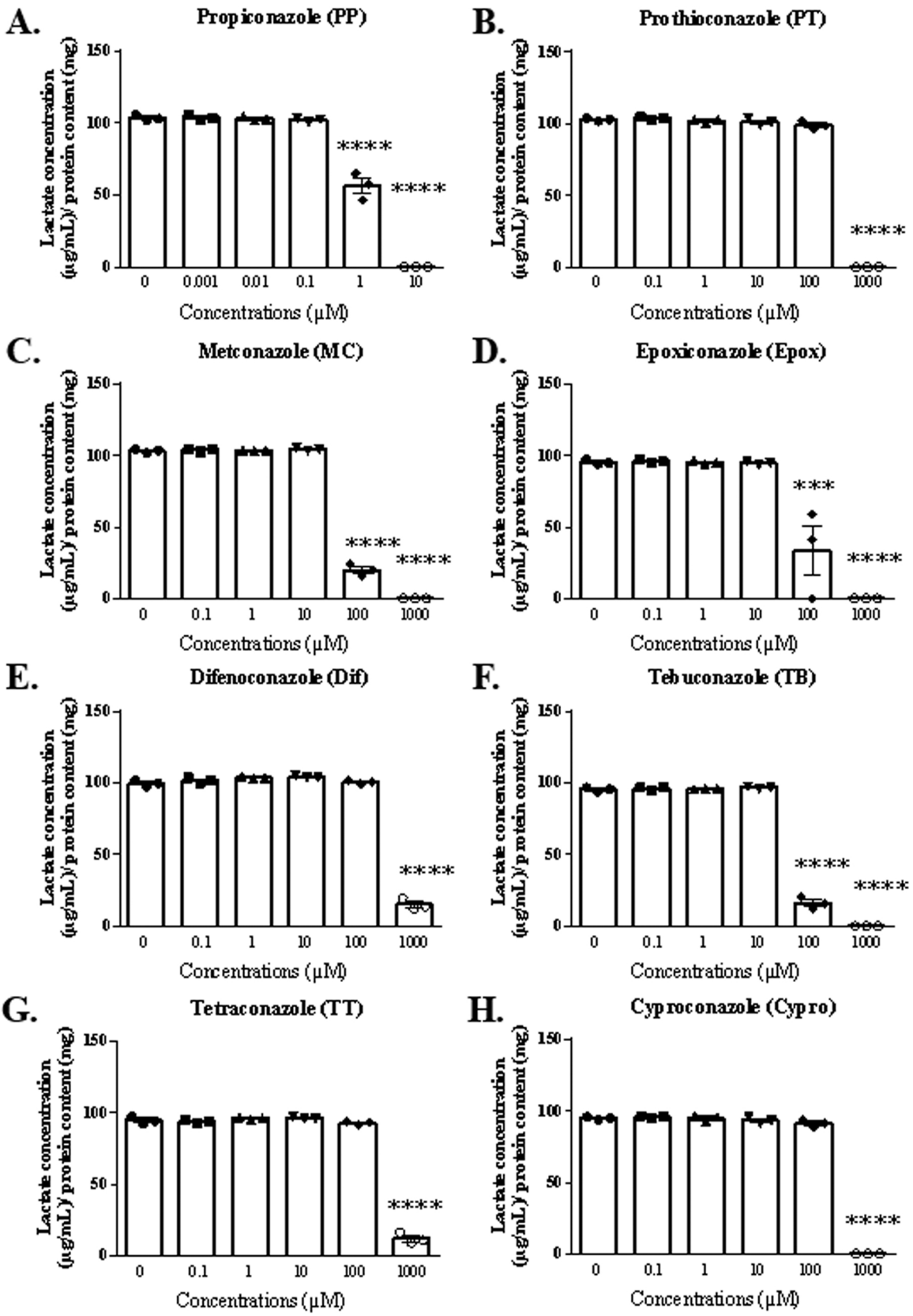


Fig. 3. Effect of triazoles exposure on hCG-stimulated lactate production by *in vitro* chicken testis explants. Effect of eight triazoles (propiconazole (PP, A), prothioconazole (PT, B), metconazole (MC, C), epoxiconazole (Epox, D), difenoconazole (Dif, E), tebuconazole (TB, F), tetraconazole (TT, G) and cyproconazole (Cypro, H) exposure at different concentrations (0.001 µM to 1 mM) for 48 h on *in vitro* lactate production by chicken testis explants with the addition of hCG (2 UI/mL). Conditioned culture media were collected, and lactate concentrations measured as described in the materials and methods. Data are means ± SEM of 3 independent experiments. For each triazole compound, each triazole concentration was compared to the control (without triazole) * ** $p < 0.001$ and * ** * $p < 0.0001$.

100 μM (Fig. 4D and F) and PT ($p < 0.01$), MC ($p < 0.01$), Dif ($p < 0.001$), TT ($p < 0.001$) and Cypro ($p < 0.01$) at 1 mM ($p < 0.05$) (Fig. 4B, C, E, G and H) in testis explants exposed for 48 h. At 100 μM of Dif, the expression of *AHR* tended to increase ($p = 0.0699$) (Fig. 4E). Regarding *CAR*, PP increased its expression at 1 μM ($p < 0.01$) (Fig. 4I), Epox ($p < 0.05$) and TB ($p < 0.01$) at 100 μM (Fig. 4L and N) and PT ($p < 0.001$), MC ($p < 0.001$), Dif ($p < 0.001$), TT ($p < 0.01$) and Cypro ($p < 0.01$) at 1 mM (Fig. 4J, K, M, O and P).

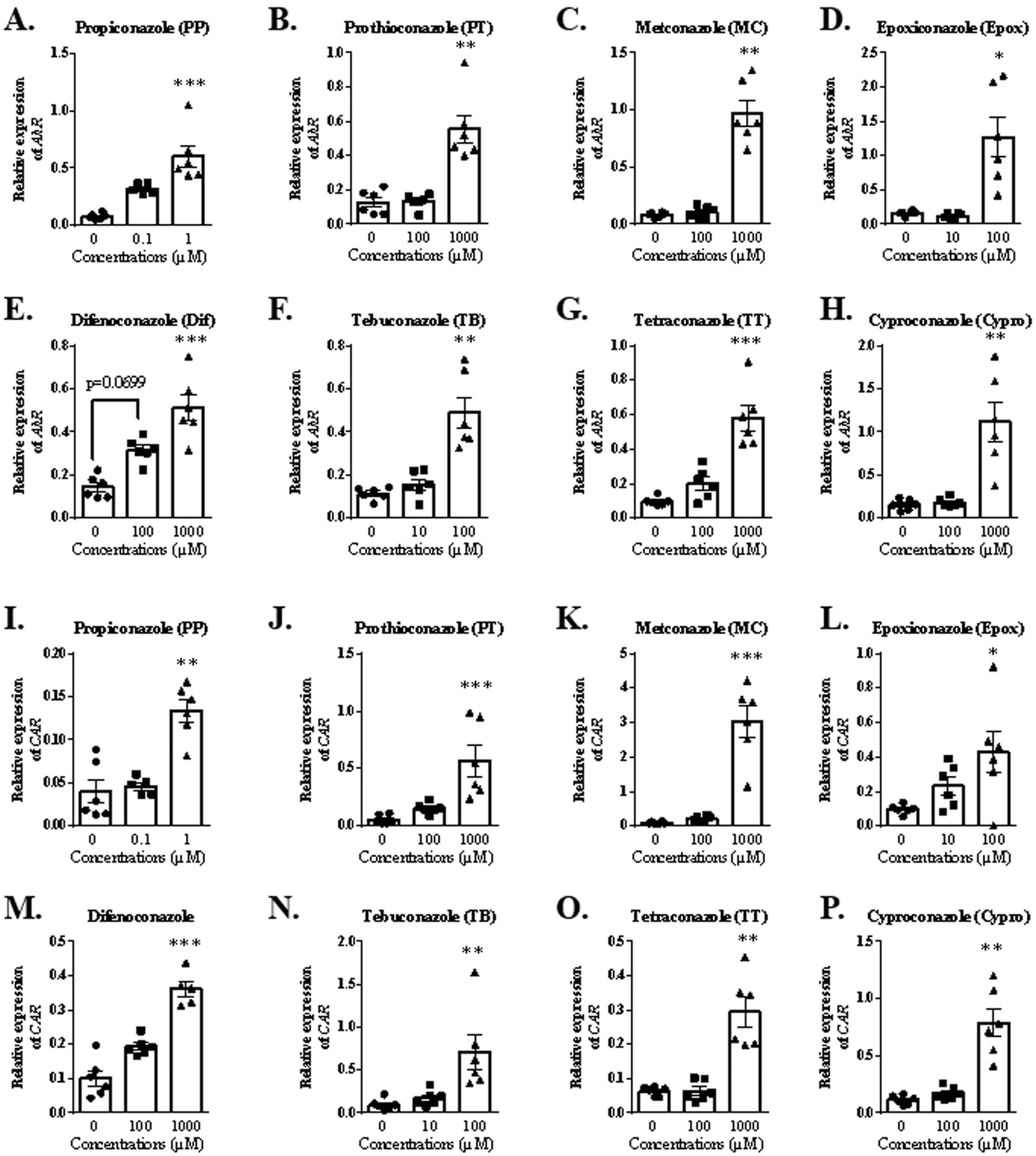


Fig. 4. Effect of triazoles exposure on Aryl hydrocarbon Receptor (AHR) and Constitutive Androstane Receptor gene expression in response to hCG in chicken testis explants. Effect of eight triazoles (propiconazole (PP, A and I), prothioconazole (PT, B and J), metconazole (MC, C and K), epoxiconazole (Epox, D and L), difenoconazole (Dif, E and M), tebuconazole (TB, F and N), tetraconazole (TT, G and O) and cyproconazole (Cypro, H and P) exposure at different concentrations (0.1 μM to 1 mM) for 48 h on *AHR* (A to H) and *CAR* (I to P) mRNA expression in chicken testis explants in presence of hCG (2 UI/mL). Total RNA was extracted from testis explants, and gene expression was measured by RT-qPCR for AHR, and CAR as described in the materials and methods. Data are means ± SEM of 6 independent experiments. For each triazole compound, each triazole concentration was compared to the control (without triazole) $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.

3.5. In vitro effect of the triazoles exposure on the sperm motility in chicken

As shown in Fig. 5A, the *in vitro* exposure to PP increased the spermatozoa motility from 0.1 until 10 μM after 2 min ($p < 0.01$) and decreased it after 12 min from 10 μM ($p < 0.01$). After 2 min of exposure to MC from 1 μM, 12 min from 1 mM and 24 min from 100 μM, the sperm motility was reduced ($p < 0.05$) (Fig. 5C). The exposure to Epox for 2, 12 and 24 min from 100 μM decreased the sperm motility ($p < 0.01$) (Fig. 5D). The motility of sperm was also decreased after 2, 12 and 24 min with 1 mM of Dif ($p < 0.001$) (Fig. 5E) and with 1 mM of Cypro ($p < 0.05$) (Fig. 5H). The exposure to TB (1 mM) for 12 and 24 min decreased the sperm motility ($p < 0.01$) (Fig. 5F). Concerning the TT, the motility of sperm was increased from 0.1 to 10 μM and then decreased at 100 μM after 12 min of exposure and it was reduced at 100 μM and 1 mM ($p < 0.05$) after 24 min of exposure (Fig. 5G). No change of sperm motility was observed after the exposure to PT (Fig. 5B).

3.6. In vitro effect of the triazoles exposure on chicken sperm velocity

Velocity parameters of sperm (VAP (average path velocity, in μm/s),

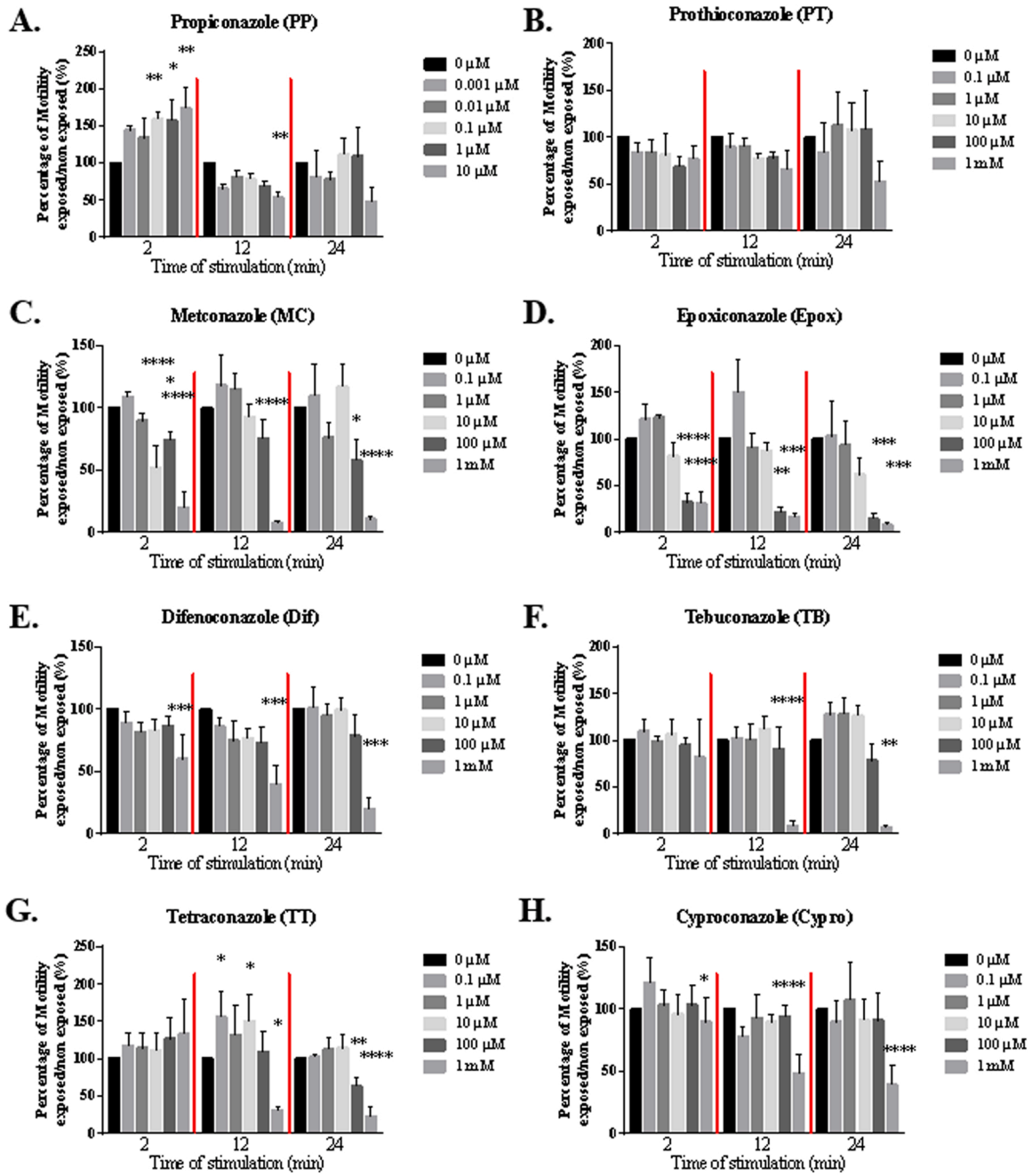


Fig. 5. Effect of triazoles exposure on sperm motility in fresh chicken semen. Effect of eight triazoles (propiconazole (PP, A), prothioconazole (PT, B), metconazole (MC, C), epoxiconazole (Epox, D), difenoconazole (Dif, E), tebuconazole (TB, F), tetraconazole (TT, G) and cyproconazole (Cypro, H) exposure at different concentrations (0.001 μM to 1 mM) for 2, 12 and 24 min of exposure on sperm motility. The percentage of motile sperm was assessed by using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) as described in materials and methods. Data are represented as mean ± SEM ($n = 4$ independent experiments for each triazole). For each triazole compound and each time of exposure, each triazole concentration was compared to the control (without triazole). * $p < 0.05$; * * $p < 0.01$; * ** $p < 0.001$; * *** * $p < 0.0001$.

VCL (curvilinear velocity, in μm/s) and VSL (straightline velocity in μm/s) are represented in the Table 2. The exposure to Dif (1 mM) for 2, 12 and 24 min ($p < 0.01$) and those to TB (1 mM) for 12 min ($p < 0.05$) decreased the VAP. The VLC was reduced by Dif exposure for 2, 12 and 24 min at 1 mM ($p < 0.05$), by TB exposure for 12 min at 1 mM ($p < 0.05$) and TT exposure for 24 min at 1 mM ($p < 0.01$). VSL was decreased by TB and Cypro exposures for 24 min at 1 mM ($p < 0.05$) and TT exposure for 24 min from 100 μM ($p < 0.05$). PT, PP, Epox and MC exposure did not alter the chicken sperm velocity.

3.7. *In vitro effect of triazoles exposure on ROS production in chicken spermatozoa*

PP exposure from 10 μM and PT, Epox, Dif, TB, TT and Cypro exposure at 1 mM increased ROS production in spermatozoa exposed *in vitro* for 24 min ($p < 0.05$) (Fig. 6A, B, D, E, F, G and H). A tendency of increased ROS production was observed after MC exposure at 1 mM for 24 min ($p = 0.053$) (Fig. 6C).

3.8. *In vitro effect of triazoles exposure on the chicken spermatozoa morphology*

Bent tail, coiled tail and distal mid-piece (DMR) percentages after the triazoles exposure are represented in Table 3. The exposure to MC ($p < 0.05$) for 2 min and TT ($p < 0.01$) for 24 min at 1 mM increased the percentage of bent tail. The exposure to MC for 12 min at 1 mM increased the percentage of coiled tail ($p < 0.05$). The exposure to MC and Epox for 2, 12 and 24 min at 1 mM increased the percentage of DMR ($p < 0.05$) whereas the exposure to TB (1 mM) for 12 ($p < 0.01$) and 24 min ($p < 0.0001$) reduced it. No change of morphology was observed after the exposure to Dif, PT, Cypro and PP whatever the time and the concentration (Table 3).

To illustrate all the results on a dose-response curve, Figs. 7 and 8 gather all the experiments in explants (Figs. 7A, C, E, G, 8A, C, E and G) and all the experiments in sperm (7B, 7D, 7 F, 7 H, 8B, 8D, 8 F, 8 H) at each time for one triazole.

4. Discussion

In the present study, we have shown for the first time that exposure to triazoles compounds reduced testosterone production by chicken testis explants and this was associated not only with an inhibition of gene expression of some key components of the steroidogenesis such as *HSD3B* and *STAR* but also with an increase of two nuclear receptors expression, *AHR* and *CAR* (Figs. 7 and 8). We also observed that these fungicides were able to modify some sperm parameters including motility, velocity and morphology that were associated to an increase of the Reactive Oxygen Species within the spermatozoa. In addition, some of triazoles at the higher concentration (1 mM) reduced cell viability of primary Sertoli cells.

4.1. *Cytotoxic effects of triazoles exposure on primary chicken Sertoli cells*

In our present study we observed a tendency or a significant reduction in cell viability of chicken Sertoli cells at 1 mM for all triazoles tested (PT, MC, Epox, Dif, TB, TT and Cypro) except for PP. These data suggest that all the negative effects observed at this concentration on testosterone production by testis explants or lactate production by Sertoli cells could be partly explained by a cytotoxicity effect.

4.2. *Alteration of steroidogenesis and lactate production by triazoles exposure*

All triazoles inhibited either basal and/or hCG-stimulated testosterone secretion from chicken testicular explants. During the pubertal age, spermatogenesis begins and testosterone is secreted by Leydig cells to bind to its androgen receptor (AR) on Sertoli cells to support male germ cell development and survival [64]. It is important to note that, in our study, PP, Epox and TB had the most important inhibitory effect on the testosterone secretion from concentration of 1 μM for PP and 100 μM for Epox and TB. These latter concentrations correspond to $9 * 10^3$ [9] and $1.4 * 10^6$ [10] times the highest concentration found in the food Dutch for PP and Epox, respectively [14] and about 4 times[11] the concentration found in the human hair of workers using TB [55]. It has been already reported that PP, Epox, Cypro and TB reduced the secretion of testosterone in H295R cell line from 10 μM, 3 μM, 10 μM and 0.1 μM, respectively, [35,58]. In the present study, the decrease in testosterone production after Epox exposure could be due to an inhibition of cholesterol carrier, *STAR*. As compared to the literature, an inhibition of *CYP19A1* expression is observed after TB and PP exposure [13,36,60]. This could explain a reduction in oestradiol secretion by testicular cells but we did not investigate this hormone in our study. The reduction in testosterone production could be explained by the decrease of the amount or/and the activity of some steroidogenic enzymes such as CYP11A1, HSD3B and CYP17A1 but the literature is absent or controversial about the effect of triazoles on these enzymes [10,47,58]. In the present study, the decrease in testosterone production observed after 1 mM of Cypro could be partly due to the inhibition of *STAR* expression at 100 μM but also by the cytotoxic effect observed on the viability of Sertoli cells at 1 mM. This latest concentration corresponds to $7.8 * 10^6$ times[12] the highest concentration of Cypro found in the food Dutch [14].

At 1 mM, MC and Dif decreased as well the testosterone secretion which is in good agreement with the literature [11,34,8]. However, according to our data on Sertoli cells viability, these data could be due to a cytotoxic effect. This concentration corresponds to about $2 * 10^6$ times[13] the mean dietary exposure of MC in general population [18], 3 times[14] the concentration of Dif found in wheat seeds [45]. A tendency of a reduced expression of *STAR* could explain the reduction in testosterone production after MC exposure. It is the first time, according to our knowledge that the effect of TT on the steroidogenesis was investigated. At close to the cytotoxic concentration of TT we observed a decrease in testosterone production associated with an inhibition of *HSD3B* expression. This concentration of TT is $18 * 10^3$ times[15] higher than those found in enible snails [9]. The literature is controversial about the impact of PT on the testosterone production. Indeed, acute exposures increase testosterone secretion in the lizard [71] whereas chronic

[9] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.000037 mg/kg= 0.000037 mg/L, we did (0.000037 *10^−3 g/L)/342.22 g/mol= 1.08 * 10^− 10 mol/L = 0.000108 μM. Then we compared to the 1 μM dose, so we did (1 μM/0.000108 μM) = 9249

[10] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.000024 mg/kg= 0.0000247 mg/L, we did (0.000024 *10^−3 g/L)/329.76 g/mol= 7.27 * 10^− 11 mol/L = 7.28 * 10^− 5 μM. Then we compared to the 100 μM dose, so we did (100 μM/7.28 *10^−5 μM) = $1.4 * 10^6$

[11] We assumed that 1 kg = 1 L so 143.1 mg/kg= 143.1 mg/L, we did (143.1 *10^−3 g/L)/307.82 g/mol= 0.000464 mol/L = 464 μM. Then we compared to the 100 μM dose, so we did (464 μM/100 μM) = 4.64

[12] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.000037 mg/kg= 0.000037 mg/L, we did (0.000037 *10^−3 g/L)/291.78 g/mol= 1.268 * 10^− 10 mol/L = 0.000127 μM. Then we compared to the 1000 μM dose, so we did (1000 μM/0.000127 μM) = $7.8 * 10^6$.

[13] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.0012 mg/kg= 0.0012 mg/L, we did (0.0012 *10^−3 g/L)/319.83 g/mol= 3.752 * 10^− 9 mol/L = 0.003752 μM. Then we compared to the 1000 μM dose, so we did (1000 μM/0.003752 μM) = $2 * 10^6$

[14] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.00012 mg/mg= 120 mg/kg= 120 mg/L, we did (120 *10^−3 g/L)/406.26 g/mol= 0.0002954 mol/L = 295 μM. Then we compared to the 1000 μM dose, so we did (1000 μM/295 μM) = 3.4

[15] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.02 mg/kg= 0.02 mg/L, we did (0.02 *10^−3 g/L)/372.15 g/mol= 5.374 * 10^− 8 mol/L = 0.05 μM. Then we compared to the 1000 μM dose, so we did (1000 μM/0.05 μM) = $18 * 10^3$

Table 2
Effect of triazoles (propiconazole (PP), metconazole (MC), epoxiconazole (Epox), prothioconazole (PT), difenoconazole (Dif), tebuconazole (TB), tetraconazole (TT) and cyproconazole (Cypro)) exposure for 2, 12 and 24 min on sperm velocities (average path velocity (VAP in μm/s); straight-line velocity (VSL in μm/s); curvilinear velocity (VCL in μm/s)) in fresh chicken semen. For each triazole compound and each time of exposure, each triazole concentration was compared to the control (without triazole). The experiment was repeated 4 times for each concentration and each triazole by using different batches of fresh chicken sperm.

Triazoles	**VAP**											
PP	0 μM		0.001 μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	***P-value***
t = 2 min	58.33	±1.59	55.89	±2.57	53.30	±3.60	56.37	±2.07	59.39	±0.85	56.37	±1.82
t = 12 min	59.82	±3.44	53.90	±0.86	55.98	±1.18	56.90	±2.58	55.92	±0.86	56.23	±0.31 0.62
t = 24 min	54.96	±2.84	52.14	±1.35	57.46	±3.55	55.22	±2.16	54.90	±1.91	53.63	±3.78
PT	0 μM		0.1μM		1 μM		10μM		100μM		1 mM	
t = 2 min	57.46	±1.88	58.08	±1.81	57.71	±1.54	55.70	±3.45	55.42	±2.68	57.30	±2.49
t = 12 min	62.33	±4.04	60.17	±3.20	63.87	±4.84	61.94	±4.17	61.50	±5.36	61.38	±3.48 0.76
t = 24 min	55.47	±4.00	55.43	±1.38	62.57	±4.35	58.50	±3.40	60.38	±3.91	57.12	±4.23
MC												
t = 2 min	57.97	±1.73	58.04	±1.08	58.02	±0.64	54.79	±1.95	53.40	±1.27	53.77	±2.00
t = 12 min	57.35	±2.74	63.44	±3.46	63.03	±3.89	59.62	±4.09	54.70	±3.00	61.05	±5.97 0.13
t = 24 min	58.82	±3.30	58.57	±2.63	58.06	±3.49	59.48	±4.12	52.98	±2.82	61.33	±6.63
Epox												
t = 2 min	54.66	±1.86	55.68	±1.81	55.45	±1.88	53.18	±1.14	48.65	±1.05	53.51	±1.02
t = 12 min	54.56	±2.22	56.91	±1.36	56.80	±1.08	56.12	±1.88	52.31	±2.96	55.12	±2.20 0.33
t = 24 min	57.56	±1.12	55.72	±0.99	55.67	±1.31	53.44	±1.73	54.06	±1.94	55.46	±8.43
Dif												
t = 2 min	62.09	±3.05	60.93	±2.98	58.77	±3.03	61.58	±2.41	58.38	±1.81	**52.67**	±**2.82****
t = 12 min	64.58	±2.76	63.53	±2.47	59.98	±3.32	62.54	±2.39	59.02	±2.76	**54.06**	±**2.82***** <0.00
t = 24 min	65.88	±0.93	63.32	±2.75	60.86	±3.10	63.51	±3.48	62.63	±3.83	**51.55**	±**2.82******
TB												
t = 2 min	62.75	±3.71	62.11	±2.89	58.98	±2.90	59.59	±3.48	56.45	±2.38	*51.38*	±*1.81*
t = 12 min	63.35	±3.99	61.96	±2.13	65.16	±4.53	65.19	±1.81	61.68	±2.58	**50.20**	±**3.92*** 0.01
t = 24 min	66.05	±1.38	63.89	±0.82	64.15	±1.83	64.28	±2.09	60.65	±1.04	57.57	±8.65
TT												
t = 2 min	53.61	±0.66	51.47	±1.18	54.14	±0.52	52.87	±1.04	49.98	±0.87	49.92	±2.08
t = 12 min	52.16	±1.95	58.05	±1.96	57.10	±3.36	57.91	±3.26	55.49	±1.47	47.31	±2.01 0.00
t = 24 min	57.09	±4.40	62.64	±6.08	59.35	±3.70	64.16	±2.66	51.22	±2.76	51.27	±1.73
Cypro												
t = 2 min	55.73	±2.64	57.49	±2.89	61.21	±3.51	57.25	±2.29	55.51	±3.47	51.74	±1.24
t = 12 min	60.08	±2.78	61.56	±4.49	58.56	±3.47	59.23	±3.27	59.61	±2.34	53.70	±2.07 0.07
t = 24 min	59.12	±3.63	58.23	±4.14	59.23	±4.31	55.44	±3.25	55.20	±2.92	52.44	±2.56
VCL												
PP	0 μM		0.001 μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	
t = 2 min	120.87	±4.16	110.13	±4.81	111.97	±5.55	116.51	±3.62	119.22	±2.55	116.05	±4.39
t = 12 min	130.23	±3.70	116.10	±2.17	122.42	±1.50	120.58	±0.97	119.44	±0.95	116.92	±2.83 0.64
t = 24 min	117.12	±1.00	118.89	±3.12	119.25	±11.91	120.43	±2.40	117.64	±4.38	116.79	±10.62
PT	0 μM		0.1μM		1 μM		10μM		100μM		1 mM	
t = 2 min	110.97	±2.71	117.20	±4.51	114.92	±3.04	114.46	±6.83	113.14	±2.68	117.42	±3.51
t = 12 min	136.48	±5.04	130.18	±5.39	130.74	±5.48	127.08	±6.10	126.36	±6.33	124.30	±4.32 0.87
t = 24 min	120.30	±8.64	126.53	±6.46	130.95	±5.55	127.84	±4.28	126.35	±7.41	120.48	±8.06
MC												
t = 2 min	114.61	±2.51	118.00	±1.04	118.28	±2.16	114.59	±2.67	110.18	±2.73	110.03	±6.65
t = 12 min	125.90	±4.38	134.20	±4.88	129.40	±4.58	120.25	±5.44	116.68	±5.41	134.78	±16.25 0.08
t = 24 min	122.19	±8.63	122.97	±6.56	118.95	±5.82	119.94	±7.17	106.80	±6.43	127.59	±11.92
Epox												
t = 2 min	114.36	±2.83	114.98	±4.30	112.10	±2.54	109.98	±2.12	98.11	±2.63	109.50	±1.74
t = 12 min	124.67	±2.67	129.23	±3.14	122.42	±1.54	123.77	±4.27	110.63	±9.09	136.90	±21.89 0.09
t = 24 min	124.68	±3.96	123.09	±3.21	129.70	±3.60	112.43	±5.74	113.82	±11.16	124.65	±16.16
Dif												
t = 2 min	122.65	±6.33	120.27	±9.03	119.82	±10.11	118.68	±5.81	116.16	±5.98	**106.64**	±**5.95***
t = 12 min	133.09	±3.63	129.92	±3.40	123.80	±4.27	127.21	±4.49	121.52	±4.01	**112.63**	±**5.69**** <0.00
t = 24 min	132.20	±4.43	127.99	±4.92	125.45	±5.38	127.67	±4.07	129.99	±5.93	**116.35**	±**1.54***
TB												
t = 2 min	120.56	±8.20	119.70	±7.89	116.03	±7.24	116.15	±6.71	110.38	±7.29	100.33	±4.27
t = 12 min	129.35	±4.48	129.66	±3.21	130.68	±5.29	131.11	±1.79	123.63	±5.54	**104.56**	±**7.27*** <0.00
t = 24 min	131.44	±3.49	129.02	±3.05	129.05	±3.91	131.10	±4.61	125.11	±5.12	112.98	±8.71
TT												
t = 2 min	110.71	±4.28	104.47	±2.61	108.66	±4.23	110.15	±4.15	104.38	±2.94	104.03	±3.99
t = 12 min	111.81	±8.97	123.53	±6.47	119.84	±11.01	121.83	±8.26	125.51	±5.00	101.87	±6.79 0.01
t = 24 min	137.81	±10.41	145.40	±23.54	125.82	±8.74	137.11	±13.49	112.44	±11.12	**98.86**	±**6.42****
Cypro												
t = 2 min	116.99	±6.06	121.68	±6.87	126.07	±6.30	116.60	±5.99	116.26	±6.48	111.46	±3.99
t = 12 min	127.74	±5.07	124.89	±5.90	125.45	±6.69	123.12	±5.37	124.43	±5.49	*114.68*	±*4.25* 0.19
t = 24 min	125.11	±4.74	124.21	±8.91	124.34	±7.03	122.02	±6.31	122.41	±6.44	117.96	±11.05
VSL												
PP	0 μM		0.001 μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	
t = 2 min	34.23	±1.09	37.29	±1.44	33.62	±1.54	36.27	±2.46	38.82	±1.87	36.17	±1.59
t = 12 min	40.46	±2.29	36.67	±0.41	37.41	±1.24	39.79	±2.43	38.09	±1.75	39.67	±1.72 0.89
t = 24 min	38.11	±3.24	33.96	±1.58	39.51	±2.72	37.88	±2.60	35.41	1.14	36.39	±2.60
PT	0 μM		0.1μM		1 μM		10μM		100μM		1 mM	

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

Triazoles	**VAP**											
PP	0 μM		0.001 μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	***P-value***
t = 2 min	38.85	±1.25	39.46	±0.49	40.00	±1.34	37.25	±2.13	39.00	±2.99	40.86	±2.79
t = 12 min	45.05	±4.64	42.98	±3.05	45.82	±4.62	45.17	±3.68	45.57	±5.65	45.04	±4.43 0.78
t = 24 min	39.09	±3.48	37.37	±1.02	44.61	±4.32	41.40	±3.43	43.62	±3.86	37.54	±3.03
MC												
t = 2 min	40.07	±1.67	39.59	±1.43	39.84	±0.65	37.38	±1.80	35.70	±0.98	35.51	±1.13
t = 12 min	39.32	±2.53	45.85	±2.84	45.95	±3.99	43.41	±4.27	38.10	±3.07	45.69	±6.74 0.20
t = 24 min	39.52	±2.06	40.61	±2.18	41.08	±2.76	41.19	±4.29	37.41	±2.61	39.37	±6.46
Epox												
t = 2 min	35.19	±0.80	36.23	±1.81	37.26	±1.09	34.93	±0.88	32.56	±0.46	34.65	±1.20
t = 12 min	37.24	±1.27	39.00	±1.62	39.70	±1.17	38.77	±1.69	36.74	±1.86	33.65	±2.04 0.14
t = 24 min	39.90	±1.43	39.46	±1.53	38.48	±1.49	37.71	±1.54	43.50	±5.48	*30.86*	*±7.03*
Dif												
t = 2 min	43.86	±2.67	42.73	±2.39	39.82	±2.15	44.16	±2.37	41.10	±1.48	**35.96**	**±2.48***
t = 12 min	46.51	±2.85	45.52	±2.15	40.46	±3.77	44.30	±2.23	42.07	±2.18	**38.33**	**±3.11*** 0.00
t = 24 min	48.14	±0.81	46.97	±2.37	43.50	±3.16	47.17	±3.93	44.73	±3.55	**32.62**	**±4.75****
TB												
t = 2 min	44.06	±3.52	43.48	±3.38	40.96	±2.02	41.93	±3.14	38.99	±1.60	34.50	±2.23
t = 12 min	46.35	±4.49	43.90	±2.10	47.19	±5.27	48.10	±2.76	43.91	±2.17	37.13	±6.14 0.01
t = 24 min	49.38	±1.00	46.38	±0.73	47.51	±1.80	47.47	±1.52	44.27	±0.78	**36.05**	**±3.87****
TT												
t = 2 min	36.25	±1.25	34.52	±0.85	36.73	±0.83	33.87	±1.35	33.74	±0.68	33.59	±1.70
t = 12 min	36.82	±1.33	40.29	±1.69	40.02	±1.99	40.14	±2.52	38.83	±1.09	31.40	±1.26 0.00
t = 24 min	44.34	±4.45	43.92	±6.28	41.91	±3.04	47.68	±1.82	**35.48**	**±2.22***	**35.49**	**±1.55***
Cypro												
t = 2 min	38.29	±3.40	39.31	±3.07	41.71	±3.86	38.46	±2.92	39.06	±3.95	34.31	±1.33
t = 12 min	42.28	±3.42	45.81	±5.71	40.83	±3.68	42.67	±3.73	42.78	±2.53	*35.95*	*±2.30* 0.07
t = 24 min	42.11	±4.40	40.83	±4.49	42.08	±4.27	37.65	±3.47	39.63	±2.99	**35.29**	**±1.32***

* p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.001

exposures induce no change in plasma testosterone in red-leg partridge [19]. In our study, high concentrations of PT closed to the cytotoxicity were necessary to reduce the level of testosterone and the levels of *STAR* mRNA expression. This dose is 17 * 10^6 times[16] higher than the national estimated daily intake in Australia [1]. Therefore, chicken testis appears less sensitive to MC, Dif, Cypro, TT and PT than PP, Epox and TB concerning the steroidogenesis process. We also showed that PP, MC, Epox and TB exposures were able to inhibit lactate production at lower concentration as compared to PT, Dif, TT and Cypro. The production of lactate in Sertoli cells is very important for the spermatogenesis maintenance. Lactate comes from the conversion of pyruvate, the product of the glycolysis and is the preferential substrate for ATP production in germinal cells [54]. Moreover, the depletion of the lactate production impairs the spermatogenesis and lactate has protective effect against apoptosis in germ cells [12,15,53]. The decrease of lactate production induced by triazoles exposures could lead to the failure of spermatogenesis. Thus, our data suggest that the inhibition of lactate and testosterone production in testis explants in response to the exposure of triazoles could lead to the reduction of the spermatogenesis. Indeed, it has been already shown in the literature that triazoles impair *in vivo* the spermatogenesis. For example, the *in vivo* exposure to Dif in rat, decreases the spermatozoa number and motility, serum testosterone, and testis STAR and 17BHSD expression [34]. It was also the case with Epox in Japanese quails [24], TB in rats [33], MC in rats [4], PT in lizards [71]. Regarding Cypro, it has been tested on murine Leydig (MA-10) cells, and the study shows that the exposure reduces the expression of gene coding for steroidogenesis leading to the decrease of the production of testosterone [58].

However, it is important to mention that the concentrations of triazoles at which we observed negative effects (100 μM-1 mM for PT, MC, Epox, Dif, TB, TT and Cypro) are high compared to the concentrations found in soils or the concentrations considered as contaminants in aquatic ecosystem. Indeed, for example the maximum concentration of tebuconazole in agricultural soils was registered as 0.19 mg/kg [63] and residues were found in the hair of workers applying TB equivalent to 4600 times the lowest concentration we used [55]. Moreover, triazole fungicides were identified as contaminants of aquatic ecosystems with concentrations up to 0.92 mg/L or about 3 μM [31]. However, the concentrations of PP (1–10 μM) in our study are more realistic corresponding to the concentration found in broccoli [14].

4.3. Alteration of sperm parameters by triazoles exposure

We also assessed the *in vitro* effect of triazoles exposure on spermatozoa of adult chicken. As observed with testosterone and lactate secretion, the variations of sperm parameters were different according the triazole used. PP, MC, Epox, Dif and Cypro induced the most rapid effect on the sperm motility; Dif, TB and TT have the most important effect on sperm velocity whereas MC, Epox, and TT had a greater impact on the spermatozoa morphology. According to our knowledge, it is the first time that the effect of PP has been investigated on the motility of chicken sperm. The reduced motility can be associated with the increase of coiled tail percentage which is often related to the hypo-osmotic swelling [32]. Epox (100 μM) and MC (10 μM) exposure for 2 min decreased the sperm motility and this could be explained by the increase in the level of bent tail, coiled tail and DMR of spermatozoa. In contrast, an *in vivo* study where male rats were exposed for 28 days to MC has shown no modifications of sperm motility [4]. DMR is the most common abnormality of the sperm tail and can diminish the sperm motility. It is often associated to abnormal epididymal composition and secretion due to the stress and/or thermoregulation defect [20]. Environmental conditions are consequently important for the sperm quality. It is also support by Barth and Bowman study, which showed that the exposure to dexamethasone treatment increased DMR with abnormal morphologies in the head of spermatozoa and mitochondrial defects [3]. We showed that direct exposure to TB (1 mM, 12 or 24 min) or Dif (1 mM, 2, 12 and 24 min) reduces sperm motility in chicken. It has been confirmed in *in vivo* study by Joshi et al. showing that TB impairs rat sperm motility after

[16] We assumed that 1 kg = 1 L so 0.00002 mg/kg= 0.00002 mg/L, we did (0.00002 *10^−3 g/L)/344.26 g/mol= 5.81 * 10^− 11 mol/L = 0.000058 μM. Then we compared to the 1000 μM dose, so we did (1000 μM/0.000058 μM) = 17 * 10^6

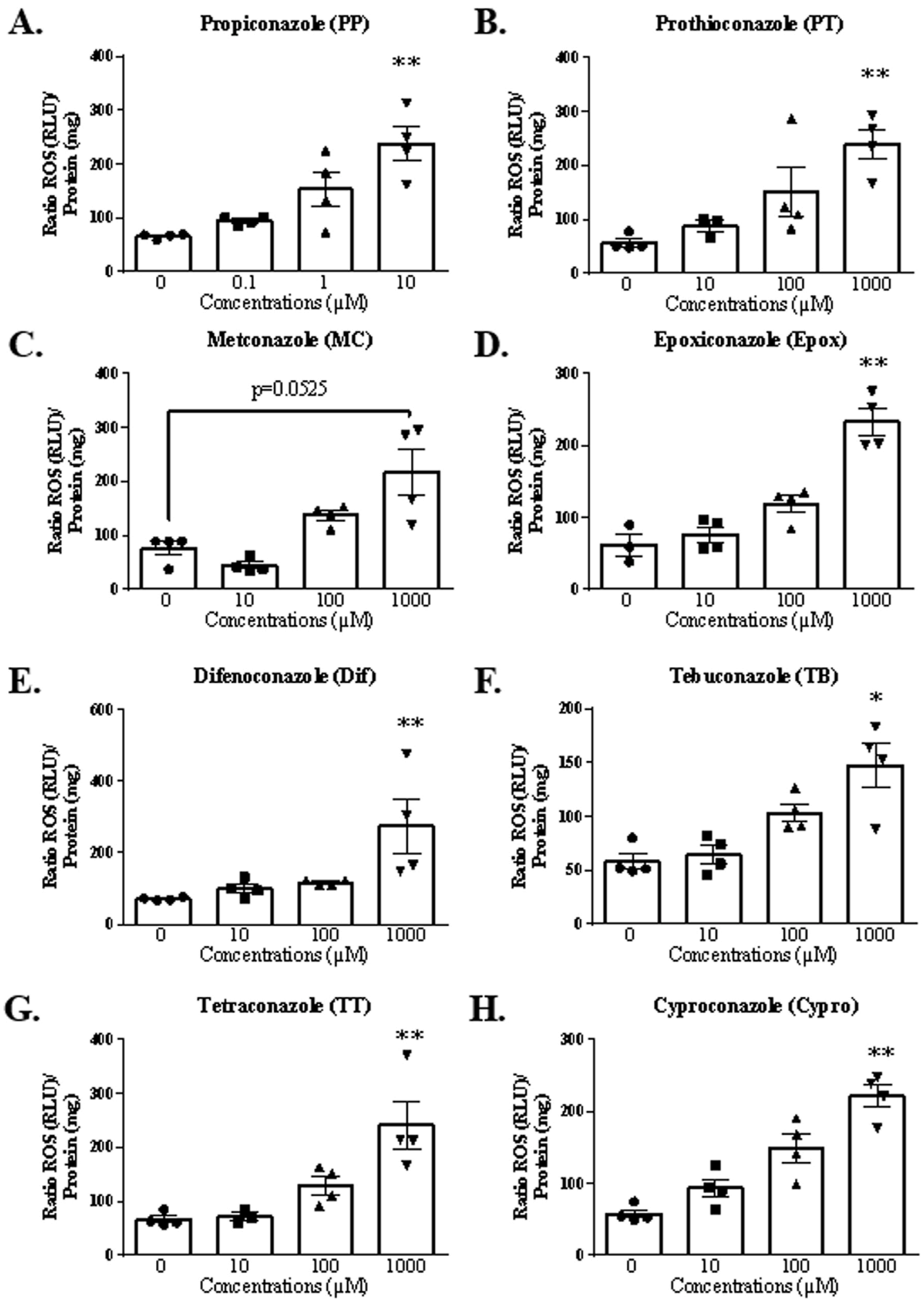


Fig. 6. Analysis of Reactive Oxygen Species (ROS) production in spermatozoa exposed to triazolesEffect of eight triazoles (propiconazole (PP, A), prothioconazole (PT, B), metconazole (MC, C), epoxiconazole (Epox, D), difenoconazole (Dif, E), tebuconazole (TB, F), tetraconazole (TT, G) and cyproconazole (Cypro, H) exposure at different concentrations (0.1 µM to 1 mM) for 24 min on the ROS production. The ROS activity was evaluated as detailed in the materials and methods and the ratio luminescence measured (RLU)/protein amount in µg of spermatozoa is represented for each triazole compound. Data are represented as mean ± SEM ($n = 4$ independent experiments for each triazole). For each triazole compound, each triazole concentration was compared to the control (without triazole). * $p < 0.05$; * * $p < 0.01$.

Table 3
Percentage of spermatozoa with abnormal morphology including percentage of bent tail, coiled tail and Distal Mid-piece Reflex (DMR) after exposure to triazoles (propiconazole (PP), metconazole (MC), epoxiconazole (Epox), prothioconazole (PT), difenoconazole (Dif), tebuconazole (TB), tetraconazole (TT) and cyproconazole (Cypro)) for 2, 12 and 24 min at different concentrations 0.001 μM to 1 mM. For each triazole compound and each time of exposure, each triazole concentation was compared to the control (without triazole). The experiment was repeated 4 times for each concentration and each triazole by using different batches of fresh chicken sperm.

Triazoles		**Bent tail**									
PP	0 μM		0.001 μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	***P-value***
t = 2 min	6.26	±3.57	4.54	±1.51	2.90	±1.22	2.25	±0.30	2.47	±0.27	3.38	±0.16
t = 12 min	4.82	±0.95	5.02	±1.20	3.76	±0.71	3.83	±0.53	4.53	±0.55	4.50	±1.17 0.49
t = 24 min	5.42	±0.84	5.23	±0.85	7.59	±0.72	4.28	±0.56	6.06	±1.07	5.44	±1.96
PT	0 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM		100 μM		1 mM	
t = 2 min	3.44	±1.38	3.68	±1.70	1.97	±0.21	4.85	±0.86	1.98	±0.39	3.09	±1.34
t = 12 min	1.70	±0.26	2.64	±0.42	5.75	±1.72	2.81	±0.84	4.60	±0.90	5.97	±1.33 0.02
t = 24 min	2.88	±0.82	3.85	±1.15	5.57	±0.69	3.76	±1.10	6.92	±3.11	8.43	±2.18
MC												
t = 2 min	1.78	±0.45	1.92	±0.54	3.58	±0.72	2.34	±0.87	4.85	±1.16	5.26	±**0.99***
t = 12 min	2.95	±0.58	3.31	±0.81	2.98	±0.83	4.39	±0.50	4.94	±1.11	5.04	±0.83 0.02
t = 24 min	4.31	±1.00	6.86	±0.65	4.48	±1.02	5.31	±1.47	6.04	±1.14	6.13	±0.48
Epox												
t = 2 min	3.19	±1.04	4.00	±1.18	3.81	±1.19	3.68	±0.41	4.89	±1.41	6.84	±1.31
t = 12 min	5.50	±1.80	5.18	±1.24	5.03	±0.97	6.78	±1.15	3.62	±1.34	6.68	±0.99 0.21
t = 24 min	5.36	±1.68	4.03	±0.74	5.99	±1.35	3.42	±0.51	5.42	±1.42	6.16	±1.10
Dif												
t = 2 min	2.59	±0.80	2.34	±0.58	1.39	±0.28	3.33	±1.75	2.27	±0.69	2.49	±0.73
t = 12 min	1.91	±0.60	1.92	±0.21	4.47	±1.62	4.07	±1.03	5.92	±2.73	5.64	±3.18 0.38
t = 24 min	3.93	±1.31	4.03	±1.17	2.26	±0.75	6.10	±4.19	4.62	±2.17	3.78	±0.81
TB												
t = 2 min	2.20	±0.49	3.10	±1.16	2.17	±0.81	2.70	±1.31	3.89	±0.93	3.93	±1.66
t = 12 min	5.40	±1.94	2.32	±0.56	4.64	±2.24	2.47	±1.15	3.52	±1.04	4.98	±0.75 0.26
t = 24 min	3.94	±1.28	5.64	±3.11	6.28	±2.22	3.48	±1.07	7.17	±3.00	6.07	±1.45
TT												
t = 2 min	2.25	±0.52	2.03	±0.45	2.12	±0.47	2.30	±0.36	2.60	±0.13	1.68	±0.14
t = 12 min	3.22	±0.34	3.82	±0.77	2.39	±0.43	3.10	±0.61	2.59	±0.43	4.87	±0.76 0.02
t = 24 min	3.14	±0.76	3.67	±0.89	2.89	±0.78	2.84	±0.73	3.23	±0.35	5.60	±**0.55****
Cypro												
t = 2 min	3.33	±0.69	3.60	±1.16	4.68	±2.14	3.47	±0.84	3.45	±0.80	2.91	±0.57
t = 12 min	3.47	±1.21	5.38	±0.95	4.85	±1.28	4.43	±1.23	5.38	±1.34	5.48	±1.23 0.76
t = 24 min	4.43	±1.14	3.42	±0.79	4.29	±0.64	5.48	±1.68	4.47	±0.78	6.92	±1.26
Coiled tail												
PP	0 μM		0.001μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	
t = 2 min	0.23	±0.03	0.00	±0.00	0.27	±0.10	**0.15**	**±0.02****	**0.08**	**±0.04***	0.31	±0.19
t = 12 min	0.11	±0.06	0.25	±0.06	0.20	±0.07	0.19	±0.15	0.27	±0.05	0.28	±0.11 0.57
t = 24 min	0.48	±0.12	0.23	±0.12	0.29	±0.04	0.10	±0.06	0.15	±0.05	0.37	±0.20
PT	0 μM		0.1μM		1 μM		10μM		100μM		1 mM	
t = 2 min	0.16	±0.12	0.14	±0.07	0.03	±0.03	0.09	±0.05	0.10	±0.06	0.09	±0.03
t = 12 min	0.03	±0.03	0.03	±0.03	0.07	±0.07	0.18	±0.04	0.04	±0.04	0.12	±0.01 0.23
t = 24 min	0.15	±0.04	0.19	±0.09	0.11	±0.04	0.11	±0.05	0.29	±0.22	0.37	±0.09
MC												
t = 2 min	0.02	±0.02	0.04	±0.02	0.06	±0.03	0.14	±0.10	0.10	±0.04	0.26	±0.10
t = 12 min	0.08	±0.04	0.12	±0.04	0.14	±0.09	0.24	±0.11	0.18	±0.07	**0.38**	**±0.11*** 0.04
t = 24 min	0.16	±0.06	0.14	±0.07	0.16	±0.05	0.21	±0.07	0.30	±0.10	0.42	±0.15
Epox												
t = 2 min	0.23	±0.02	0.12	±0.09	0.17	±0.05	0.12	±0.04	0.06	±0.06	0.58	±0.21
t = 12 min	0.40	±0.12	0.33	±0.11	0.22	±0.06	0.25	±0.09	0.14	±0.11	0.40	±0.23 0.11
t = 24 min	0.25	±0.14	0.17	±0.06	0.29	±0.07	0.17	±0.07	0.19	±0.10	0.29	±0.12
Dif												
t = 2 min	0.09	±0.05	0.07	±0.04	0.09	±0.05	0.08	±0.05	0.10	±0.06	0.22	±0.11
t = 12 min	0.02	±0.02	0.10	±0.04	0.20	±0.11	0.09	±0.03	0.10	±0.06	0.38	±0.10 0.10
t = 24 min	0.28	±0.20	0.18	±0.09	0.09	±0.09	0.23	±0.09	0.33	±0.16	0.28	±0.14
TB												
t = 2 min	0.21	±0.07	0.18	±0.15	0.08	±0.03	0.03	±0.03	0.21	±0.09	*0.06*	*±0.04*
t = 12 min	0.00	±0.00	0.08	±0.05	0.09	±0.07	0.12	±0.02	0.08	±0.05	0.36	±0.07 0.56
t = 24 min	0.21	±0.09	0.13	±0.08	0.13	±0.05	0.18	±0.09	0.36	±0.22	0.18	±0.14
TT												
t = 2 min	0.25	±0.08	0.29	±0.14	0.09	±0.04	0.02	±0.02	0.12	±0.08	0.12	±0.07
t = 12 min	0.11	±0.04	0.25	±0.12	0.13	±0.08	0.36	±0.15	0.23	±0.12	0.13	±0.05 0.58
t = 24 min	0.02	±0.02	0.20	±0.10	0.14	±0.07	0.09	±0.04	0.20	±0.13	0.30	±0.10
Cypro												
t = 2 min	0.18	±0.06	0.23	±0.05	0.12	±0.10	0.21	±0.05	0.19	±0.06	0.18	±0.07
t = 12 min	0.24	±0.10	0.22	±0.11	0.37	±0.18	0.17	±0.09	0.29	±0.14	0.16	±0.06 0.96
t = 24 min	0.20	±0.08	0.12	±0.08	0.23	±0.05	0.20	±0.08	0.20	±0.07	0.36	±0.12
DMR												
PP	0 μM		0.001μM		1 μM		10μM		100μM		1 mM	
t = 2 min	1.07	±0.05	0.75	±0.30	0.77	±0.17	0.43	±0.13	1.21	±0.16	0.43	±0.15
t = 12 min	0.83	±0.46	1.07	±0.11	1.53	±0.41	1.30	±0.26	1.14	±0.38	1.41	±0.57 0.51
t = 24 min	1.34	±0.27	1.90	±0.46	1.99	±0.60	1.43	±0.83	2.00	±1.03	2.31	±0.83

(*continued on next page*)

Table 3 (*continued*)

Triazoles		**Bent tail**									
PP	0 μM		0.001 μM		0.01 μM		0.1 μM		1 μM		10 μM	***P-value***
PT	0 μM		0.1μM		1 μM		10μM		100μM		1 mM	
t = 2 min	0.51	±0.04	0.41	±0.16	0.46	±0.14	0.73	±0.13	0.41	±0.12	0.70	±0.23
t = 12 min	0.78	±0.26	0.95	±0.13	1.16	±0.32	0.73	±0.20	0.94	±0.21	0.88	±0.19 0.77
t = 24 min	1.16	±0.08	1.27	±0.19	0.99	±0.22	1.21	±0.28	1.81	±0.32	1.52	±0.13
MC												
t = 2 min	0.63	±0.11	0.51	±0.06	0.68	±0.16	0.77	±0.26	0.73	±0.09	**1.47**	**±0.30***
t = 12 min	0.85	±0.10	1.16	±0.14	0.92	±0.19	1.00	±0.14	1.30	±0.14	**1.92**	**±0.24**** <0.00
t = 24 min	1.25	±0.24	1.03	±0.19	0.99	±0.32	1.05	±0.16	1.43	±0.17	**2.34**	**±0.37****
Epox												
t = 2 min	0.87	±0.26	0.62	±0.34	0.28	±0.13	1.03	±0.27	1.18	±0.24	**1.91**	**±0.25***
t = 12 min	0.95	±0.19	1.25	±0.11	1.15	±0.16	1.30	±0.20	1.73	±0.20	**2.65**	**±0.47**** <0.00
t = 24 min	1.23	±0.32	1.62	±0.26	1.04	±0.12	1.47	±0.30	1.81	±0.29	**2.54**	**±0.39****
Dif												
t = 2 min	0.54	±0.14	0.33	±0.08	0.61	±0.16	0.60	±0.06	0.39	±0.14	0.97	±0.14
t = 12 min	1.07	±0.24	1.04	±0.28	0.69	±0.17	0.64	±0.15	0.80	±0.10	0.94	±0.19 0.05
t = 24 min	0.55	±0.11	0.62	±0.12	0.76	±0.20	0.96	±0.25	0.91	±0.24	1.69	±0.66
TB												
t = 2 min	0.76	±0.31	0.49	±0.24	0.82	±0.12	0.26	±0.08	0.73	±0.12	0.77	±0.35
t = 12 min	0.50	±0.15	0.77	±0.16	0.70	±0.23	0.65	±0.13	1.00	±0.33	**1.56**	**±0.21**** 0.00
t = 24 min	0.61	±0.10	0.72	±0.26	0.84	±0.21	0.81	±0.27	0.81	±0.22	**1.62**	**±0.39****
TT												
t = 2 min	0.89	±0.21	1.27	±0.37	1.18	±0.43	1.01	±0.16	0.62	±0.16	0.95	±0.25
t = 12 min	1.50	±0.15	0.87	±0.21	0.93	±0.17	0.88	±0.18	1.02	±0.14	1.39	±0.20 0.52
t = 24 min	0.65	±0.20	1.24	±0.32	1.40	±0.40	1.08	±0.15	1.02	±0.31	1.29	±0.17
Cypro												
t = 2 min	0.74	±0.14	0.82	±0.21	0.74	±0.16	1.00	±0.13	0.80	±0.19	0.90	±0.16
t = 12 min	1.20	±0.08	0.99	±0.26	1.16	±0.17	1.02	±0.44	1.45	±0.30	0.67	±0.21 0.82
t = 24 min	1.06	±0.13	1.51	±0.31	1.14	±0.24	1.60	±0.30	1.07	±0.28	1.57	±0.19

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; ***$p<0.001$ and ****$p<0.0001$.

15 days of exposure [33]. The decrease of sperm motility induced by Dif exposure is confirmed *in vivo* by Khwanes et al.'s study where Dif reduced the percentage of normal spermatozoa [34]. In zebrafish, it has already been shown that Dif reduced spermatozoa frequency and maturation [11]. The decrease in chicken sperm motility observed in response to the triazoles exposure could be related to the decrease of the lactate content in the semen which leads to the increase of pH and death of spermatozoa [7]. It has been also shown that sperm motility can be disrupted by free radicals and peroxide [7] and triazoles are known to increase lipid peroxidation, ROS accumulation and apoptosis in fishes and mammals [25,26,43,44,70]. In our study, we confirm that the exposure to triazole induces an increase of ROS production in spermatozoa that could contribute to the reduction of chicken sperm motility.

4.4. AHR and CAR, two potential actors of triazole exposure effects

The molecular mechanisms by which triazoles could affect testicular functions are still unclear. Few receptors have been related to triazoles. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) can be activated by environmental contaminants [62] and AHR is also involved in follicular maturation in mice [51]. In male, AHR is present in the tubule seminiferous and within the acrosome and the principal piece of the mature sperm flagellum which can explain the role of this receptor in sperm motility [28]. A knock-out for AHR in mice leads to apoptosis of seminiferous tubules with Sertoli cells function and spermatogenesis dysregulation, increased oxidative stress, and morphologic abnormalities in sperm head and tail [28]. In human, a study on patients with varicocele has shown that AHR could be a regulator of sperm concentration, motility and abnormal sperm morphologies [73]. The basic helix loop helix domain of AHR exhibited 87–100% amino acid identity to avian and mammalian species. Therefore, AHR is highly conserved between these two species. Mammalian and chicken AHR have the same functional domains [65]. Regarding triazoles exposure, AHR expression was enhanced after TB exposure in bovine mammary gland [42] and human HepaRG cells [37], after PP exposure in HepaRG cells [39] and GH3 cells [23]. However TB, Cypro and Epox exposure in placental JEG3 cells did not activate AHR [57] and PT decreased the basal activity of AHR in GH3 cells [23]. Interestingly, in our study, all eight triazoles studied after 48 h of exposure increased *AHR* gene expression. However, we did not analyse the activation of this receptor. Constitutive androstane receptor (CAR) signalling is involved in xenobiotic and clearance in the liver. However, CAR is also present in mice tubular compartment and in Leydig cells [48]. CAR inverse agonists reduce testis weight and sperm production and increase apoptotic germ cells suggesting an important role of this receptor in the spermatogenesis process. The conservation of CAR signalling between mammals and avian species are controversial. In Handschin et al's study [27], the authors found high similarities between chicken, mice, rat and human about CAR and the signalling mechanisms affecting drug-induction pathway but in Bae et al.'s review [2], the authors have reported several studies showing that the roles and functions of CAR in human and mice are different. In human, most of its roles are related to drugs, energy and metabolism and especially with a tumour suppressive role in human liver cancer. Indeed, CAR is mainly expressed in the liver and it has not been yet studied in reproductive organs in humans. Finally, Honkakoski et al. Honkakoski et al., [30] have studied the activation of CAR by flame retardants and plasticizer triaryl phosphate and found that CAR targets human CYP2B6 and CYP3A4 which are related to steroid metabolism. Regarding triazoles, it is well known that PP disturbs steroid metabolism through CAR in rat [38]. Cypro activated also CAR gene expression in mice [49] but TB inhibited it in human liver cells [38]. Like *AHR*, in our study, all the triazoles used increased the expression of *CAR*. Thus, the gene expression of *AHR* and *CAR* that are important actors in male fertility could be modulated by triazole exposure in chicken testis.

The present study has some limitations.

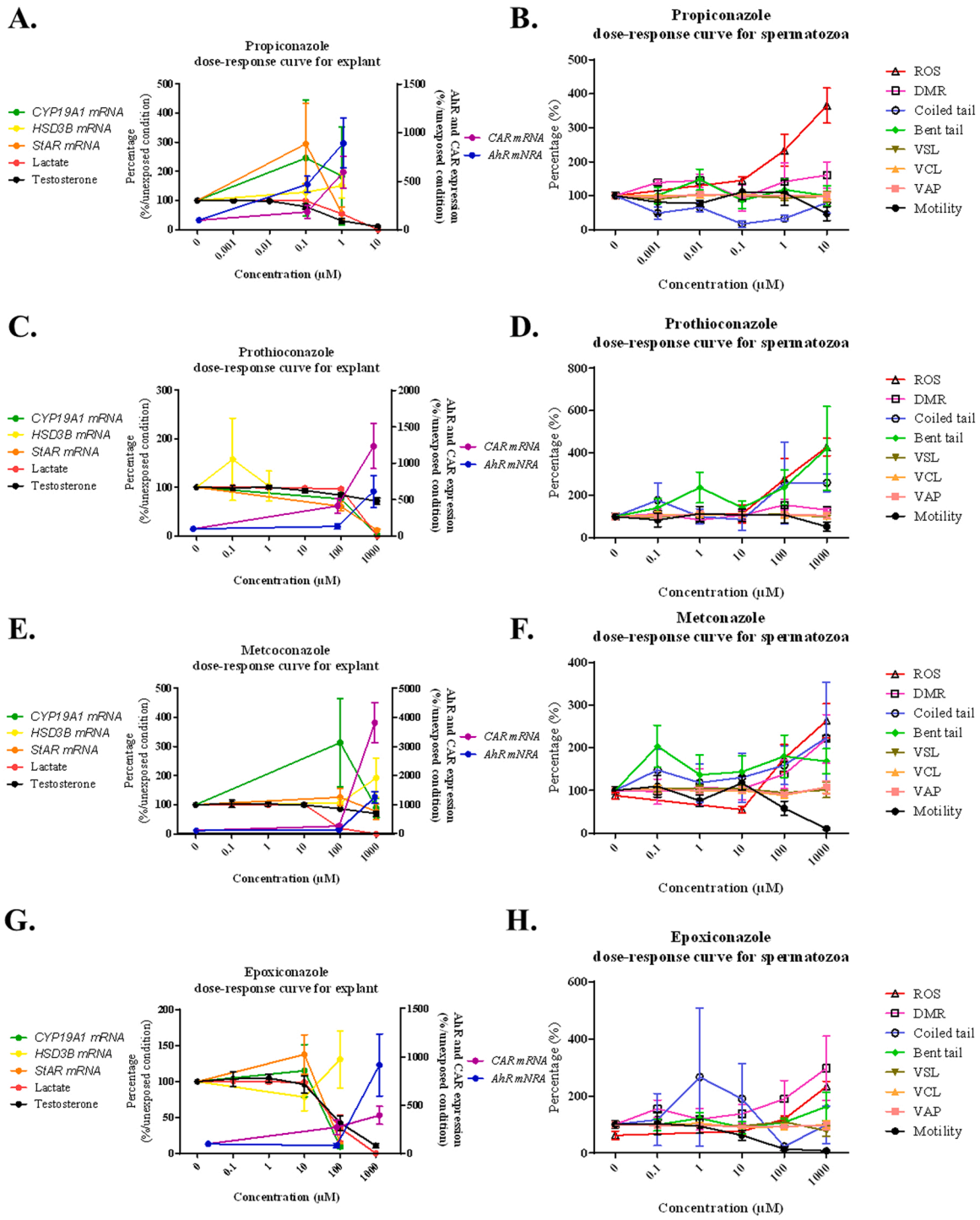


Fig. 7. Dose-response curve of explant system and of sperm system after the exposure to triazoles (PP, PT, MC and Epox). Dose-response curve of the mRNA expression of PXR, AHR, CYP19A1, HSD3B, StAR and the production of lactate and testosterone in explant exposed *in vitro* to four triazoles (propiconazole (PP,A), prothioconazole (PT, C), metconazole (MC, E), epoxiconazole (Epox, G). Dose-response curve of the production of ROS and sperm parameters in sperm exposed *in vitro* to four triazoles (PP, B), (PT, D), (MC, F), (Epox, H). For each triazole compound, each concentration was compared to the control (without triazole) and represented in percentage (%). No statistic analysis was shown on these graphs.

- This study was performed on chicken testis explants, primary Sertoli cells and spermatozoa *in vitro* exposed to triazoles. It will be interesting to measure the same reproductive parameters but after *in vivo* triazoles dietary exposure.
- We investigated a potential cytotoxic effect only on chicken primary Sertoli cells but not on the whole testicular explants and on spermatozoa.
- The doses used in this study are much higher than those found in the environment
- In this study we studied each triazole separately but it will be interesting to investigate the cocktail effect (mix effect) of these triazoles.

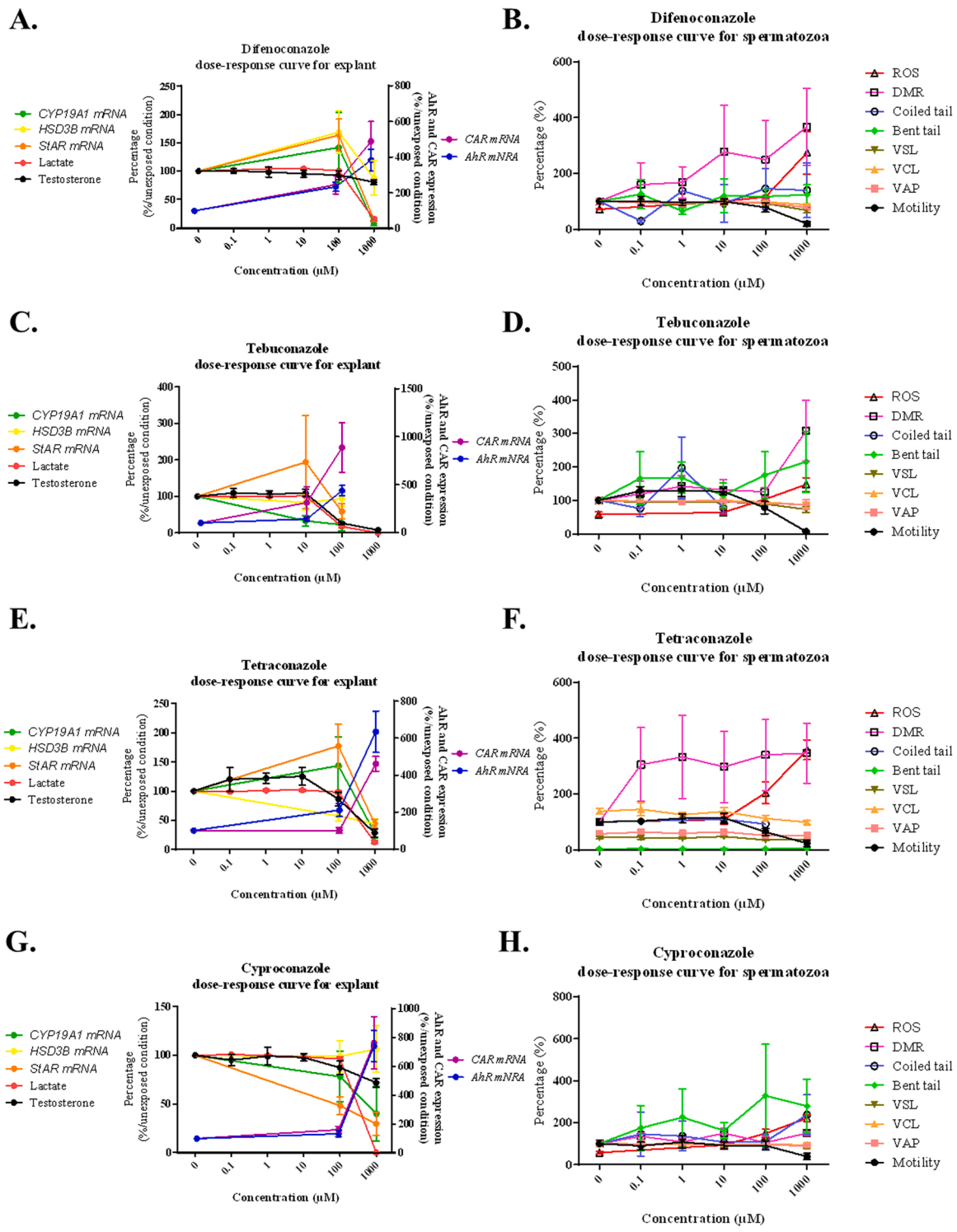


Fig. 8. Dose-response curve of explant system and of sperm system after the exposure to triazoles (Dif, TB, TT and Cypro). Dose-response curve of the mRNA expression of PXR, AHR, CYP19A1, HSD3B, StAR and the production of lactate and testosterone in explant exposed *in vitro* to four triazoles (difenoconazole (Dif, A), tebuconazole (TB, C), tetraconazole (TT, E), cyproconazole (Cypro, G). Dose-response curve of the production of ROS and sperm parameters in sperm exposed *in vitro* to four triazoles (Dif, B), (TB, D), (TT, F), (Cypro, H). For each triazole compound, each concentration was compared to the control (without triazole) and represented in percentage (%). No statistic analysis was shown on these graphs.

5. Conclusion

Here, we show that triazoles compounds impair chicken testicular functions by reducing cell viability, steroidogenesis and lactate production. Moreover, the exposure of spermatozoa to triazoles leads to decreased sperm motility, increased sperm abnormalities and ROS production. In the future, it will be interesting to investigate the *in vivo* effect of a chronic dietary exposure to triazoles on the quality of rooster's sperm, its fertility and its progeny's metabolism. This study could help to better understand how the pesticides alter chicken fertility and consequently could prevent the decline of bird's population.

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Informed Consent Statement

Not applicable.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

The authors thank to Région Centre Val de Loire for its funding (HAPOFERTI grant number 32000858).

CRediT authorship contribution statement

Joelle Dupont and Loise Serra participated in Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing draft, Visualization. Anthony Estienne, Guillaume Bourdon, Mathias Freville, Christelle Ramé, Claire Chevaleyre, Philippe Didier, Marine Chahnamian, Patrice Ganier, and Florine Pinault participated in Investigation. J.D. participated in obtaining Resources, Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing draft, Supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

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

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.toxrep.2023.03.005.

References

[1] Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, In Encyclopedia of Nanoscience and Society, SAGE Publications, Inc,, Teller Road, Thousand Oaks California 91320 United States, 2010, p. 2455.
[2] S.D.W. Bae, R. Nguyen, L. Qiao, J. George, Role of the constitutive androstane receptor (CAR) in human liver cancer, Biochim. Et. Biophys. Acta (BBA) - Rev. Cancer 1875 (2021), 188516.
[3] A.D. Barth, P.A. Bowman, The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls, Can. Vet. J. 35 (1994) 93–102.
[4] BASF we create chemistry (2015). Metconazole, Document M-CA, Section 1, Indentity of the active substance. BASF DocID 2015/1042078 Annex to Regulation 283/2013, Document M-CA, Section 1,.
[5] C.E. Bennett, R. Thomas, M. Williams, J. Zalasiewicz, M. Edgeworth, H. Miller, B. Coles, A. Foster, E.J. Burton, U. Marume, The broiler chicken as a signal of a human reconfigured biosphere, R. Soc. Open Sci. 5 (2018), 180325.
[6] N. Berenzen, A. Lentzen-Godding, M. Probst, H. Schulz, R. Schulz, M. Liess, A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level, Chemosphere 58 (2005) 683–691.
[7] E. Blesbois, Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation, J. Poult. Sci. (2012) 141–149.
[8] N.L. Botteri Principato, J.D. Suarez, S.C. Laws, G.R. Klinefelter, The use of purified rat Leydig cells complements the H295R screen to detect chemical-induced alterations in testosterone production†, Biol. Reprod. 98 (2018) 239–249.
[9] M.A. Camara, A. Fuster, J. Oliva, Determination of pesticide residues in edible snails with QuEChERS coupled to GC-MS/MS, Food Addit. Contam.: Part A 37 (2020) 1881–1887.
[10] X. Chen, Q. Zhu, X. li, T. Huang, S. Wang, Y. Wang, X. Chen, Z. Lin, R. Ge, Pubertal exposure to tebuconazole increases testosterone production via inhibiting testicular aromatase activity in rats, Chemosphere 230 (2019) 519–526.
[11] X. Chen, J. Zheng, J. Zhang, M. Duan, H. Xu, W. Zhao, Y. Yang, C. Wang, Y. Xu, Exposure to difenoconazole induces reproductive toxicity in zebrafish by interfering with gamete maturation and reproductive behavior, Sci. Total Environ. 838 (1) (2022), 155610 (Pt).
[12] J.L. Courtens, L. Plöen, Improvement of Spermatogenesis in Adult Cryptorchid Rat Testis by Intratesticular Infusion of Lactate1, Biol. Reprod. 61 (1999) 154–161.
[13] K. Dreisig, Predictive value of cell assays for developmental toxicity and embryotoxicity of conazole fungicides, ALTEX 30 (2013) 319–330.
[14] EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR Panel), Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health, EFSA J. 7 (9) (2009) 1167, 2009.
[15] K. Erkkila, Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis, Mol. Hum. Reprod. 8 (2002) 109–117.
[16] A. Estienne, M. Reverchon, A. Partyka, G. Bourdon, J. Grandhaye, A. Barbe, E. Caldas-Silveira, C. Rame, W. Niżański, P. Froment, et al., Chemerin Impairs In Vitro Testosterone Production, Sperm Motility, and Fertility in Chicken: Possible Involvement of Its Receptor CMKLR1, Cells 9 (2020) 1599.
[17] A. Estienne, M. Fréville, G. Bourdon, C. Ramé, J. Delaveau, C. Rat, M. Chahnamian, A. Brionne, P. Chartrin, H. Adriensen, et al., Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in reversible increase early embryo mortality in chicken, Ecotoxicol. Environ. Saf. 241 (2022), 113741.
[18] FAO and WHO (2020). Pesticide residues in food 2019 -report 2019 - Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues, Rome.
[19] E. Fernández-Vizcaíno, I.G. Fernández de Mera, F. Mougeot, R. Mateo, M.E. Ortiz-Santaliestra, Multi-level analysis of exposure to triazole fungicides through treated seed ingestion in the red-legged partridge, Environ. Res. 189 (2020), 109928.
[20] L.A. Fitzpatrick, G. Fordyce, M.R. McGowan, J.D. Bertram, V.J. Doogan, J. D. Faveri, R.G. Miller, R.G. Holroyd, Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits, Anim. Reprod. Sci. 71 (1–2) (2002) 39–49.
[21] M. Fréville, A. Estienne, C. Ramé, G. Lefort, M. Chahnamian, C. Staub, E. Venturi, J. Lemarchand, E. Maximin, A. Hondelatte, et al., Chronic dietary exposure to a glyphosate-based herbicide results in total or partial reversibility of plasma oxidative stress, cecal microbiota abundance and short-chain fatty acid composition in broiler hens, Front. Physiol. 13 (2022), 974688.
[22] F. Geiger, J. Bengtsson, F. Berendse, W.W. Weisser, M. Emmerson, M.B. Morales, P. Ceryngier, J. Liira, T. Tscharntke, C. Winqvist, et al., Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland, Basic Appl. Ecol. 11 (2010) 97–105.
[23] M. Ghisari, M. Long, A. Tabbo, E.C. Bonefeld-Jørgensen, Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture, Toxicol. Appl. Pharmacol. 284 (2015) 292–303.
[24] K. Grote, L. Niemann, B. Selzsam, W. Haider, C. Gericke, M. Herzler, I. Chahoud, Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese Quail (Coturnix coturnix JAPONICA), Environ. Toxicol. Chem. 27 (2008) 2368.
[25] H. Hamdi, I. Ben Salem, Y. Ben Othmène, E. Annabi, S. Abid-Essefi, The involvement of ROS generation on Epoxiconazole-induced toxicity in HCT116 cells, Pestic. Biochem. Physiol. 148 (2018) 62–67.
[26] H. Hamdi, Y.B. Othmène, O. Ammar, A. Klifi, E. Hallara, F.B. Ghali, Z. Houas, M. F. Najjar, S. Abid-Essefi, Oxidative stress, genotoxicity, biochemical and histopathological modifications induced by epoxiconazole in liver and kidney of Wistar rats, Environ. Sci. Pollut. Res 26 (2019) 17535–17547.
[27] C. Handschin, M. Podvinec, J.S. Ckli, K. Hoffmann, U.A. Meyer, Conservation of Signaling Pathways of Xenobiotic- Sensing Orphan Nuclear Receptors, Chicken Xenobiotic Receptor, Constitutive Androstane Receptor, and Pregnane X Receptor, from Birds to Humans, Mol. Endocrinol. 15 (9) (2001) 1571–1585.
[28] D.A. Hansen, P. Esakky, A. Drury, L. Lamb, K.H. Moley, The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Important for Proper Seminiferous Tubule Architecture and Sperm Development in Mice1, Biol. Reprod. 90 (1) (2014) 8.
[29] T. Heise, F. Schmidt, C. Knebel, S. Rieke, W. Haider, R. Pfeil, C. Kneuer, L. Niemann, P. Marx-Stoelting, Hepatotoxic effects of (tri)azole fungicides in a broad dose range, Arch. Toxicol. 89 (2015) 2105–2117.
[30] P. Honkakoski, J.J. Palvimo, L. Penttilä, J. Vepsäläinen, S. Auriola, Effects of triaryl phosphates on mouse and human nuclear receptors, Biochem. Pharmacol. 67 (2004) 97–106.
[31] T. Huang, H. Jiang, Y. Zhao, J. He, H. Cheng, C.J. Martyniuk, A comprehensive review of 1,2,4-triazole fungicide toxicity in zebrafish (Danio rerio): A mitochondrial and metabolic perspective, Sci. Total Environ. 809 (2022), 151177.
[32] R.S. Jeyendran, H.H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B.G. Crabo, L.J.D. Zaneveld, Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics, Reproduction 70 (1984) 219–228.
[33] S.C. Joshi, N. Gulati, B. Sharma, S. Priyanka, Effects of Tebuconazole (A fungicide) on Reproduction of Male Rat, Int. J. Pharma Res. Health Sci. (2016) 2348–6465 (CODEN (USA)-IJPRUR, e-ISSN).
[34] S. Khwanes, R. Mohamed, K. Ibrahim, H. Abd El-Rahman, Ginger reserves testicular spermatogenesis and steroidogenesis in difenoconazole-intoxicated rats

by conducting oxidative stress, apoptosis and proliferation, Andrologia 54 (1) (2022), e14241.
[35] M.B. Kjaerstad, C. Taxvig, H.R. Andersen, C. Nellemann, Mixture effects of endocrine disrupting compounds in vitro, Int. J. Androl. 33 (2010) 425–433.
[36] L.S. Kjeldsen, M. Ghisari, E.C. Bonefeld-Jørgensen, Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity, Toxicol. Appl. Pharmacol. 272 (2013) 453–464.
[37] C. Knebel, The azole fungicide tebuconazole affects human CYP1A1 and CYP1A2 expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway, Food Chem. Toxicol. 123 (2019) 481–491.
[38] C. Knebel, J. Neeb, E. Zahn, F. Schmidt, A. Carazo, O. Holas, P. Pavek, G.P. Püschel, U.M. Zanger, R. Süssmuth, et al., Unexpected Effects of Propiconazole, Tebuconazole, and Their Mixture on the Receptors CAR and PXR in Human Liver Cells, Toxicol. Sci. 163 (2018) 170–181.
[39] C. Knebel, J. Kebben, I. Eberini, L. Palazzolo, H.S. Hammer, R.D. Süssmuth, T. Heise, S. Hessel-Pras, A. Lampen, A. Braeuning, et al., Propiconazole is an activator of AHR and causes concentration additive effects with an established AHR ligand, Arch. Toxicol. 92 (2018) 3471–3486.
[40] H. Kojima, E. Katsura, S. Takeuchi, K. Niiyama, K. Kobayashi, Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells, Environ. Health Perspect. 112 (2004) 524–531.
[41] M. Kojima, T. Tagami, M. Degawa, Cloning of chicken lanosterol 14α-demethylase (CYP51) cDNA: Discovery of a testis-specific CYP51 transcript, Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 145 (2006) 383–389.
[42] L. Kuhnert, M. Giantin, M. Dacasto, S. Halwachs, W. Honscha, AhR-activating pesticides increase the bovine ABCG2 efflux activity in MDCKII-bABCG2 cells, PLoS ONE 15 (2020), e0237163.
[43] N. Kumar, O. Awoyemi, A. Willis, C. Schmitt, L. Ramalingam, N. Moustaid-Moussa, J. Crago, Comparative lipid peroxidation and apoptosis in embryo-larval zebrafish exposed to 3 azole fungicides, tebuconazole, propiconazole, and myclobutanil, at environmentally relevant concentrations, Environ. Toxic. Chem. 38 (2019) 1455–1466.
[44] F. Liu, Y. Wang, L. Chen, B.K. Bello, T. Zhang, H. Yang, X. Li, E. Pan, H. Feng, J. Dong, Difenoconazole disrupts the blood-brain barrier and results in neurotoxicity in carp by inhibiting the Nrf2 pathway mediated ROS accumulation, Ecotoxicol. Environ. Saf. 244 (2022), 114081.
[45] A. Lopez-Antia, M.E. Ortiz-Santaliestra, F. Mougeot, R. Mateo, Experimental exposure of red-legged partridges (Alectoris rufa) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole, Ecotoxicology 22 (2013) 125–138.
[46] A. Lopez-Antia, J. Feliu, P.R. Camarero, M.E. Ortiz-Santaliestra, R. Mateo, Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds using refined field data, J. Appl. Ecol. 53 (2016) 1373–1381.
[47] F. Ma, Y. Li, Y. Yu, Z. Li, L. Lin, Q. Chen, Q. Xu, P. Pan, Y. Wang, R. Ge, Gestational exposure to tebuconazole affects the development of rat fetal Leydig cells, Chemosphere 262 (2021), 127792.
[48] E. Martinot, M. Baptissart, A. Véga, L. Sèdes, B. Rouaisnel, F. Vaz, J.-P. Saru, A. de Haze, S. Baron, F. Caira, et al., Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXRalpha, Sci. Rep. 7 (2017) 42182.
[49] P. Marx-Stoelting, K. Ganzenberg, C. Knebel, F. Schmidt, S. Rieke, H. Hammer, F. Schmidt, O. Pötz, M. Schwarz, A. Braeuning, Hepatotoxic effects of cyproconazole and prochloraz in wild-type and hCAR/hPXR mice, Arch. Toxicol. 91 (2017) 2895–2907.
[50] R. Mateo, N. Petkov, A. Lopez-Antia, J. Rodríguez-Estival, A.J. Green, Risk assessment of lead poisoning and pesticide exposure in the declining population of red-breasted goose (Branta ruficollis) wintering in Eastern Europe, Environ. Res. 151 (2016) 359–367.
[51] A. Matvere, I. Teino, I. Varik, S. Kuuse, T. Tiido, A. Kristjuhan, T. Maimets, FSH/LH-Dependent Upregulation of Ahr in Murine Granulosa Cells Is Controlled by PKA Signaling and Involves Epigenetic Regulation, IJMS 20 (2019) 3068.
[52] P. Mineau, M. Whiteside, Pesticide Acute Toxicity Is a Better Correlate of U.S. Grassland Bird Declines than Agricultural Intensification, PLoS ONE 8 (2013), e57457.
[53] V.U. Nna, A.B. Abu Bakar, A. Ahmad, M. Mohamed, Metformin mitigates impaired testicular lactate transport/utilisation and improves sexual behaviour in streptozotocin-induced diabetic rats, Arch. Physiol. Biochem. 127 (2021) 51–60.
[54] F. Odet, C. Duan, W.D. Willis, E.H. Goulding, A. Kung, E.M. Eddy, E. Goldberg, Expression of the Gene for Mouse Lactate Dehydrogenase C (Ldhc) Is Required for Male Fertility1, Biol. Reprod. 79 (2008) 26–34.
[55] E. Polledri, R. Mercadante, S. Fustinoni, Determination of tebuconazole and penconazole fungicides in rat and human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 32 (2018) 1243–1249.
[56] D.M. Reif, M.T. Martin, S.W. Tan, K.A. Houck, R.S. Judson, A.M. Richard, T. B. Knudsen, D.J. Dix, R.J. Kavlock, Endocrine Profiling and Prioritization of Environmental Chemicals Using ToxCast Data, Environ. Health Perspect. 118 (2010) 1714–1720.
[57] S. Rieke, S. Koehn, K. Hirsch-Ernst, R. Pfeil, C. Kneuer, P. Marx-Stoelting, Combination Effects of (Tri)Azole Fungicides on Hormone Production and Xenobiotic Metabolism in a Human Placental Cell Line, IJERPH 11 (2014) 9660–9679.
[58] M.J.E. Roelofs, A.R. Temming, A.H. Piersma, M. van den Berg, M.B.M. van Duursen, Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro, Toxicol. Rep. 1 (2014) 271–283.
[59] D.L. Roman, D.I. Voiculescu, M. Filip, V. Ostafe, A. Isvoran, Effects of Triazole Fungicides on Soil Microbiota and on the Activities of Enzymes Found in Soil: A Review, Agriculture 11 (2021) 893.
[60] J.T. Sanderson, J. Boerma, G.W.A. Lansbergen, M. van den Berg, Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells, Toxicol. Appl. Pharmacol. 182 (2002) 44–54.
[61] L. Serra, A. Estienne, G. Bourdon, C. Ramé, C. Chevaleyre, P. Didier, M. Chahnamian, S. El Balkhi, P. Froment, J. Dupont, Chronic Dietary Exposure of Roosters to a Glyphosate-Based Herbicide Increases Seminal Plasma Glyphosate and AMPA Concentrations, Alters Sperm Parameters, and Induces Metabolic Disorders in the Progeny, Toxics 9 (2021) 318.
[62] Z. Shi, S. Zou, C. Lu, B. Wu, K. Huang, C. Zhao, X. He, Evaluation of the effects of feeding glyphosate-tolerant soybeans (CP4 EPSPS) on the testis of male Sprague-Dawley rats, GM Crops Food 10 (2019) 181–190.
[63] V. Silva, H.G.J. Mol, P. Zomer, M. Tienstra, C.J. Ritsema, V. Geissen, Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded, Sci. Total Environ. 653 (2019) 1532–1545.
[64] W.H. Walker, Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis, Spermatogenesis 1 (2011) 116–120.
[65] M.K. Walker, S.E. Heid, S.M. Smith, H.I. Swanson, Molecular characterization and developmental expression of the aryl hydrocarbon receptor from the chick embryo. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicol. Endocrinol. 126 (2000) 305–319.
[66] Y. Wang, Y.C. Zhu, W. Li,). Comparative examination on synergistic toxicities of chlorpyrifos, acephate, or tetraconazole mixed with pyrethroid insecticides to honey bees (Apis mellifera L.), Environ. Sci. Pollut. Res 27 (2020) 6971–6980.
[67] T. Wang, M. Ma, C. Chen, X. Yang, Y. Qian, Three widely used pesticides and their mixtures induced cytotoxicity and apoptosis through the ROS-related caspase pathway in HepG2 cells, Food Chem. Toxicol. 152 (2021), 112162.
[68] Y. Wang, Y.-C. Zhu, W. Li, J. Yao, G.V.P. Reddy, L. Lv, Binary and ternary toxicological interactions of clothianidin and eight commonly used pesticides on honey bees (Apis mellifera), Ecotoxicol. Environ. Saf. 223 (2021), 112563.
[69] Y. Wang, X. Ning, G. Li, N. Sang, New insights into potential estrogen agonistic activity of triazole fungicides and coupled metabolic disturbance, J. Hazard. Mater. 424 (2022), 127479.
[70] J. Wang, X. Gao, F. Liu, FangWang, J. Dong, P. Zhao, Difenoconazole causes cardiotoxicity in common carp (Cyprinus carpio): Involvement of oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy, Chemosphere 306 (2022), 135562.
[71] Y. Xie, H. Jiang, J. Chang, Y. Wang, J. Li, H. Wang, Gonadal disruption after single dose exposure of prothioconazole and prothioconazole-desthio in male lizards (Eremias argus), Environ. Pollut. 255 (2019), 113297.
[73] W. Zhang, N. Ou, Z. Liang, R. Hu, Y. Song, Y. Yang, X. Liu, Relationship between aryl hydrocarbon receptor and spermatogenic dysfunction in male patients with varicocele, Andrologia 52 (2020), e13792.

II. Bernardi et al., 2024

Bernardi, O., **Fréville, M.**, Ramé, C., Reverchon, M., and Dupont, J. (2024). Chemerin concentration in egg white in layer and broiler hens during the laying period for 2 successive generations. *Poultry Science* 103, 103342. doi: 10.1016/j.psj.2023.103342

Poultry Science®

Chemerin concentration in egg white in layer and broiler hens during the laying period for 2 successive generations

Ophélie Bernardi,[*,†] Mathias Fréville,[†] Christelle Ramé,[†] Maxime Reverchon [*] and Joëlle Dupont[†,1]

[*]*French Poultry and Aquaculture Breeders Technical Center, Centre INRAE Val de Loire, F-37380 Nouzilly, France; and* [†]*National Centre for Scientific Research, French Institute of Horse and Riding, Research for Agriculture Food and Environment, Tours University, Physiology of Reproduction and Behaviors, UMR85, F-37280 Nouzilly, France*

ABSTRACT The genetic selection progress in layers and broilers makes poultry production one of the fastest growing industries. Objectives of the breeding companies are the stability or the increase in the laying rate and the production of viable chicks. New biomarkers are necessary to improve reproductive and egg performances. Chemerin (**Chem**) produced by oviduct accumulates in egg white (**EW**). Here, we hypothesized that EW Chem concentration was dependent on the stage of laying and on the breed (layer vs. broiler). In addition, they could be associated to laying performance and fertility parameters. In breeding companies, we collected during 2 successive generations (G0 (mother) and G1 (daughter)) eggs from 100 layers and 100 broilers hens during 5 d at 3 stages: before, after laying peak and at the end of laying period. For each egg, the EW was sampled to measure Chem concentration by ELISA assay. In each generation at the end of laying period, magnums from oviduct, where the EG is formed, were collected in layers and broilers in order to investigate Chem differential expression by RT-qPCR between both breeds. Chem concentration in EW was dependent on the time of laying period and its profile was differently regulated in layers and broilers. Indeed, it increased at the end of laying in layers whereas it decreased after the laying peak in broilers. At the end of laying period, Chem concentration in EW was almost 2-fold higher in layers than in broilers and this was confirmed in both G0 and G1 generations at the Chem mRNA and protein levels in the magnum. For the 2 successive generations, Chem concentration in EW was negatively correlated with the laying rate and the fertility parameter in broiler hens whereas it was negatively correlated with the egg quality (weight of whole egg and weight of albumen) and positively with the fertility rate at some time of laying in layer hens. Taken together, the Chem concentration in EW could be a potential predictive tool for reproductive parameters in genetic selection.

Key words: layer, broiler, hens, chemerin, egg white

2024 Poultry Science 103:103342
https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103342

INTRODUCTION

For several decades, the poultry industry (egg or meat) is one of the economically important agronomic production (Mottet and Tempio, 2017). The performance and productivity of chickens has increased considerably. In European Union (**EU**), the laying breed produced around 116 billion eggs, which represented 9.4% of the world's production in 2020 (Bonnefous et al., 2022) and poultry meat is the most consumed in the world (Statistiques agricoles de l'OCDE, 2022). The genetic selection has led to significant progress in poultry production by improving reproductive traits in layer hens and production traits in broiler chickens (Emmerson, 1997; Buzała et al., 2015; Nangsuay et al., 2015). In particular for commercial broilers, intensive genetic selection has resulted in the production of heavy animals developing metabolic and reproductive disorders (Richards and Proszkowiec-Weglarz, 2007). However, rapid growth is always associated with an alteration of reproductive capacities such as high sexual precocity, multiple ovulations with a disorganization of follicle hierarchy and a decrease of egg production, fertility and hatchability (Dunnington and Siegel, 1984; Briere et al., 2011; Mellouk et al., 2018c; Zhang et al., 2018). To avoid negative impact on reproduction and improve genetic selection, strategies have been developed, such as dietary restriction or identification of reproductive biomarkers (Renema et al., 1999; Pan et al., 2014). However, these feeding strategies are often associated with undesirable effects on animal behavior

© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Received September 25, 2023.
Accepted November 29, 2023.

[1]Corresponding author: joelle.dupont@inrae.fr

and therefore animal welfare (Savory and Lariviere, 2000). In addition, in the face of societal pressures about animal welfare and sustainability, breeding companies should use fewer birds being slaughtered and required throughout the production system (EFSA, 2010). One potential solution could be identified and used reproductive biomarkers as genetic selection's tools to improve production performances of animals and select hens with optimal sizes.

In domestic poultry, it is well known the close relationship between metabolism and reproductive efficiency (Mellouk et al., 2018a). Furthermore, it is well known that metabolic changes influence the reproductive system by the secretion of hormones such as adipokines produced mainly by the white adipose tissue. Chemerin, also named tazarotene-induced gene 2 (**TIG2**) or retinoic acid receptor responder 2 (**RARRES2**), is one of these adipokines synthetized by the white adipose tissue but also by the liver. Chemerin is involved in many physiological functions as the regulation of the immune system, adipogenesis, angiogenesis, reproduction and metabolism through binding to 3 G-coupled receptors with 7 transmembrane domains named Chemokine like receptor 1 (**CMKLR1**), G protein receptor 1 (**GPR1**), and C-C chemokine receptor-like 2 (**CCRL2**) (Yoshimura and Oppenheim, 2011; Bernardi et al., 2021). In birds, more data are available about chemerin's effect on reproduction. Previous studies indicated that chemerin and its receptors are locally predominantly in the magnum of the hen oviduct, where the egg white is formed (Estienne et al., 2022). Moreover, the authors showed that chemerin is accumulated in the egg white suggesting an influence during the embryo development given that chemerin system is also present in embryonic annexes and fluids (Estienne et al., 2022). Plasma chemerin levels are negatively correlated with egg hatchability in chicken (Mellouk et al., 2018b). Moreover, Bernardi et al. (2022) showed negative correlations between chemerin levels in egg white and 2 reproductive parameters as fecundity and fertility in experimental laying hens (Bernardi et al., 2022). In a recent study, the authors observed that chemerin and its receptors were expressed in the pheasant oviduct with an accumulation in magnum and consequently in the egg white. In addition, chemerin levels in the egg white were positively correlated with the hatchability rates in pheasant (Estienne et al., 2023). Thus, chemerin in egg white could be associated with avian hen reproductive parameters and could be a biomarker of the egg and embryo quality in genetic selection. However, we never determined whether the laying period and the breed (broiler vs. layer) could be variation factors of chemerin concentration in egg white and if these variations of egg white chemerin could be also observed to the next generation. In the present study, one hypothesis is that genetic selection made on different hen breeds for meat and egg production, has an influence on chemerin concentrations in egg white and consequently could be associated to variations of the laying and reproductive performance.

Thus, the objectives of the present study were to 1) determine the egg white concentrations of chemerin at different periods of laying (before and after the laying peak and at the end of the laying) on 2 G0 and G1 generations in layer and broiler hens and 2) investigate the potential link of chemerin levels in egg white with the laying and egg performances and reproductive parameters in order to evaluate chemerin as a potential egg white biomarker of performance in hens.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Issues

According to the ethical issues for the protection of animals, this project does not require the consent of the competent ethics committee for animal experiments. At the end of the laying period, animals were slaughtered for the meat at the local abattoir and the oviduct was collected. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/UE.

Animals and Samples Collection

About 100 layer hens Rhode Island from ISA, Hendrix Genetics (Saint-Brieuc, France) and 100 broiler breeder hens from Hubbard (Mauguerand, France) and SASSO (Sabres, France) and their respectively offsprings were followed during the entire period of laying and reared at the industrial unit respectively under conventional breeding conditions. All data about laying and egg performance and reproductive parameters were recorded and provided by the breeding companies.

At 3 times of the laying period (1/before laying peak, 2/after laying peak, and 3/end of laying), eggs were collected daily during 5 successive laying days in order to weigh the whole egg, egg white and yolk individually. For each egg, an egg white sample was collected and stored at −20°C until analyses. The experimental design is summarized in Figure 1 and the age of the layer and broiler hens during the 3 periods of laying are indicated in Table 1. The experiment was also realized with the offsprings of these hens (100 layer and 100 broiler hens of the next generation named G1). During the collect 3/end of laying, 10 hens were selected randomly, euthanized by electrical stunning as recommended by the ethical committee. Their oviducts were dissected in order to collect a sample of magnum and stored at −20°C until use. In first generation G0, 13 layer hens and 34 broiler hens were eliminated from the protocol and 14 layer hens for offsprings G1 because they laid less than 3 eggs during the collect for 5 successive laying days.

Chemerin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Chemerin concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assays (**ELISA**) from egg white of eggs collected as previously described (Bernardi et al.,

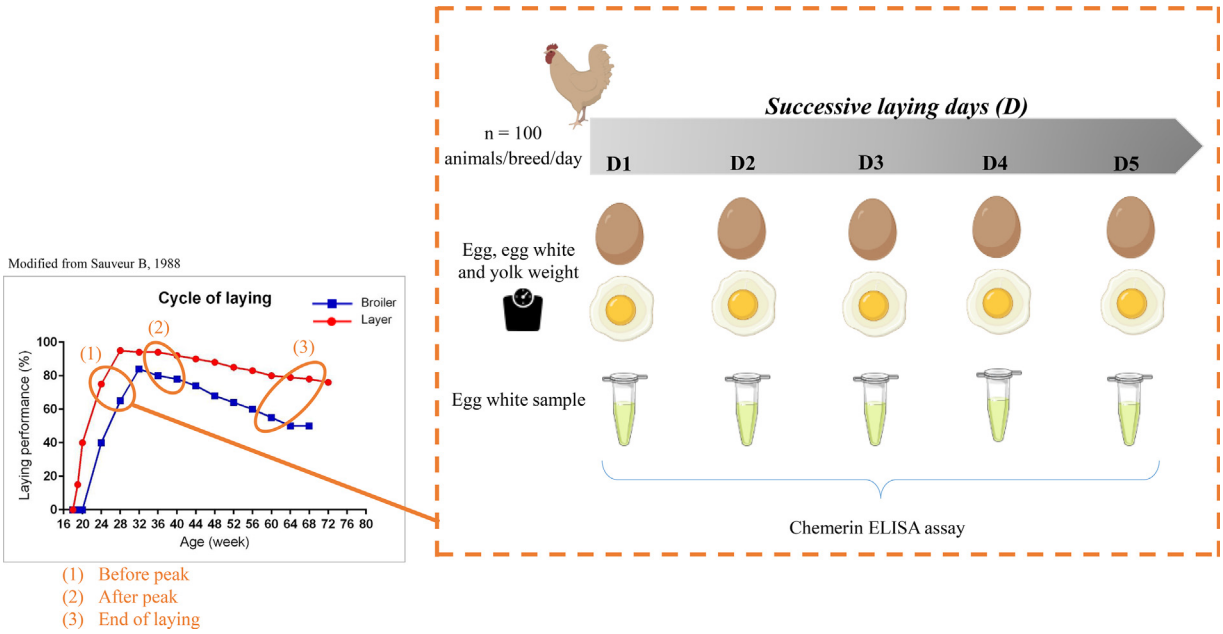


Figure 1. Design experimental. Hundred layer and broilers hens and their offsprings were followed at 3 times of the laying period: before and after laying peak and at the end of laying. For each time and during 5 successive laying days, eggs were collected in order to weigh the whole egg, egg white (albumen), and yolk individually. For each egg, an albumen sample was stored at −20°C until use.

2022). The recombinant chicken chemerin protein (full length, rRARRES2) was obtained from the *Gallus gallus* sequence (NM_001277476.1), produced in Escherichia coli and purified by a chromatography column-based on His-Tag under denaturing conditions (Agro-Bio, La Ferté Saint Aubin, France). Monoclonal chicken chemerin antibodies were produced by AgroBio (La Ferté Saint Aubin, France), and their specificity was tested as previously described (Mellouk et al., 2018b; Estienne et al., 2021). Microtiter plates (NUNC Maxisorb, ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) were coated with bovine serum albumin (100 mM sodium bicarbonate, pH 9.6) at 4°C for 16 h. After blocking of free binding sites with 200 μL of assay buffer containing 0.2% bovine serum albumin and 0.01% Tween 20 in phosphate-buffered saline pH 7.3 at RT for 1 h, the plates were washed 3 times with phosphate-buffered saline containing 0.01% Tween 20, filled with 200 μL of assay buffer. Then, serial 2-fold dilutions of the chicken recombinant chemerin (256-2 ng/mL) were prepared in the assay buffer to generate the calibration curve. For the assay, plates were decanted, and 100 μL of reference recombinant chicken chemerin or prediluted white egg in lysis buffer (Tris (hydroxymethyl)aminomethane buffer 1 M (pH 7.4), sodium chloride 0.15 M, ethylenediaminetetraacetic 1.3 mM, ethylene glycol-bis-(beta-aminoethylether)-N, N,N',N'-tetraacetic acid 1 mM, sodium orthovanadate 1.3 mM, sodium fluoride 0.1 M, sodium dihydrogenophosphate 1%, Triton 0.5%) (1/2) were pipetted in duplicate into the specified wells and then incubated for 3 h at room temperature (**RT**). After 3 washings, 100 μL of the monoclonal chicken antibody (used at final concentrations of 100 ng/mL) was added and the plate was incubated for 1 h at RT. After 3 washings, 100 μL of anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1/2,000; Sigma; A1949) was added and incubated for 1 h at RT. After 3 washings, the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate solution (100 μL) was added and incubated for 30 min at RT in the dark. The reaction was stopped with 50 μL of 1 M sulfuric acid, and optical density was determined at 450 nm with a microtiter plate reader (Tecan, Magellan, Männedorf, Switzerland). A standard curve was drawn for the determination of chemerin levels. The accuracy of the chicken chemerin ELISA was determined by showing parallelism of serial dilutions of chicken egg white samples and the standard curve (determined from recombinant chicken chemerin). No cross-reactivity was shown for human, bovine, ovine and goat serum samples. The mean recovery of 4 different concentrations of

Table 1. Age of the layer and broiler hens before and after the laying peak and at the end of laying at the G0 (A) and G1 (B) generations.

A		
G0 age (week)	Layer hens ($n = 100$)	Broiler hens ($n = 100$)
Before laying peak	24	25
After laying peak	31	40
End of laying	76	70
B		
G1 age (week)	Layer hens ($n = 100$)	Broiler hens ($n = 100$)
Before laying peak	21	25
After laying peak	29	40
End of laying	83	65

recombinant chicken chemerin spiked into egg white sample determined in 4 different dilutions was 116% ± 8.5. The intra-assay and interassay variation were determined by repeated measurement ($n = 10$) of 2 different egg white samples at 2 different dilutions ($n = 4$) within one assay plate and across different assays ($n = 8$). The mean intra-assay CV was 8%, the interassay CV was 11% for egg white samples.

Reverse Transcription and Quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from the magnum of 10 laying hens in G0 and G1 and 5 and 10 broiler hens in G0 and G1 at the end of laying period (Table 1), respectively by the homogenization of 100 mg of tissue in lysis buffer reagent, using a total RNA extraction kit according to the manufacturer's recommendations (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, Hoerdt, France). The complementary DNA (**cDNA**) was generated by reverse transcription (**RT**) of total RNA (1 μg) in a mixture comprised of 0.5 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 2 M of RT buffer, 15 μg/μL of oligodT, 0.125 U of ribonuclease inhibitor, and 0.05 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (**MMLV**) for 1 h at 37°C. Real-time PCR was performed using the CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in a mixture containing SYBR Green Supermix 1 × reagent (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), 250 nM specific chicken primers (Invitrogen by Life Technologies, Villebon sur Yvette, France, see Table 2) and 5 μL of cDNA (diluted 5-fold) for a total volume of 20 μL. The samples were duplicated on the same plate, and the following PCR procedure was used. After an incubation of 2 min at 50°C and a denaturation step of 10 min at 95°C, samples were subjected to 40 cycles (30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C). The expression levels of messenger RNA were standardized to 3 reference genes (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (**EEF1**), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (**GAPDH**), and β actin). RARRES2, CMKLR1, GPR1, and CCRL2 mRNA expression was calculated according to primer efficiency (E) and quantification cycle (Cq), where expression = E−Cq. Then, the relative expression of the target genes to the geometric mean of the 3 reference genes was analyzed.

Detection and Quantification of Chemerin by Western Blot Analysis

Magnum samples of layer ($n = 6$) and broiler ($n = 4$) reproductive tracts at the end of laying period were lysed using and Ultraturax (Invitrogen by Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) in lysis buffer 50% (vol/vol, Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer 1 M (pH 7.4), sodium chloride 0.15 M, ethylenediaminetetraacetic 1.3 mM, ethylene glycol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid 1 mM, sodium orthovanadate 1.3 mM, sodium fluoride 0.1 M, sodium dihydrogenophosphate 1%, Triton 0.5%). The protein concentration of lysates was measured using the bicinchoninic acid (**BCA**) protein assay (Interchim, Montluçon, France). Samples (80 μg) were mixed with Laemmli buffer 5× and proteins were denatured for 5 min by heating at 95°C. Proteins were loaded on an electrophoresis sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with Tris-Buffered Saline Tween buffer containing 0.05% of Tween 20 and 5% of milk for 30 min at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with the monoclonal anti-chicken chemerin antibody (AgroBio, France). Then, membranes were washes 5 times for 5 min with Tris-Buffered Saline Tween buffer containing 0.05% of Tween 20 and then incubated 90 min at room temperature with a Horse Radish Peroxidase-conjugated anti-mouse IgG. Chemerin protein was detected by enhanced chemiluminescence (**ECL**, Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) with a G-box SynGene (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) and the GeneSnap software (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Then, protein amounts were quantified with GeneTools software. The results were expressed as the intensity signal in arbitrary units after normalization of protein signals with the total protein amount as evaluated by Ponceau-red staining.

Statistical Analysis

The GraphPad Prism software (version 6) was used for all analyses. All data are represented as means ± standard error of mean (**SEM**) with a level of significance less or equal than 0.05 ($P \leq 0.05$). Data were compared by 1-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparisons tests. A Pearson test was used to analyze

Table 2. List of primers (*Gallus gallus*) used for RT-qPCR.

Gene	Primer forward	Primer reverse
Chemerin	CGCGTGGTGAAGGATGTG	CGACTGCTCCCTAAAGAGGAACT
CMKLR1	CGGTCAACGCCATTTGGT	GGGTAGGAAGATGTTGAAGGAA
GPR1	ACCTGCCTGAGGAAGAAGAA	AAAGGCCAGTGGAAGCCCAT
CCRL2	CACGCAGTGTTTGCTTTAAAAGC	CAACAGCCCACGTGACAATG
β-actin	ACGGAACCACAGTTTATCATC	GTCCCAGTCTTCAACTATACC
GAPDH	TGCTGCCCAGAACATCATCC	ATCAGCAGCAGCCTTCACTACC
EEF1a	AGCAGACTTTGTGACCTTGCC	TGACATGAGACAGACGGTTGC

correlations. The correlation was noted "r" and the P value was considered significant if P value <0.05. Different letters indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Laying Performance and Reproductive Parameters of G0 and G1 Layer and Broiler Hens

For the first generation G0, laying and reproductive data obtained from the whole lifetime of animals are shown for the layer ($n = 87$) and broiler hens ($n = 68$) in Table 3A. As expected, we observed a significantly higher laying rate for the layer breed compared to the broiler breed (92.63 ± 0.90% vs. 66.12 ± 1.62%, $P <$ 0.0001). However, focusing on reproductive parameters, fertility and hatchability rates were significantly higher (85.14 ± 1.98% vs. 72.10 ± 1.77% and 88.89 ± 1.97% vs. 79.26 ± 1.54%, respectively) and embryo mortality (early and late combined) significantly lower (12.83 ± 1.97% vs. 20.74 ± 1.54%) in broiler compared to layer breed ($P = 0.0016$) (Table 3A). We next studied the G1 next generation with 86 layers and 100 broiler hens. Laying and reproductive parameters of these animals are shown in Table 3B. As observed in G0 generation, the laying rate was significantly higher in layer as compared to broiler breed (88.28 ± 1.01% vs. 74.71 ± 1.08%, $P <$ 0.0001) and the opposite was observed for the fertility rate (73.43 ± 2.26% vs. 87.31 ± 1.29%, $P < 0.0001$). However, we did not find any significant difference between the 2 breeds at G1 for the hatchability (83.55 ± 1.70% vs. 80.51 ± 2.17%, $P = 0.2838$) and embryo mortality rates (14.99 ± 1.33% vs. 14.90 ± 2.17%, $P = 0.9733$) (Table 3A).

Egg Performances of G0 and G1 Layer and Broiler Hens

We next determined the egg, albumen and yolk weights in layer and broiler hens during 3 periods of laying (before and after laying peak and end of laying) at G0 and G1 generation as described in materials and methods. As expected we observed a laying period effect (noted T in the Figure 2) for all the studied parameters in both G0 and G1 (($P < 0.0001$; Figure 2A−F). The weights of the whole egg, albumen and yolk egg were significantly higher after laying peak or end of laying as compared to before the laying peak. In G0, we showed a breed effect (noted G on the figure) for the egg ($P <$ 0.0001) and yolk ($P < 0.0001$) weight but not for the albumen weight (($P = 0.1369$) Figure 2A. Indeed, broiler hens had whole egg and yolk egg weights higher than layer hens and this was observed whatever the laying period (before and after laying peak and at the end of laying, $P < 0.01$, Figure 2A−C). Similar data were observed in the next G1 generation except for the albumen weight that was significantly higher in broiler than in layer hens before laying peak and end of laying ($P <$ 0.001; Figure 2D−F). In both G0 and G1 for all parameters, we found a significant interaction between the period of laying and the breed (noted GxT in the Figure 2) except for the yolk weight at G0 ($P = 0.56$).

Chemerin Concentration in Egg White of G0 and G1 Layer and Broiler Hens

We next investigated the chemerin concentrations in egg white during the period of laying in layer and broiler animals for G0 and G1 generations (Figure 3). As shown in Figure 3A to C, the profile of chemerin concentration

Table 3. Reproductive parameters of the different breed at the generation G0 (A) and G1 (B). Data are shown as the mean ± SEM; $n = 68$ to 100 animals per breed. P value is indicated.

A

G0	Layer breed ($n = 87$)	Broiler breed ($n = 68$)	P value
Laying rate (%)	92.63 ± 0.90	66.12 ± 1.62	<0.0001 ****
Fertility rate (%)	72.10 ± 1.77	85.14 ± 1.98	<0.0001 ****
Hatchability rate (%)	79.26 ± 1.54	88.89 ± 1.97	0.0001 ***
Embryo mortality rate (%)	20.74 ± 1.54	12.83 ± 1.97	0.0016 **

B

G1	Layer breed ($n = 86$)	Broiler breed ($n = 100$)	P value
Laying rate (%)	88.28 ± 1.01	74.71 ± 1.08	<0.0001 ****
Fertility rate (%)	73.43 ± 2.26	87.31 ± 1.29	<0.0001 ****
Hatchability rate (%)	83.55 ± 1.70	80.51 ± 2.17	0.2838
Embryo mortality rate (%)	14.99 ± 1.33	14.90 ± 2.17	0.9733

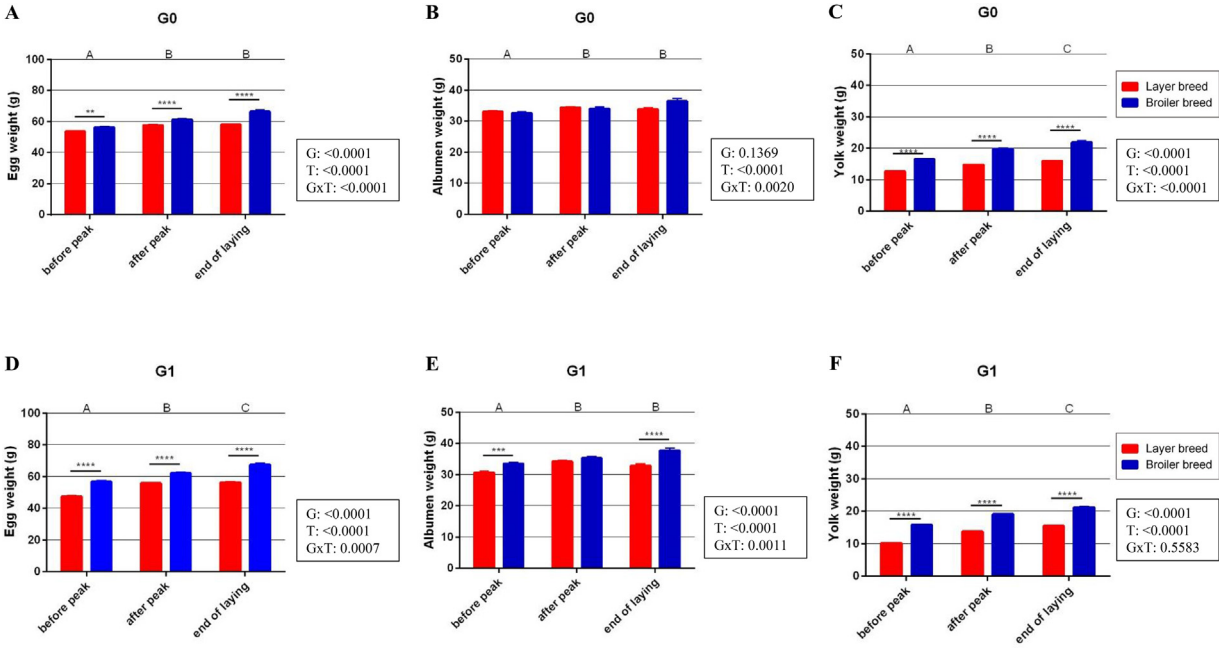


Figure 2. Egg performances for each breed for both generation during the cycle of laying. Egg, albumen, and yolk weight for the first generation G0 (A−C) and offsprings G1 (D−F) during the cycle of laying ($n = 68-100$ animals per breed). Data are shown as the mean ± SEM. Different capital letters indicate a significant laying period effect (E) and different asterisks ** indicate significant differences between layer and broiler hens as breed effect (G) at $P < 0.01$; ***$P < 0.001$ and ****$P < 0.0001$. An interaction between breed and period of laying (GxT) was analyzed.

in egg white during the laying period was significantly different between layer and broiler animals in G0 generation. Indeed, in layer hens, egg white chemerin concentration was significantly lower before or after the laying peak as compared to the end of laying whereas in broiler hens it was significantly higher before the laying peak (Figure 3A and B). After a 2-way ANOVA statistical analysis, we observed significant effects for the period of the laying ($P = 0.0008$), the breed ($P = 0.0008$) and the interaction between of these 2 factors ($P < 0.0001$) (Figure 3C). At the end of laying period, egg white chemerin concentration was almost 2-fold higher in layer

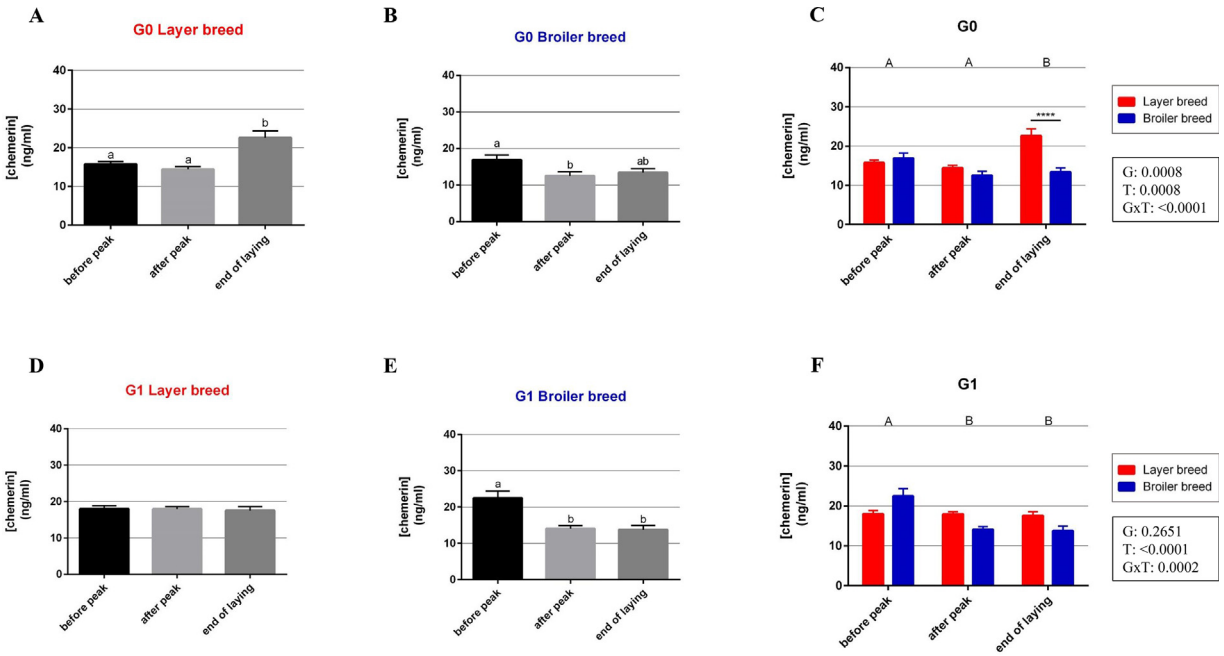


Figure 3. Concentration of chemerin in egg white in each breed for both generation during the cycle of laying. Concentration of chemerin in egg white for layer and broiler breeds at first generation G0 (A, B) and second generation G1 (D, E) during different times of laying was determined by ELISA assay. For each generation, 1-way ANOVA to analyze the effect of laying period (A, B, D, and E) and the 2-way ANOVA were used to determine a breed (G) and a laying period (T) effect and an interaction (GxT) for the concentration of chemerin in egg white (C, F). Data are shown as the mean ± SEM. Different capital and lowercase letters indicate a significant laying period effect (E) and different asterisks **** indicate significant differences between layer and broiler hens as a breed effect (G) at $P < 0.0001$.

Table 4. Pearson correlation coefficient (r) calculated between chemerin concentrations in egg white with egg performances and reproductive parameters in layer breed (A) and broiler breed (B) for the first generation G0. The correlation noted "r" and P value was significant if $P < 0.05$. NS indicated no difference significant.

A

r P value	Egg weight	Albumen weight	Yolk weight	Laying	Fertility	Hatchability	Embryo mortality
All the laying period	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Before laying peak	−0.22 0.034	−0.27 0.009	NS	NS	0.26 0.017	NS	NS
After laying peak	NS	−0.21 0.040	0.28 0.006	NS	NS	NS	NS
End of laying	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

B

r P value	Egg weight	Albumen weight	Yolk weight	Laying	Fertility	Hatchability	Embryo mortality
All the laying period	NS	NS	NS	−0.51 <0.0001	NS	−0.29 0.0181	0.29 0.0188
Before laying peak	NS	NS	NS	−0.49 0.0001	NS	NS	NS
After laying peak	NS	NS	NS	−0.34 0.012	NS	NS	0.29 0.0381
End of laying	NS	NS	NS	−0.46 0.0012	−0.31 0.037	NS	NS

(22.6 ± 1.80 ng/mL) as compared to broiler hens (13.40 ± 1.06 ng/mL; Figure 3C). Concerning the offsprings (G1 generation), we did not show any variation of egg white chemerin concentration during the laying period in layer hens (Figure 3D) whereas in broiler hens egg white chemerin concentrations were higher before than after the peak of laying (Figure 3E) as already observed in G0 generation. Two-way ANOVA statistical analysis revealed no effect of the breed but an effect of the laying period (Figure 3F).

Chemerin Concentration in Egg White Associated With Performances Parameters

We next analyzed the potential link between the chemerin concentrations in egg white and the laying and egg performances and reproductive parameters by using the Pearson correlation statistical method for both G0 and G1 generation (Tables 4 and 5).

Concerning the first G0 generation of layer breed, our results indicated that before laying peak the chemerin

Table 5. Pearson correlation coefficient (r) calculated between chemerin concentrations in egg white with egg performances and reproductive parameters in layer breed (A) and broiler breed (B) for the second generation G1. The correlation noted "r" and P value was significant if $P < 0.05$. NS indicated no difference significant.

A

R P-value	Egg weight	Albumen weight	Yolk weight	Laying	Fertility	Hatchability	Embryo mortality
All the laying period	−0.35 0.0011	−0.31 0.0042	NS	NS	NS	NS	NS
Before laying peak	−0.37 0.0007	−0.35 0.0013	NS	NS	NS	NS	NS
After laying peak	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
End of laying	−0.41 0.0019	−0.46 0.0005	NS	NS	0.31 0.023	NS	NS

B

R P value	Egg weight	Albumen weight	Yolk weight	Laying	Fertility	Hatchability	Embryo mortality
All the laying period	NS	NS	NS	−0.46 <0.0001	−0.21 0.048	NS	NS
Before laying peak	NS	NS	−0.39 0.0018	−0.54 <0.0001	NS	NS	NS
After laying peak	NS	NS	NS	−0.29 0.0041	−0.23 0.031	NS	NS
End of laying	NS	NS	NS	−0.37 0.0008	−0.27 0.024	NS	NS

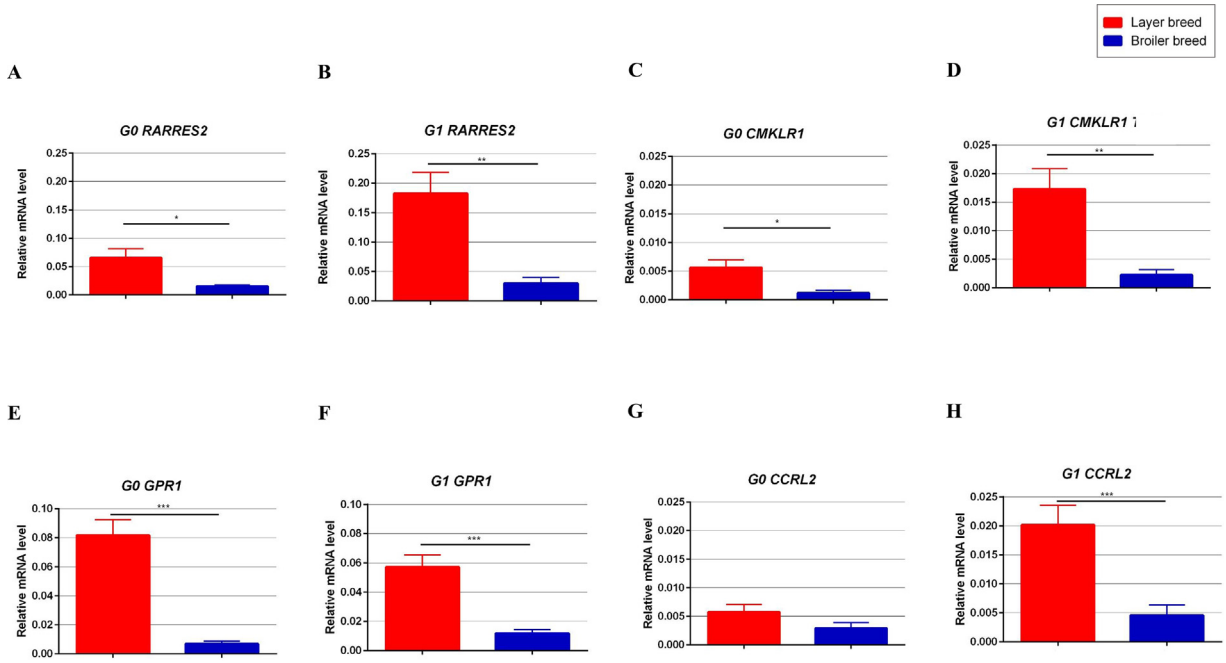


Figure 4. Expression of chemerin and its receptors in the magnum of the oviduct of layer and broiler hens at G0 and G1 generation. Relative mRNA expression of RARRES2 (chemerin gene) (A, B) and its 3 receptors CMKLR1 (C, D), GPR1 (E, F), and CCRL2 (G, H) in the magnum of broiler and layer oviduct at G0 and G1 generation quantified by RT-qPCR ($n = 5–10$). Values are expressed as mean ± SEM. Different asterisks * indicate significant differences between layer and broiler hens at $P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.01$.

levels in egg white were negatively correlated with the egg weight ($r = -0.22$, $P = 0.034$) and with the albumen weight ($r = -0.27$, $P = 0.009$) whereas they were positively correlated with the fertility ($r = 0.26$, $P = 0.017$) (Table 4A). After laying peak, we found that the chemerin concentrations in egg white were positively correlated with the yolk weight ($r = 0.28$, $P = 0.006$) and negatively with the albumen weight ($r = -0.21$, $P = 0.040$) (Table 4A). No significant correlation was observed at the end of laying period or during all the laying period. Concerning the first G0 generation of broiler breed (Table 4B), we found significant negative correlations between the chemerin egg white and the laying rate during all the laying period ($r = -0.51$, $P < 0.0001$), before ($r = -0.49$, $P = 0.0001$) and after the laying peak ($r = -0.34$, $P = 0.012$) and at the end of laying period ($r = -0.46$, $P = 0.0012$) (Table 4B). Negative correlations were also observed with the fertility rate at the end of laying ($r = -0.31$, $P = 0.037$) and with the hatchability rate during all the laying period ($r = -0.29$, $P = 0.018$) and positive correlations with the embryo mortality levels during all the laying period ($r = 0.29$, $P = 0.019$) and specifically after the laying peak ($r = 0.29$, $P = 0.038$) (Table 4B).

For the next G1 generation, chemerin amounts in egg white of layer hens were negatively correlated with egg weight before laying peak ($r = -0.37$, $P = 0.007$) as in G0 generation, at the end of laying ($r = -0.41$, $P = 0.0019$) and during all the laying period ($r = -0.35$, $P = 0.0011$) and with albumen weight ($r = -0.35$, $P = 0.0013$) before laying peak as G0, at the end of laying ($r = -0.46$, $P = 0.0005$) and during all the laying period ($r = -0.31$, $P = 0.0042$) (Table 5A). However, we found a positive correlation with the fertility rate ($r = 0.31$, $P = 0.023$) (Table 5A) as observed in G0 generation before the laying peak. For the broiler breed, we showed a negative correlation between yolk weight and chemerin levels in egg white before laying peak ($r = -0.39$, $P = 0.0018$) (Table 5B). Concerning the reproductive parameters, chemerin concentrations in egg white were negatively correlated whatever the period of the laying as already showed in G0 generation ($r = -0.54$, $P < 0.0001$ before the laying peak; $r = -0.29$, $P = 0.00141$ after the laying peak, $r = -0.37$, $P = 0.0008$ at end of laying and $r = -0.46$, $P < 0.0001$ during all the laying period) (Table 5B). In addition, we observed negative correlations between the albumen chemerin concentration and fertility rate at the end of laying ($r = -0.27$, $P = 0.024$) as already showed in G0 but also after laying peak ($r = -0.23$, $P = 0.031$) and during all the laying period ($r = -0.21$, $P = 0.048$) (Table 5B).

Chemerin and Chemerin Receptors Expression in the Magnum of Oviduct

Since we previously showed that the chemerin in egg white comes from the magnum during the egg formation, we investigated the expression of chemerin (RARRES2 gene) and its 3 receptors (CMKLR1, GPR1, and CCRL2) in the magnum of layer and broiler animals at the end of the laying period at the 2 generations. We found that RARRES2 was significantly more expressed in layer than in broiler hens at both G0 (Figure 4A) and G1 generation (Figure 4B). Similar results were obtained for CMKLR1 (Figure 4C and D), GRP1 (Figure 4E and F), and CCRL2 (Figure 4G and H).

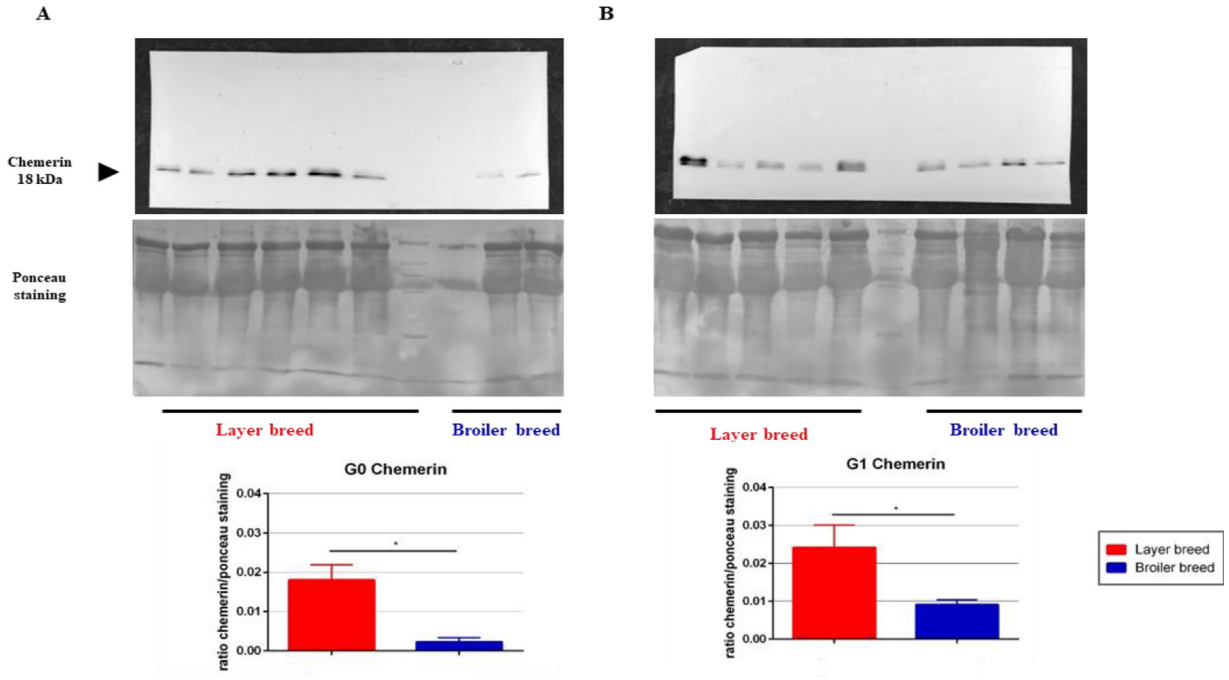


Figure 5. Abundance of chemerin in magnum in each breed for both generation. Protein amount of chemerin in magnum of layer and broiler hens for the first generation G0 (A) and second generation G1 (B) detected by Western blotting. The ratio protein/Ponceau is represented. Different asterisks * indicate significant differences between layer and broiler hens at $P < 0.05$.

We decided to go further by comparing the protein amount of chemerin within the magnum of layer and broiler breeds at the end of laying but also in their offsprings by western blotting analysis. We confirmed that chemerin protein levels were higher in the magnum of layer hens than those of broiler hens and this result was observed in both G0 and G1 generation (Figure 5A and B).

DISCUSSION

In the present study, we showed for the first time that chemerin concentrations in egg white differ between layer and broiler breeder hens according the period of laying during 2 G0 and G1 successive generations. Moreover, chemerin concentrations in egg white were associated to egg and laying performances and some reproductive parameters.

Laying and Reproductive Performances for Broiler and Layer Hens in Both Generations

It is well known that layer hens are characterized by a greater number of eggs laid in comparison with broiler hens. Moreover, the hen age affects the laying rate and the egg quality with a decrease in the egg production at the end of laying associated with an increase in the egg weight (Gumułka and Kapkowska, 2005; Zakaria et al., 2009). In both layer and broiler animals, we observed that when animals age, the weight of the yolk increases more than those of albumen. Our data are in good agreement with the literature. Indeed, the proportion of yolk is negatively related to egg size but positively to hen age. As the hen ages, the weights of egg white and yolk increase but the yolk increases at a faster rate and, therefore, makes up a greater proportion of the egg than egg white (Johnston and Gous, 2007; Zakaria et al., 2009). We also showed that the weight of eggs or albumen or yolk from broiler breed was significantly higher than eggs from commercial layers. A previous study indicated that eggs with less yolk content present worse hatchability rates (Ayeni et al., 2018). Indeed, our results showed that eggs from broiler hens present more yolk than layer hens and it is associated with better reproductive parameters as fertility and hatchability rates. The layer breed lays more eggs but these are less fertile compared to the broiler eggs.

Chemerin Egg White Concentrations During the Laying Cycle in Broiler and Layer Eggs in Both Generations

In our study, we showed for the first time that chemerin concentration in egg white after the peak of laying (end of laying) increased in layer hens whereas it decreased in broiler eggs. These data were observed only at G0 generation for layer eggs whereas it was confirmed at G1 in broiler eggs. In addition, we observed that the chemerin concentration in egg white was almost 2-fold higher in layer than in broiler at the end of the laying period at G0 generation. We confirmed these results in both G0 and G1 generations by immunoblotting at the chemerin protein levels in the magnum where the egg white is synthetized and secreted. Moreover, a potential heritability of chemerin concentrations in egg white

between generations is currently in progress in order to confirm if these biomarker is heritable to offsprings. However, even though both breeds were bred under the same conditions, the composition of their diets varied, since broiler and layers animals have different needs. So we cannot rule out the possibility that the differences in chemerin concentration in egg white observed between the 2 breeds are due to their diet. However, it is well known that the composition of egg white is less dependent on diet composition than that of egg yolk (Palomar et al., 2023). These data suggest the existence of a complex synergistic effect of breed-specific genotype and egg white environment early in chicken development with egg white chemerin as a potential mediator of physiological and morphological effects. Indeed, we previously showed that chemerin could be positively involved in the chicken embryo development (Estienne et al., 2022). In addition, we demonstrated that chicken chemerin could exert an antimicrobial activity (Estienne et al., 2022). Thus, we can speculate that at the end of laying period, the layer egg hens could be more protected against microbial infection than the broiler egg hens.

Chemerin Egg White Concentrations Associated With Laying and Reproductive Performances?

By using the person correlation statistical method, we showed only in broiler and not in layer breed in both G0 and G1 generation a significant negative correlation between egg white chemerin concentration and the laying rate. Furthermore, this result was observed whatever the period of laying (before, after the peak of laying and at the end of the laying). How chemerin in egg white could regulate the egg performance remains to be determined. The laying rate is dependent on the environmental and metabolic factors, but also to the factors related to growth, development, ovulation, atresia, and regression in the chicken ovary follicle (Etches et al., 1983). In mammals (bovine, human, pig, rodents), chemerin is able to regulate the ovarian granulosa and theca cell proliferation and progesterone production (Reverchon et al., 2012,2014; Wang et al., 2012; Rytelewska et al., 2021) that is a key hormone for the ovulation in birds. Indeed, it has already been shown that progesterone triggers ovulation in birds, which causes a surge in LH production (Sauveur and De Reviers, 1988). The effect of chemerin on the chicken ovarian cells is still unknown but this adipokine could also modulate the folliculogenesis. We know that chemerin is expressed in chicken ovarian cells. We do not know if it exists a difference of ovarian chemerin expression between layer and broiler animals but in addition to egg white, ovary could be a source and a target of chemerin to control the laying performance in hen. Indeed, chemerin receptors are also expressed in oviduct (Bernardi et al., 2021, Bernardi et al., 2022; Estienne et al., 2022) and consequently could affect the process of egg formation. In contrast to broiler hens, we observed in layer hens significant negative correlation between chemerin concentration in egg white and the weight of whole eggs or those of albumen after le laying peak during the 2 successive generation. Thus, we could hypothesize that egg white chemerin concentration could be more associated to the laying rate in broiler hens where it could be more associated to the quality of eggs in layer hens.

In the present study, we also showed that chemerin concentrations in egg white were significantly correlated with different reproductive parameters. Indeed, in broiler hens, they were negatively correlated with the fertility and the hatchability rates and positively with the embryo mortality level at different stages of the laying period. At the opposite, in layer hens, chemerin concentrations in egg white were very poorly correlated with the fertility parameters and when it was the case, a positive correlation was found. All these data suggest that the egg white chemerin concentration could be a physiological biomarker of avian female reproduction at least in broilers. Our data in layer hens are different from our previous study performed in experimental layer hens showing that chemerin concentration in egg white was negatively correlated with the fertility rate (Bernardi et al., 2022). However, these results were obtained in a small number of animals ($n = 70$) from 7 different lines of layer hens and only at the end of laying. Also, a previous study on 2 pheasant breeds with different reproductive parameters led to similar results at the end of the first period of reproduction (Estienne et al., 2023). Chemerin concentration in egg white was positively correlated with the hatchability rate in one line of pheasants and it was negatively correlated with infertile eggs rate in the second line of pheasants (Estienne et al., 2023). Thus, our previous conclusions about the studies of experimental layer hens and pheasants could not be representative of the entire period of laying in hens (Bernardi et al., 2022). In our study, some correlations between chemerin concentration in egg white and fertility rate were significant at G0 but not at G1 generation. Due to the constraints of breeder companies, the animals at G1 generation had not exactly the same age at 3 periods of laying (before, after the peak and the end of laying) particularly for the layer breed and consequently this could be partly explained why some effects were not confirmed at G1 generation.

CONCLUSIONS

Our data show for the first time that the chemerin concentration in egg white is dependent on the time of laying period in hen. In addition, its profile is different between layer and broiler eggs. Finally, we found in 2 successive generations that the chemerin concentration in egg white was more negatively correlated with the laying rate and the fertility parameters in broiler hens whereas it was more negatively correlated with the egg quality (weight of whole egg and weight of albumen) and positively with the fertility rate at some time of laying in layer hens. Taken together, the concentration of egg white could be a potential predictive tool for breeding companies in genetic selection. However, even if egg white composition

is less dependent on diet composition than yolk composition, it remains to be demonstrated that the differences in egg white chemerin between broilers and layers are not due to differences in dietary composition.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the people from breeding companies for the eggs and animals.

Funding: The authors thank the ARNT for the Ophelie Bernardi's financial support.

DISCLOSURES

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

REFERENCES

Ayeni, A. O., J. O. Agbede, F. A. Igbasan, G. E. Onibi, and M. Adegbenro. 2018. Effect of egg sizes on egg qualities, hatchability and initial weight of the hatched-chicks. Int. J. Environ. Agric. Biotechnol. 3:987–993.

Bernardi, O., A. Estienne, M. Reverchon, Y. Bigot, P. Froment, and J. Dupont. 2021. Adipokines in metabolic and reproductive functions in birds: an overview of current knowns and unknowns. Mol. Cell. Endocrinol. 534:111370.

Bernardi, O., M. Reverchon, A. Estienne, Y. Baumard, C. Ramé, A. Brossaud, Y. Combarnous, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chicken white egg chemerin as a tool for genetic selection for egg weight and hen fertility. Front. Physiol. 13:1012212.

Bonnefous, C., A. Collin, L. A. Guilloteau, V. Guesdon, C. Filliat, S. Réhault-Godbert, T. B. Rodenburg, F. A. M. Tuyttens, L. Warin, S. Steenfeldt, L. Baldinger, M. Re, R. Ponzio, A. Zuliani, P. Venezia, M. Väre, P. Parrott, K. Walley, J. K. Niemi, and C. Leterrier. 2022. Welfare issues and potential solutions for laying hens in free range and organic production systems: a review based on literature and interviews. Front. Vet. Sci. 9:952922.

Briere, S., J. P. Brillard, M. Panheleux, and P. Froment. 2011. Alimentation, fertilité et bien-être des oiseaux reproducteurs domestiques: des liens complexes. INRAE Prod. Anim. 24:171–180.

Buzała, M., B. Janicki, and R. Czarnecki. 2015. Consequences of different growth rates in broiler breeder and layer hens on embryogenesis, metabolism and metabolic rate: a review. Poult. Sci. 94:728–733.

Dunnington, E. A., and P. B. Siegel. 1984. Age and body weight at sexual maturity in female white leghorn chickens. Poult. Sci. 63:828–830.

EFSA. 2010. Scientific opinion on the influence of genetic parameters on the welfare and the resistance to stress of commercial broilers. EFSA J. 8:1666–1748.

Emmerson, D. 1997. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry. Poult. Sci. 76:1121–1125.

Estienne, A., O. Bernardi, C. Ramé, M. Reverchon, S. Tricoire, P. Froment, and J. Dupont. 2023. The influence of selection in wild pheasant (Phasianus colchicus) breeding on reproduction and the involvement of the chemerin system. Poult. Sci. 102:102248.

Estienne, A., A. Brossaud, C. Ramé, O. Bernardi, M. Reverchon, C. Rat, J. Delaveau, E. Chambellon, E. Helloin, P. Froment, and J. Dupont. 2022. Chemerin is secreted by the chicken oviduct, accumulates in egg albumen and could promote embryo development. Sci. Rep. 12:8989.

Estienne, A., C. Ramé, P. Ganier, M. Chahnamian, A. Barbe, J. Grandhaye, J. P. Dubois, M. Batailler, M. Migaud, F. Lecompte, H. Adriaensen, P. Froment, and J. Dupont. 2021. Chemerin impairs food intake and body weight in chicken: Focus on hypothalamic neuropeptides gene expression and AMPK signaling pathway. Gen. Comp. Endocrinol. 304:113721.

Etches, R. J., H. E. MacGregor, T. F. Morris, and J. B. Williams. 1983. Follicular growth and maturation in the domestic hen (Gallus domesticus). Reproduction 67:351–358.

Gumułka, M., and E. Kapkowska. 2005. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. Anim. Reprod. Sci. 90:135–148.

Johnston, S. A., and R. M. Gous. 2007. Modelling the changes in the proportions of the egg components during a laying cycle. Br. Poult. Sci. 48:347–353.

Mellouk, N., C. Ramé, A. Barbe, J. Grandhaye, P. Froment, and J. Dupont. 2018a. Chicken is a useful model to investigate the role of adipokines in metabolic and reproductive diseases. Int. J. Endocrinol. 2018:1–19.

Mellouk, N., C. Ramé, J. Delaveau, C. Rat, M. Marchand, F. Mercerand, et al. 2018b. Food restriction but not fish oil increases fertility in hens: role of RARRES2? Reproduction 155:321–331.

Mellouk, N., C. Ramé, M. Marchand, C. Staub, J.-L. Touzé, É. Venturi, et al. 2018c. Effect of different levels of feed restriction and fish oil fatty acid supplementation on fat deposition by using different techniques, plasma levels and mRNA expression of several adipokines in broiler breeder hens. PLoS One 13:e0191121.

Mottet, A., and G. Tempio. 2017. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. Worlds Poult. Sci. J. 73:245–256.

Nangsuay, A., R. Molenaar, R. Meijerhof, I. Van Den Anker, M. J. W. Heetkamp, B. Kemp, and B. van den. 2015. H.Differences in egg nutrient availability, development, and nutrient metabolism of broiler and layer embryos. Poult. Sci. 94:415–423.

Palomar, M., M. D. Soler, A. Tres, A. C. Barroeta, M. Muñoz-Núñez, and C. Garcés-Narro. 2023. Influence of free fatty acid content and degree of fat saturation in laying hen diets on egg quality, yolk fatty acid profile, and cholesterol content. Poult. Sci. 102:102236.

Pan, Y.-E., Z.-C. Liu, C.-J. Chang, Y.-F. Huang, C.-Y. Lai, R. L. Walzem, and S. E. Chen. 2014. Feed restriction ameliorates metabolic dysregulation and improves reproductive performance of meat-type country chickens. Anim. Reprod. Sci. 151:229–236.

Renema, R., F. Robinson, J. Proudman, M. Newcombe, and R. McKay. 1999. Effects of body weight and feed allocation during sexual maturation in broiler breeder hens. 2. Ovarian morphology and plasma hormone profiles. Poult. Sci. 78:629–639.

Reverchon, M., M. J. Bertoldo, C. Ramé, P. Froment, and J. Dupont. 2014. CHEMERIN (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. Biol. Reprod. 90:1–15, doi:10.1095/biolreprod.113.117044.

Reverchon, M., M. Cornuau, C. Rame, F. Guerif, D. Royere, and J. Dupont. 2012. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Hum. Reprod. 27:1790–1800.

Richards, M. P., and M. Proszkowiec-Weglarz. 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. Poult. Sci. 86:1478–1490.

Rytelewska, E., M. Kiezun, K. Kisielewska, M. Gudelska, K. Dobrzyn, B. Kaminska, T. Kaminski, and N. Smolinska. 2021. Chemerin as a modulator of ovarian steroidogenesis in pigs: an in vitro study. Theriogenology 160:95–101.

Sauveur, B., and M. De Reviers. 1988. Reproduction des volailles et production d'úufs. . P1-331st QUAE.

Savory, C. J., and J.-M. Lariviere. 2000. Effects of qualitative and quantitative food restriction treatments on feeding motivational state and general activity level of growing broiler breeders. Appl. Anim. Behav. Sci. 69:135–147.

Statistiques agricoles de l'OCDE, 2022. https://doi.org/10.1787/agr-data-fr.

Wang, Q., J. Y. Kim, K. Xue, J. Liu, A. Leader, and B. K. Tsang. 2012. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. Endocrinology 153:5600–5611.

Yoshimura, T., and J. J. Oppenheim. 2011. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C−C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. Exp. Cell Res. 317:674–684.

Zakaria, A. H., P. W. Plumstead, H. Romero-Sanchez, N. Leksrisompong, and J. Brake. 2009. The effects of oviposition time on egg weight loss during storage and incubation, fertility, and hatchability of broiler hatching eggs. Poult. Sci. 88:2712–2717.

Zhang, X. Y., M. Q. Wu, S. Z. Wang, H. Zhang, Z. Q. Du, and Y. M. Li. 2018. Cao Z.P., Luan P., Leng L., and Li H. Genetic selection on abdominal fat content alters the reproductive performance of broilers. Animal 12:1232–1241.

Résumé

De nombreuses espèces d'oiseaux sont en déclin voire menacées d'extinction. Cette tendance est particulièrement marquée chez les espèces habitant les zones adjacentes aux zones agricoles, où les oiseaux sont exposés à divers pesticides, notamment les herbicides à base de glyphosate (GBH, de l'anglais glyphosate-based herbicides). Alors que la toxicité des GBH est bien étudiée chez les mammifères, leurs effets sur les espèces aviaires restent relativement peu étudiés et controversés. Ainsi, ma thèse de doctorat vise à caractériser les effets des GBH sur le métabolisme et la reproduction des oiseaux et à identifier de bons indicateurs d'exposition aux GBH chez les oiseaux. Des modèles de poule à différents stades de développement ont été étudiés : adulte, en croissance et embryonnaire.

Des poules adultes ont été exposées à une dose aiguë de GBH (40 mg/kg de poids corporel) par voie alimentaire, et des prélèvements sanguins ont été effectués régulièrement durant les 48 heures suivantes. Le dosage du glyphosate et de l'AMPA dans les plasmas sanguins issus de ces prélèvements nous a permis de calculer les paramètres toxicocinétiques des molécules, notamment leurs demi-vies ($T_{1/2\ glyphosate}$ = 8,94h et $T_{1/2\ AMPA}$ = 6,93h).

Chez les poules adultes exposées de manière chronique à un GBH par leur alimentation (47 mg équivalent gly/kg pc/jour, soit la moitié de la NOAEL de l'EFSA pour les oiseaux), aucun effet significatif n'a été détecté sur les paramètres métaboliques tels que leur poids corporel et leur engraissement. Cependant, nous avons observé des perturbations dans la composition et les fonctions du microbiote cæcal, certaines étant restaurées après le retrait du GBH de l'alimentation. Les variations d'abondance de certaines bactéries pourraient être de bons indicateurs d'exposition aux GBH, car des études montrent qu'elles peuvent être corrélées à l'exposition aux GBH chez d'autres modèles animaux, y compris chez l'homme. Les œufs pondus par les poules exposées pendant le protocole contenaient jusqu'à 1 ng de glyphosate/ml de jaune seulement une semaine après le début de l'exposition, ce qui a entraîné une augmentation spectaculaire des mortalités embryonnaires précoces et tardives (dès E3). La demi-vie d'élimination du glyphosate dans le vitellus (déterminée en collaboration avec l'ANSES) était de 37 heures, et les concentrations ont chuté à presque zéro 8 jours après la fin de l'exposition. Après le retrait du produit, la mortalité embryonnaire est revenue à des niveaux normaux. En revanche, la descendance issue des œufs pondus par la suite présentait

un engraissement accru et des changements comportementaux (mobilité et production de fèces accrues).

Chez les individus en croissance, une exposition alimentaire chronique aux GBH (13 mg ou 34 mg équivalent gly/kg pc/jour) a réduit la consommation alimentaire et la croissance des animaux. Une analyse RNAseq suivie d'une qPCR et d'une analyse Western Blot a révélé que les transcrits et les protéines des facteurs stéroïdogènes tels que l'aromatase étaient réduits dans les ovaires des animaux exposés. Cette observation a été reproduite *in vitro* sur des cellules granulosa primaires et des explants d'ovaires, avec une réduction de la production de progestérone, suggérant que les GBH pourraient avoir des caractéristiques de perturbateurs endocriniens.

Enfin, la combinaison d'injections *in ovo* de doses croissantes de GBH et de l'utilisation de la technique CAM assay (de l'anglais chorioallantoic membrane assay) nous ont permis d'identifier des effets tératogènes chez les embryons de poulet, tels qu'une augmentation de la masse cardiaque et une réduction de la néovascularisation dans la membrane chorioallantoïque.

Grâce à l'examen de ces données, les scientifiques pourront mieux évaluer les risques environnementaux associés à l'utilisation des GBH, et pourraient développer des actions visant à préserver la biodiversité aviaire et l'équilibre écologique.

Summary

Numerous bird species are declining, with some facing extinction. This trend is particularly evident among species inhabiting areas adjacent to agricultural zones, where birds are exposed to various pesticides, notably glyphosate-based herbicides (GBH). While GBH toxicity is well-studied in mammals, its effects on avian species remain relatively understudied and contentious. Thus, my PhD thesis aims to characterize the effects of GBH on avian metabolism and reproduction and to identify good indicators of GBH exposure in birds. Chicken models at different developmental stages were investigated: adult, growing, and embryonic.

Adult hens were exposed to an acute dose of GBH (40 mg/kg body weight), and blood samples were taken regularly over the following 48 hours. The measurement of glyphosate and AMPA in the blood plasma from these samples allowed us to calculate the toxicokinetic parameters of the molecules, notably their half-lives ($T_{1/2\ glyphosate}$ = 8.94h and $T_{1/2\ AMPA}$ = 6.93h).

In adult hens chronically exposed to a GBH through their diet (47 mg gly eq/kg bw/day, half of the EFSA's NOAEL for birds), no significant effect was detected on metabolic parameters such as their body weight and their fattening. However, we observed disturbances in the cecal microbiota composition and functions, with some being restored after GBH removal from the diet. The variations in some bacteria's abundance could be good indicators of GBH exposure, as they were correlated to GBH exposure in other models, including human. Eggs laid during the protocol contained up to 1 ng of glyphosate/yolk ml only one week after the beginning of exposure, linked to a dramatic increase in early and late embryo mortalities (from E3). Glyphosate elimination half-life in vitellus (determined in collaboration with the ANSES) was 37h, and concentrations dropped to nearly zero 8 days after the end of exposure. After the removal of the product, embryonic mortality returned to normal levels. However, the offspring from the eggs laid thereafter exhibited increased fattening and behavioral changes (increased mobility and feces production).

In growing individuals, chronic dietary exposure to GBH (13 mg or 34 mg gly eq/kg bw/day) reduced food intake and growth performance. An RNAseq analysis followed by qPCR and Western Blot analysis revealed that steroidogenic factors transcripts and proteins such as the aromatase were reduced in exposed animals' ovaries. This observation was reproduced *in vitro*

on primary granulosa cells and ovary explants, with a reduction of progesterone production, indicating that GBH might have endocrine disruptors characteristics.

Finally, the combination of *in ovo* injections of growing doses of GBH and the use of the CAM (Chorioallantoic Membrane) assay technic allowed us to identify teratogenic effects in chicken embryos such as an increased heart mass and a reduced neovascularization in the chorioallantoic membrane.

Through the examination of these data, scientists could better assess the environmental risks associated with the use of GBH. They could develop some actions aimed at preserving avian biodiversity and ecological balance.

Mathias FRÉVILLE

Impact d'un herbicide à base de glyphosate chez la poule domestique

Résumé :

De nombreuses espèces d'oiseaux sont en déclin voire menacées d'extinction. Cette tendance est particulièrement évidente chez les espèces habitant les zones adjacentes aux zones agricoles, où les oiseaux sont exposés à divers pesticides, notamment les herbicides à base de glyphosate (GBH) dont la toxicité reste aujourd'hui relativement peu étudiée et controversée. La présente étude vise donc à caractériser les effets d'un GBH sur le métabolisme et la reproduction aviaires et à identifier de bons indicateurs d'exposition. Le modèle poule a été étudié à différents stades de développement : adulte, en croissance et embryonnaire. Chez les poules adultes exposées chroniquement à un GBH via leur alimentation (47 mg gly eq/kg de poids corporel/jour, soit la moitié de la NOAEL déterminée par l'EFSA chez les oiseaux), aucun effet significatif n'a été détecté sur les paramètres métaboliques tels que leur poids corporel et leur engraissement. Cependant, des perturbations dans la composition et les fonctions du microbiote cæcale ont été observées, certaines étant restaurées après le retrait du GBH de l'alimentation. Étant corrélées à l'exposition aux GBH chez d'autres modèles, y compris chez l'homme, les variations de l'abondance de certaines bactéries pourraient constituer de bons indicateurs d'exposition aux GBH. Les œufs pondus pendant le protocole contenaient jusqu'à 1 ng de glyphosate par ml de vitellus une semaine après le début de l'exposition. Une augmentation spectaculaire de la mortalité embryonnaire a été observée. La descendance issue des œufs pondus après l'exposition présentait un engraissement accru et des changements comportementaux. Chez les individus en croissance, une exposition alimentaire chronique aux GBH (13 mg ou 34 mg gy eq/kg de poids corporel/jour) a réduit l'apport alimentaire et la croissance. Les transcrits et les protéines des facteurs stéroïdogènes étaient réduits dans les ovaires des animaux exposés. Cette observation a été reproduite *in vitro* sur des cellules de la granulosa primaires et des explants d'ovaires, indiquant que les GBH pourraient avoir des caractéristiques de perturbateurs endocriniens.

Par l'examen de ces données, les scientifiques pourront mieux évaluer les risques environnementaux associés à l'utilisation des GBH et développer des actions visant à préserver la biodiversité aviaire.

Mots clés : Glyphosate, poules, perturbateur endocrinien, toxicocinétique, microbiote

Summary:

Numerous bird species are declining, with some facing extinction. This trend is particularly obvious among species inhabiting areas adjacent to agricultural zones, where birds are exposed to various pesticides, notably glyphosate-based herbicides (GBH). Today, the GBH toxicity remains relatively understudied and contentious. Thus, the present study aims to characterize the effects of GBH on avian metabolism and reproduction and to identify good indicators of GBH exposure in birds. Hens models at different developmental stages were investigated: adult, growing, and embryonic. In adult hens chronically exposed to a GBH through their diet (47 mg gly eq/kg bw/day, half of the EFSA's NOAEL for birds), no significant effect was detected on metabolic parameters such as their body weight and their fattening. However, we observed disturbances in the cecal microbiota composition and functions, with some being restored after GBH removal from the diet. The variations in some bacteria's abundance could be good indicators of GBH exposure, as they were correlated to GBH exposure in other models, including human. Eggs laid during the protocol contained up to 1 ng of glyphosate/yolk ml only one week after the beginning of exposure, linked to a dramatic increase in embryo mortality. The offspring from the eggs laid after exposure exhibited increased fattening and behavioral changes. In growing individuals, chronic dietary exposure to GBH (13 mg or 34 mg gly eq/kg bw/day) reduced food intake and growth performance. Steroidogenic factors transcripts and proteins were reduced in exposed animals' ovaries. This observation was reproduced in vitro on primary granulosa cells and ovary explants, indicating that GBH might have endocrine disruptors characteristics.

Through the examination of these data, scientists could better assess the environmental risks associated with the use of GBH. They could develop some actions aimed at preserving avian biodiversity and ecological balance.

Keywords : Glyphosate, hens, endocrine disruptor, toxicokinetics, microbiota