



HAL
open science

Ecotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : reproduction, immunité et défenses antioxydantes

Jessy Le Du-Carrée

► To cite this version:

Jessy Le Du-Carrée. Ecotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : reproduction, immunité et défenses antioxydantes. Biologie animale. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0016 . tel-03614998

HAL Id: tel-03614998

<https://theses.hal.science/tel-03614998v1>

Submitted on 21 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ÉCOLE DOCTORALE N° 600
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et
Alimentation*
Spécialité : *Biologie et physiologie animales*

Par

Jessy LE DU-CARRÉE

Ecotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou associé a des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : reproduction, immunité et défenses antioxydantes.

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 10 mars 2021

Unité de recherche : Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, unité Virologie, immunologie et écotoxicologie du poissons (VIMEP).

Rapporteurs avant soutenance :

Mr Patrice GONZALEZ
Mr Stéphane BETOULLE

Charge de Recherche Univ. de Bordeaux
Professeur Univ. de Reims

Composition du Jury :

Président : Mr Michel AUFFRET

Professeur UBO

Examineurs : Mr Patrice GONZALEZ
Mr Stéphane BETOULLE
Mme Christelle ADAM-GUILLERMIN

Charge de Recherche Univ. de Bordeaux
Professeur Univ. de Reims
Directrice de recherche IRSN

Dir. de thèse : Mr Daniel DORY
Co-dir. de thèse : Mr Thierry MORIN
Mme Morgane DANION

Charge de projet Anses
Chef d'unité Anses
Chargée de projet Anses

Invité(s) : Mr Jérôme CACHOT

Professeur Univ. de Bordeaux

Avant-propos

La thèse GlyphoTAC vise à étudier l'impact du glyphosate sur l'état de santé de la truite arc-en-ciel. Les travaux ont été réalisés au sein de l'unité de Pathologies virales des poissons (dont le nom a évolué en unité Virologie, Immunologie et Écotoxicologie des Poissons depuis janvier 2021) du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). En trois ans, j'ai réalisé une étude de la littérature ainsi que différentes expérimentations de recherche afin d'apporter de nouveaux éléments scientifiques permettant d'améliorer la compréhension liée à l'impact de cette substance herbicide sur les poissons et, plus largement, sur l'environnement. Différents articles scientifiques ont été rédigés avec l'objectif de mettre à disposition de la communauté scientifique les résultats générés. Le présent document retrace l'ensemble du cheminement scientifique, à la fois conceptuel et expérimental, ayant permis l'élaboration de ces articles, intégrés dans les différents chapitres de cette thèse. Il rapporte également, plus globalement, l'ensemble des travaux effectués au cours de ce projet et les mets en perspective dans une discussion générale, au regard des recherches préexistantes.

Dans la version numérique de cette thèse, vous pouvez naviguer dans le document grâce au sommaire interactif ([hyperliens violets](#)). Il vous est également possible d'accéder aux références bibliographiques citées grâce à des [hyperliens bleus](#). Dans la partie bibliographie, vous trouverez, à la fin de chaque référence, les numéros des pages dans lesquelles elles sont citées ([hyperliens violets](#)) et des liens URL ou DOI ([hyperliens bleus clairs](#)) pour consulter ces références en ligne. Les principales abréviations sont également associées grâce à des [hyperliens violets](#) à une liste des acronymes présentée au début du document.

Ce travail de thèse a été mené sous management de la qualité avec pour référence la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour la gestion des ressources (norme de référence pour l'accréditation des Laboratoires Nationaux de Référence de l'Anses) et la norme NF EN ISO 10006 pour le management des travaux de recherche. Le management de la qualité appliqué à un projet de thèse est une démarche pragmatique visant à définir clairement les objectifs fixés, à optimiser le temps, les moyens humains, matériels et financiers nécessaires, à prévoir les points critiques du projet et à envisager les solutions de substitution et les réorientations possibles, à s'assurer de la qualité des résultats et des expérimentations faites, à définir les éléments de suivi, reporting et les modalités de communication, et à préparer la valorisation des résultats obtenus. De façon concrète, cette démarche s'est traduite par la rédaction d'un plan de management qualité (PMQ) au cours des premiers mois de la thèse, dont la mise en application a été évaluée par deux audits internes réalisés par le Service Management de la Qualité du laboratoire. Ce PMQ et l'attestation de gestion de cette thèse selon un management de la qualité strict sont fournis en annexe I.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les financeurs du projet GlyphoTAC, la Région Bretagne, le département des Côtes-d'Armor et l'agglomération de Saint-Brieuc de leur investissement dans cette thèse.

Je remercie ensuite, l'ensemble du jury qui s'est chargé de l'évaluation de ce manuscrit de thèse ainsi que de ma soutenance orale. Merci au docteur Patrice Gonzalez, chargé de recherches à l'université de Bordeaux ainsi qu'au professeur Stéphane Betoulle de l'université de Reims Champagne-Ardenne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également à la docteure Christelle Adam-Guillermin, directrice de recherche à l'IRSN et au professeur Michel Auffret de l'université de Bretagne occidentale pour avoir été les examinateurs de cette thèse.

Je tiens à remercier Morgane Danion, docteure chargée de projet scientifique au sein de l'unité de Virologie, immunologie et écotoxicologie du poisson (VIMEP) du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort de l'Anses, ma responsable scientifique de thèse, pour avoir élaboré le sujet de celle-ci, qui était à la fois bien pensé et particulièrement pertinent dans le contexte socio-économique et scientifique actuel. Je la remercie aussi pour m'avoir suivi et conseillé tout au long de cette thèse et pour m'avoir enseigné ses pratiques de recherche, tant sur le plan technique que conceptuel. Mes remerciements vont également tout naturellement vers Thierry Morin, docteur en virologie et chef de l'unité VIMEP, mon co-directeur de thèse, pour son soutien scientifique et managérial tout au long de ce projet. Je le remercie également pour tous ses conseils ainsi que son soutien précieux dans la rédaction de ce manuscrit. Je remercie aussi Daniel Dory, docteur chargé de projet scientifique au sein du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort de l'Anses, mon directeur de thèse, pour avoir assuré l'organisation de celle-ci et assurer son suivi et son management. Je remercie l'actuel directeur de mon laboratoire d'accueil, le docteur Nicolas Etteradossi pour m'avoir permis de réaliser mon Doctorat au sein du site de Plouzané, une des trois implantations du laboratoire. Je témoigne enfin ma gratitude à son prédécesseur, le docteur Gilles Salvat, maintenant directeur général délégué recherche et référence au sein de l'agence, qui avait beaucoup oeuvré pour l'obtention des financements de ce projet.

L'ensemble de l'unité VIMEP mérite également toute ma gratitude pour son soutien tout au long de ma thèse. Merci à Éric Debosse, technicien responsable de l'élevage, pour ses conseils dans la gestion de mes expérimentations avec les poissons. Merci également à Fabrice Almeras, Estelle Vigouroux et Morgane Chalopin, techniciens en immunologie et virologie, pour leur aide dans différentes expérimentations. Merci aussi à Lénaïg Louboutin, scientifique et correspondante qualité, et à Joëlle Cabon, assistante-ingénieur en virologie, pour leur aide et leurs conseils dans la réalisation des challenges infectieux. Merci également à Marine Baud et Laurane Pallandre, techniciennes en biologie moléculaire, et à Laurent Bigarré, docteur chargé de projets en virologie moléculaire, pour leurs conseils sur les différentes expérimentations de ce projet, notamment en biologie moléculaire. Je remercie aussi Yoannah François, ingénieure chargée de projets en génétique, pour ces différents conseils sur le plan scientifique apportés au cours de ma thèse.

Je souhaitais également exprimer mes remerciements à l'ensemble de mon comité de suivi de thèse, qui m'a apporté son soutien et de précieux conseils en matière de choix stratégiques concernant le management du projet GlyphoTAC. Merci donc à Frank Le Foll, professeur à l'université du Havre, à Jérôme Cachot, professeur à l'université de Bordeaux, à Gwenaëlle Lavison-Bompard, docteure en chimie et cheffe de l'unité Pesticides et biotoxines marines à l'Anses, et enfin à Jeremy Foldrin, scientifique à la Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) de l'Anses.

Il convient également de remercier, avec une attention particulière, les deux stagiaires de master 2, Florian Saliou et Rania Boukhari, pour le soutien qu'ils m'ont apporté dans les expérimentations du projet au cours de leurs deux stages respectifs de six mois. Je remercie aussi tout particulièrement Jérôme Cachot et son équipe du laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC) de l'université de Bordeaux pour nous avoir accueillis et formés, moi et mes stagiaires, dans le cadre des analyses comportementales réalisées dans ce projet. Je tenais à remercier également Laure Bellec, docteure enseignante-chercheuse au sein de ce même laboratoire, pour m'avoir offert l'opportunité de participer à une collaboration sur l'étude du microbiote de la truite arc-en-ciel. Mes remerciements sincères viennent aussi à Éric Chorin, docteur chef de service du Système de management qualité du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, pour m'avoir guidé, conseillé et évalué dans le management de la qualité de mon projet de thèse. Je souhaitais aussi remercier Michel Laurentie, docteur chef de l'unité Pharmacocinétique-pharmacodynamie du laboratoire de Fougères de l'Anses, pour ses précieux conseils en matière d'analyse statistique. Mes remerciements vont aussi à Yannick Blanchard, docteur chef de l'unité de Génétique virale et biosécurité du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort de l'Anses, pour son aide quant aux choix stratégiques liés à l'analyse RNAseq réalisée dans ce projet.

Table des matières

Avant-propos	3
Remerciements	5
Table des matières	7
Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	15
Introduction générale	19
1 Effets du glyphosate et des herbicides à base de glyphosate (GBHs) sur la santé des poissons : une revue bibliographique avec un focus particulier sur l'impact de faibles doses environne- mentales	27
1.1 Introduction	29
1.2 Description des molécules considérées	30
1.3 Exposition des écosystèmes aquatiques	32
1.4 Impact sur la survie	33
1.5 Impact sur la croissance	35
1.6 Impact sur la reproduction	36
1.7 Impact sur le développement embryolaire	38
1.8 Impact sur le comportement	40
1.9 Impact sur les fonctions immuno-hématologiques	42
1.10 Effets sur le métabolisme	45
1.11 Impact sur le stress oxydant	47
1.12 Effets sur certaines enzymes spécifiques	49
1.13 Mode d'action du glyphosate seul ou associé à des co-formulants	52
1.14 Effet du mode de transmission sur la toxicité liée au glyphosate et aux GBHs	54
1.15 Conclusions	57

2	Méthodologie générale de la thèse GlyphoTAC	77
2.1	Objectifs du chapitre	79
2.2	Choix du modèle biologique	79
2.3	Choix des composés chimiques	80
2.4	Expérimentations animales	82
2.5	Paramètres biologiques analysés	95
2.6	Développements méthodologiques de dosages enzymatiques	104
3	Impact du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel de génération F0	115
3.1	Introduction	116
3.2	Effet d'une exposition aiguë à une dose sublétales de glyphosate, seul ou co-formulé dans deux GBHs sur la santé de juvéniles de truite arc-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	116
3.3	Impact d'une exposition prolongée de plus de 10 mois à une dose environnementale de glyphosate, seul ou co-formulé dans deux GBHs, sur les capacités de reproduction et la santé de la truite arc-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	128
4	Impact d'une faible dose environnementale de glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé d'une génération F1 de truites arc-en-ciel	141
4.1	Introduction	142
4.2	Effet d'une exposition chronique à une faible dose environnementale de glyphosate sur le développement sur la truite arc-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	142
4.3	Modifications des défenses immunitaires de la truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i> juvénile exposée intergénérationnellement au glyphosate et soumise à une infection au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse.	155
5	Impact inter et transgénérationnel d'une faible dose de glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé d'une génération F2 de truites arc-en-ciel	161
5.1	Introduction	162
5.2	Impact inter, trans et multigénérationnel d'une faible dose de glyphosate sur le développement précoce et les défenses immunitaires de truites arc-en-ciel juvéniles	162
6	Discussion générale	179
	Conclusions et perspectives	195
A	Management de la qualité de la thèse GlyphoTAC	201
A.1	Introduction	208
A.2	Le champ du Plan de Management Qualité de la thèse	211
A.3	La Politique de Management Qualité du Laboratoire et de l'unité	212
A.4	Les acteurs du projet	213
A.5	La conduite du projet	215

TABLE DES MATIÈRES

A.6 Les équipements	220
A.7 Les consommables	220
A.8 Les locaux	221
A.9 La gestion des écarts	222
A.10 La communication	222
A.11 Annexe	223
B Formations doctorales et pédagogie	225
C Valorisation du projet GlyphoTAC dans les congrès	227

Liste des figures

1	Description de la voie du shikimate et site d'action du glyphosate d'après DUKE et POWLES [2008]. Les produits de la voie et les processus de rétro-inhibition (flèches en pointillés) sont également représentés. DAHP = 3-désoxy-7-phosphoheptulonate; EPSP = 5-enolpyruvyl—shikimate-3-phosphate; IAA = indole-3-acetic acid.	21
1.1	Molécule de glyphosate.	30
1.2	Molécule d'AMPA	31
1.3	Diagramme conceptuel représentant une vue non exhaustive des différentes hypothèses existantes quant au mode d'action toxique du glyphosate chez les poissons. Les flèches en pointillés représentent des phénomènes de rétroaction potentiels.	53
1.4	Schéma expliquant le mode d'exposition en fonction de la génération considérée dans le cas où seule la génération F0 subit une contamination directe au niveau de l'organisme entier.	54
2.1	Photo d'une truite arc-en-ciel adulte (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), ©Wilfried Kopetzky.	80
2.2	Formule chimique du glyphosate (2.2a) et photo des deux GBHs retenus pour le projet GlyphoTAC (2.2b), ©Estelle Vigouroux.	81
2.3	Frise chronologique représentant le détail des expérimentations effectuées sur les différentes générations du projet GlyphoTAC. Les périodes de contaminations chroniques au glyphosate seul ou co-formulé sont indiquées par des flèches horizontales de couleurs (le rouge et le bleu correspondent, respectivement, à des périodes avec et sans contamination chimique). Les pontes sont indiquées par une flèche verticale grise, tandis que les dates de prélèvements sont marquées par la lettre "S" suivie du numéro de prélèvement. Enfin, les épreuves infectieuses expérimentales sont repérées à l'aide d'un symbole représentant un virus.	85
2.4	Cinétique de dilution théorique de la concentration en glyphosate dans les bacs contaminés.	87
2.5	Schéma décrivant les 4 conditions de contamination des géniteurs F0 ("C"= Contrôle, "G"= Glyphosate, "R"= Roundup et "V" = Viaglif).	89

2.6	Schéma décrivant les 10 combinaisons de contamination réalisées avec la génération F1. La lettre à gauche du signe "/" indique l'exposition intergénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F0) et celle à droite du signe "/" indique l'exposition directe (c.-à-d. celle de la génération F1) où "C"= Contrôle, "G"= Glyphosate, "R"= Roundup et "V" = Viaglif.	89
2.7	Schéma décrivant les 10 combinaisons d'expositions analysées sur la génération F2. La lettre à gauche du premier signe "/" informe sur l'exposition transgénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F0), celle entre les deux signes "/" indique l'exposition intergénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F1), et celle à droite du deuxième signe "/" indique l'exposition directe (c.-à-d. celle de la génération F2) où "C"= Contrôle, "G"= Glyphosate, "R"= Roundup et "V" = Viaglif.	90
2.8	Schéma résumant les 4 conditions de contamination des géniteurs F0 et les 10 combinaisons analysées sur les générations F1 et F2 ("C"= Contrôle, "G"= Glyphosate, "R"= Roundup et "V" = Viaglif).	92
2.9	Photo d'un Rhabdovirus (Source : L. Louboutin, Anses, France).	94
2.10	Schéma conceptuel décrivant les différents niveaux d'intégration biologique (source : modifié d'après VAN DER OOST et collab. [2003]).	96
3.1	Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de la génération F0 de truites adultes soumises à une exposition aiguë au glyphosate.	117
3.2	Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de la génération de truites F0 adultes soumises à une exposition chronique au glyphosate.	129
4.1	Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de l'impact du glyphosate sur le développement précoce de la génération de truites F1.	143
4.2	Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de la génération de truites F1 juvéniles soumises à une exposition chimique chronique au glyphosate ainsi qu'à une infection virale.	156
5.1	Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de l'impact du glyphosate sur le développement précoce de la génération de truites F2.	164
A.1	La roue de Deming. Source : http://www.kaizen-skills.ma/pdca-la-roue-de-deming/	209
A.2	Structuration de la documentation qualité. Source : http://qualite.master.utc.fr/site_public/travaux/2011/qpo/ST02/aissat/index.htm	213
A.3	Organigramme du projet de thèse	214
A.4	Programme prévisionnel du projet de thèse	216
A.5	Schéma des différentes conditions de la manipulation "Exposition aiguë".	223

Liste des tableaux

1.1	Description de paramètres physico-chimiques associés au glyphosate et à son métabolite principal, l'AMPA. Données extraites du rapport de l'Ineris [INERIS, 2020].	31
2.1	Présentation des différentes solutions mère et filles pour réaliser la contamination chronique.	87
2.2	Gènes de l'immunité ciblés et amorces associées.	99
B.1	Tableau récapitulatif des différentes formations suivies au cours de la thèse.	226
C.1	Tableau récapitulatif des congrès dans lesquels le projet a été présenté au cours de la thèse.	228

Liste des acronymes

AChE	AcétylCholinEstérase 50–52, 58, 78, 97, 100, 105
ADN	Acide DésoxyriboNucléique 36, 39, 47, 48, 55, 56, 187
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché 19, 81
AMPA	Aminomethylphosphonic acid (anglais) ou acide aminométhylphosphonique (français) 11, 13, 30–33, 39
ARN	Acide RiboNucléique 55, 84, 99, 185, 187–189, 197
C	Contrôle, soit une condition de truites de génération F0 non exposées aux contaminants chimiques 11, 12, 87, 89, 90, 92
C/C	Contrôle/Contrôle, soit une condition de truites de génération F1 non exposées aux contaminants chimiques, au travers de la génération F0 ou directement 91, 223, 224
C/C/C	Contrôle/Contrôle/Contrôle, soit une condition de truites de génération F2 non exposées aux contaminants chimiques, au travers de la génération F0, F1 ou directement 91
C/G	Contrôle/Glyphosate, soit une condition de truites de génération F1 exposées directement à la substance active "glyphosate" sous forme pure 91, 223
C/G/C	Contrôle/Glyphosate/Contrôle, soit une condition de truites de génération F2 exposées intergénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme pure 91
C/R	Contrôle/Roundup, soit une condition de truites de génération F1 exposées directement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Roundup Innovert® 91, 223
C/R/C	Contrôle/Roundup/Contrôle, soit une condition de truites de génération F2 exposées intergénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Roundup Innovert® 91

C/V	Contrôle/Viaglif, soit une condition de truites de génération F1 exposées directement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Viaglif Jardin® 91, 223
C/V/C	Contrôle/Viaglif/Contrôle, soit une condition de truites de génération F2 exposées intergénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Viaglif Jardin® 91
CA	Anhydrase Carbonique 51, 105
CAT	CATalase 48, 102, 105
CCO	Cytochrome C Oxidase 103–105, 181, 183, 188
CS	Citrate Synthase 103–105, 181, 183, 187, 188
CV	Coefficient de Variation 105, 106
DL	Dose Létale ₅₀ , soit la dose causant la mort de 50% d'un groupe d'animaux lors d'un essai 33, 34, 49, 81
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (anglais) ou dosage d'immunoabsorption enzymatique (français) 93
EPSPS	5-EnolPyruvyl-Shikimate— 3-Phosphate Synthase 21
G	Glyphosate, soit une condition de truites de génération F0 exposées à la substance active "glyphosate" sous forme pure 11, 12, 87, 89, 90, 92
G/C	Glyphosate/Contrôle, soit une condition de truites de génération F1 exposées intergénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme pure 91, 223
G/C/C	Glyphosate/Contrôle/Contrôle, soit une condition de truites de génération F2 exposées transgénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme pure 88, 91
G/G	Glyphosate/Glyphosate, soit une condition de truites de génération F1 exposées multigénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme pure 88, 91, 223
G/G/G	Glyphosate/Glyphosate/Glyphosate, soit une condition de truites de génération F2 exposées multigénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme pure 91
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase 104, 105
GBH	Glyphosate-Based Herbicide (anglais) ou herbicide à base de glyphosate (français) 11, 20, 22, 29, 31–44, 46–49, 52, 55–58, 80–82, 87, 103, 116, 162, 179–182, 184, 186, 187, 196

GPx	Glutathion Peroxydase 48, 102, 104, 105
LDH	Lactate Déshydrogénase 46, 50, 103–105, 183, 187, 188
LPO	Lipid PerOxidation (anglais) ou peroxydation des lipides (français) 47, 48
MoA	Mode of Action (anglais) ou mode d'action (français) 50, 52, 180
NHI	Nécrose Hématopoïétique Infectieuse 93, 100
NOEC	No Observed Effect Concentration (anglais), soit la plus forte concentration n'induisant aucun effet observable (français) 35, 86
PNEC	Predicted No Effect Concentration (anglais) ou valeur de concentration maximale pour laquelle aucun effet indésirable pour l'environnement n'est prédit (français) 32
POE	PolyOxyÈthylène 31, 33, 58
POEA	PolyOxyÈthylène Amine 31, 33, 39, 80
R	Roundup, soit une condition de truites de génération F0 exposées à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Roundup Innovert® 11, 12, 87, 89, 90, 92
R/C	Roundup/Contrôle, soit une condition de truites de génération F1 exposées intergénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Roundup Innovert® 223
R/R	Roundup/Roundup, soit une condition exposées multigénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Roundup Innovert® 223
RNAseq	RiboNucléique Acide sequencing (anglais) ou séquençage de l'acide ribonucléique (français) 84, 185, 190
ROS	Reactive Oxygen Species (anglais) ou dérivés réactifs de l'oxygène (français) 46–48, 50, 53, 97, 102, 103, 187, 188
SA	Substance Active 81, 82, 93, 211, 215
SOD	SuperOxyde Dismutase 48, 102, 104, 105, 107

TAC	Truite(s) Arc-en-Ciel 79, 83, 93, 95, 99, 220
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances (anglais) ou substances réactives à l'acide thiobarbiturique (français) 49, 103–105
V	Viaglif, soit une condition de truites de génération F0 exposées à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Viaglif Jardin® 11, 12, 87, 89, 90, 92
V/C	Viaglif/Contrôle, soit une condition de truites de génération F1 exposées intergénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Viaglif Jardin® 223
V/V	Viaglif/Viaglif, soit une condition de truites de génération F1 exposées multigénérationnellement à la substance active "glyphosate" sous forme co-formulée dans le produit commercial Viaglif Jardin® 223
vNHI	virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse 83, 84, 94, 117, 155, 184

Introduction générale

« La réflexion philosophique nous conduit à l'absolu, mais elle requiert une patience et un travail infinis. La foi religieuse, l'amour, le suicide ne sont qu'une impatience de l'absolu. »

Friedrich Hegel

Un secteur agricole dépendant des pesticides : une pratique non sans conséquence et une molécule au centre des débats

Afin d'assurer la production alimentaire pour des populations humaines en perpétuelle croissance démographique, l'agriculture moderne a connu un fort accroissement de sa productivité ces dernières années. Cette hausse de la productivité a été en majeure partie permise par l'agriculture intensive qui est particulièrement dépendante d'intrants issus de l'agrochimie [UDEIGWE et collab., 2015]. Parmi le large panel de substances chimiques disponibles sur le marché, le glyphosate est la molécule pesticide la plus utilisée dans le monde [BENBROOK, 2016]. Le glyphosate est largement employé en agriculture pour différents usages tels que le désherbage, la dessiccation des cultures et le renouvellement des prairies permanentes [ANTIER et collab., 2020]. Son utilisation globale a considérablement augmenté ces dernières décennies [BENBROOK, 2016] et cette tendance est, entre autres, liée à l'utilisation de cultures génétiquement modifiées résistantes au glyphosate [SZÉKÁCS et DARVAS, 2018; TORRETTA et collab., 2018]. De cette utilisation massive de ce composé herbicide est donc progressivement née une dépendance économique de certains secteurs pour cette molécule [BROOKES et collab., 2017]. Le risque chimique lié à l'utilisation de molécules artificielles, notamment le glyphosate, étant à l'origine d'une crainte grandissante dans la société et des opinions divergentes existant entre les agences d'évaluation du risque, le renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de préparations à base de cette substance par la Commission Européenne fait particulièrement débat [VAN STRAALLEN et LEGLER, 2018]. En France, selon le règlement (CE) n°1107/2009, des demandes d'AMMs de préparations à base de glyphosate pour un emploi par des utilisateurs professionnels en zone agricole peuvent être déposées jusqu'au 1er décembre 2022 (avant une éventuelle

réautorisation). Cependant, en France depuis le 1er janvier 2017, l'utilisation des produits phytosanitaires chimiques (incluant les formulations à base de glyphosate) est interdite en zone non agricole par la loi Labbé. De plus, l'interdiction de la vente libre et de la détention des produits phytopharmaceutiques pour les particuliers est effective depuis le premier janvier 2019 [SITE DU MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION]. Cependant, le glyphosate apporte des avantages économiques importants et les alternatives existantes, moins avantageuses ou moins bien étudiées, empêchent certains secteurs économiques de se passer de l'usage de cet herbicide [ANTIER et collab., 2020]. Une étude récente portant sur l'impact de l'arrêt de l'utilisation du glyphosate prédit une augmentation des coûts de production agricole annuels au niveau mondial de plus de 6,76 milliards de dollars, avec un usage accru d'autres herbicides, mais aussi des émissions de gaz à effet de serre générées par le secteur agricole [BROOKES et collab., 2017]. WYNN et collab. [2014] ont également indiqué que le façonnement des pratiques agricoles ayant été influencé par l'utilisation du glyphosate durant plusieurs décennies, certains effets environnementaux peu souhaitables, comme une augmentation de la surface cultivée, seraient associés à l'arrêt de son utilisation.

Le glyphosate : molécule la plus largement utilisée dans le monde et ubiquiste dans l'environnement

Le glyphosate est l'herbicide le plus utilisé dans le monde. Le volume des ventes mondiales était estimé à 825 804 tonnes en 2014, dont 746 580 tonnes (90%) étaient utilisées par le secteur agricole, le reste dans les zones non cultivées. Ce volume représentait 18% des 4 105 783 tonnes d'ingrédients actifs de pesticides et 92% des 814 614 tonnes d'herbicides vendus au secteur agricole dans le monde en 2014, selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Commercialisé pour la première fois en 1974, les ventes de glyphosate ont régulièrement augmenté au fil des années. En 1994, l'utilisation de glyphosate par le secteur agricole était estimée à 56 296 t de matière active; en 2000, elle a atteint 155,367 tonnes; et en 2010, 578 124 tonnes. Au niveau européen, le glyphosate a représenté 33% du total des herbicides vendus en 2017, avec un volume total de 49 427 tonnes [ANTIER et collab., 2020]. Les principaux pays acheteurs ont été la France (19% des ventes totales en volume), la Pologne (13%), l'Allemagne (9%), l'Italie (7%), l'Espagne (7%) et la Serbie (6%). Le glyphosate est plus particulièrement utilisé sous la forme de solutions commerciales à base de glyphosate (c.-à-d. « Glyphosate-Based Herbicides » en anglais, abrégés « GBHs »). Les substances ajoutées au glyphosate dans les GBHs sont appelées des co-formulants. Ils permettent d'améliorer le pouvoir herbicide de la substance active (p. ex. par augmentation de son absorption et de sa translocation dans la plante) [PALMA-BAUTISTA et collab., 2020]. L'augmentation considérable de l'utilisation du glyphosate a entraîné l'ubiquité de ce composé dans l'environnement qui, après avoir été dispersé sur les cultures, est transporté et se retrouve dans différents compartiments environnementaux notamment via le ruissellement [BRUGGEN et collab., 2018]. En France, le glyphosate entre 2007 et 2017 était de plus en plus retrouvé dans les prélèvements d'eaux de surface, sa fréquence de détection atteignait 49,7% en 2017 [ANSES, 2019].

Le glyphosate : une efficacité liée à un mode d'action très spécifique

Le succès du glyphosate en tant que molécule herbicide est directement lié à son mode d'action chez la plante qui lui confère une forte spécificité et une grande efficacité. En effet, le glyphosate est une molécule herbicide à large spectre qui entraîne une inhibition efficace de l'enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate—3-phosphate synthase (EPSPS) impliquée dans la voie de synthèse du shikimate (cf. figure 1) [DUKE et POWLES, 2008], composé chimique indispensable à la synthèse des acides aminés aromatiques. La voie métabolique du shikimate présente en outre l'énorme avantage de n'être présente que chez les plantes et les micro-organismes, mais pas chez les animaux [HERRMANN et WEAVER, 1999]. De plus, le glyphosate possède un faible potentiel de bioaccumulation dans les tissus animaux et les concentrations maximales pouvant être retrouvées dans les eaux de surface en Europe (PECsw) sont comprises entre 20 et 40 μgL^{-1} , c'est-à-dire des concentrations faibles comparées aux doses répandues sur les terres agricoles. Toutefois, l'omniprésence du glyphosate à faible concentration dans l'environnement a amené de nombreuses équipes de recherche à se pencher sur l'écotoxicité de ce composé [ANNETT et collab., 2014].

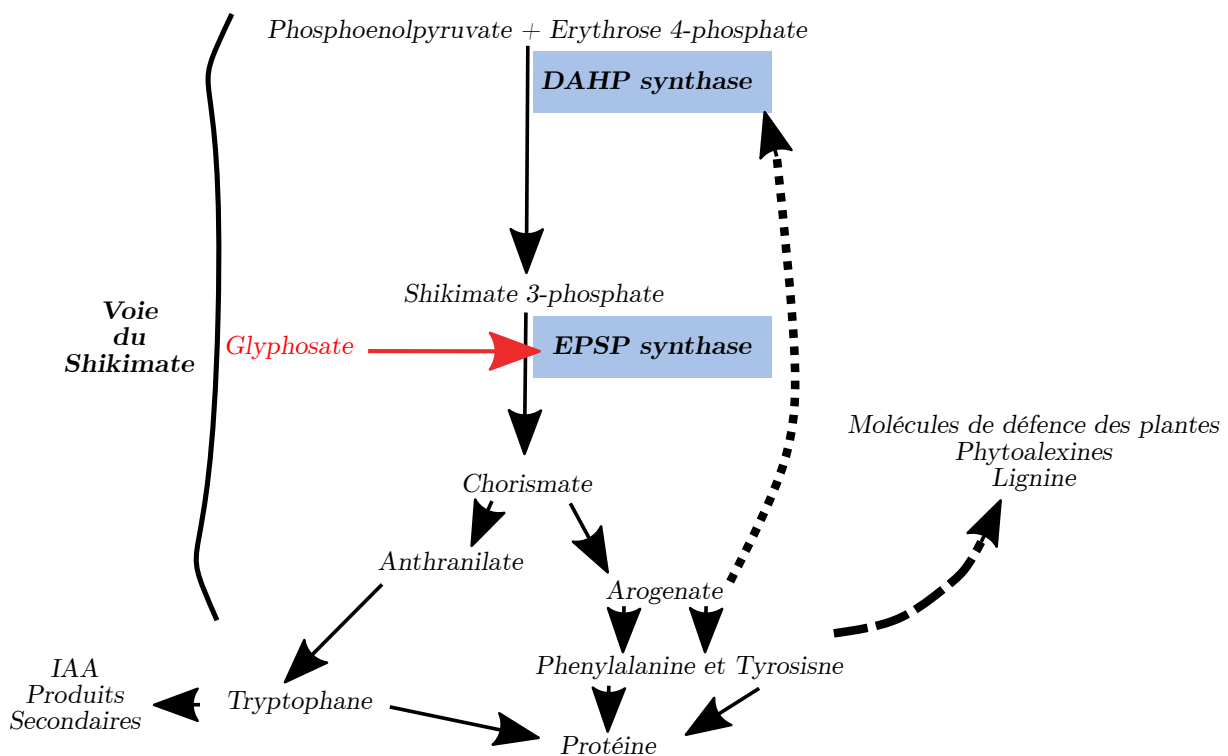


FIGURE 1 – Description de la voie du shikimate et site d'action du glyphosate d'après DUKE et POWLES [2008]. Les produits de la voie et les processus de rétro-inhibition (flèches en pointillés) sont également représentés. DAHP = 3-désoxy-7-phosphoheptulonate; EPSP = 5-enolpyruvyl—shikimate-3-phosphate; IAA = indole-3-acetic acid.

Des incertitudes liées à l'évaluation de son (éco)toxicité...

L'absence, chez les animaux, de la voie biochimique impliquée dans le mode d'action du glyphosate ainsi que certaines propriétés physico-chimiques favorables lui conférant une faible persistance dans l'environnement et une faible bioaccumulation dans les tissus animaux [DUKE, 2020; GIESY et collab., 2000] ont premièrement amené à conclure à la faible dangerosité de cette molécule pour les animaux et l'environnement [SPURRIER, 1973]. Les résultats de certaines études montrent néanmoins une toxicité du glyphosate, particulièrement lorsqu'il est associé aux co-formulants retrouvés dans les GBHs [ANNETT et collab., 2014; BRUGGEN et collab., 2018]. Isolés, ces co-formulants ont parfois une toxicité supérieure à celle de la substance active seule [MESNAGE et collab., 2019] et il apparaît donc crucial de les intégrer dans l'évaluation du risque associé au glyphosate [MESNAGE et ANTONIOU, 2018]. La toxicité du glyphosate, même dans le cas où elle est inférieure à celle des adjuvants, rentre bien évidemment également en compte dans la toxicité totale du produit formulé [JANSSENS et STOKS, 2017]. Le renouvellement de l'autorisation de mise sur le marché du glyphosate au niveau européen fait controverse. Cela est notamment lié à différentes méthodes d'évaluation des agences européennes ou internationales qui ne considèrent pas systématiquement à la fois le risque et le danger associé à la substance active et à ses formulations commerciales. Ces différences méthodologiques entraînent des conclusions parfois opposées, rendant les prises de décisions particulièrement difficiles [SZÉKÁCS et DARVAS, 2018] et qui sont compliquées de surcroît par la prise en compte de la toxicité des co-formulants présents dans les GBHs [VAN STRAALEN et LEGLER, 2018].

Le projet GlyphoTAC

Le projet GlyphoTAC a pour objectifs :

- d'évaluer l'écotoxicité du glyphosate pour la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, générant ainsi de nouveaux résultats scientifiques face aux interrogations subsistantes relatives à sa toxicité;
- d'identifier une potentielle modulation de la toxicité de la substance active liée à la présence de co-formulants, ce qui pourrait permettre d'appeler à la vigilance concernant l'autorisation de mise sur le marché des différentes formulations commerciales contenant ces composés;
- de comparer les effets induits par des expositions chroniques et des expositions aiguës, mais également évaluer les effets inter, trans et multigénérationnels chez des générations F1 et F2. Les poissons étant exposés dans l'environnement aux contaminants ubiquistes comme le glyphosate, ce possible impact générationnel et les mécanismes épigénétiques pouvant y être associés sont particulièrement intéressants à intégrer.

Pour répondre à ces différents objectifs, le présent manuscrit résume et discute les données pré-existantes de la littérature scientifique dans son premier chapitre. Le chapitre suivant décrit la méthodologie générale du projet et détaille les aspects techniques des différentes études expérimentales le composant. Les effets directs d'expositions aiguës et chroniques chez la truite arc-en-ciel sont consi-

dérés dans le troisième chapitre. La toxicité générationnelle fait l'objet des chapitres quatre et cinq chez des générations F1 et F2, respectivement. Une discussion de l'ensemble des études menées au regard des données de la littérature scientifique ainsi qu'une description des perspectives sont proposées dans le dernier chapitre de cette thèse. Enfin, une conclusion générale abordant les apports majeurs du projet dans le contexte de l'évaluation de l'écotoxicité du glyphosate clôture cet ouvrage.

Références

- ANNETT, R., H. R. HABIBI et A. HONTELA. 2014, «Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment», *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, n° 5, doi: [10.1002/jat.2997](https://doi.org/10.1002/jat.2997), p. 458–479, ISSN 0260-437X. 21, 22
- ANSES. 2019, «Synthèse des données de surveillance - Appui scientifique et technique N° 2017-04», cahier de recherche, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). URL https://www.anses.fr/fr/system/files/Fiche_PPV_Glyphosate.pdf. 20
- ANTIER, C., P. KUDSK, X. REBOUD, L. ULBER, P. V. BARET et A. MESSÉAN. 2020, «Glyphosate Use in the European Agricultural Sector and a Framework for Its Further Monitoring», *Sustainability*, vol. 12, n° 14, doi: [10.3390/su12145682](https://doi.org/10.3390/su12145682), p. 5682, ISSN 2071-1050. 19, 20
- BENBROOK, C. M. 2016, «Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally», *Environmental Sciences Europe*, vol. 28, n° 1, doi: [10.1186/s12302-016-0070-0](https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0), p. 3, ISSN 2190-4707. 19
- BROOKES, G., F. TAHERIPOUR et W. E. TYNER. 2017, «The contribution of glyphosate to agriculture and potential impact of restrictions on use at the global level», *GM Crops & Food*, vol. 8, n° 4, doi: [10.1080/21645698.2017.1390637](https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1390637), p. 216–228, ISSN 2164-5698. 19, 20
- BRUGGEN, A. V., M. HE, K. SHIN, V. MAI, K. JEONG, M. FINCKH et J. MORRIS. 2018, «Environmental and health effects of the herbicide glyphosate», *Science of the Total Environment*, vol. 616-617, doi: [10.1016/j.scitotenv.2017.10.309](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309), p. 255–268, ISSN 0048-9697. 20, 22
- DUKE, S. O. 2020, «Glyphosate : environmental fate and impact», *Weed Science*, vol. 68, n° 3, doi: [10.1017/wsc.2019.28](https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28), p. 201–207, ISSN 0043-1745. 22
- DUKE, S. O. et S. B. POWLES. 2008, «Glyphosate : a once-in-a-century herbicide», *Pest Management Science*, vol. 64, n° 4, doi: [10.1002/ps.1518](https://doi.org/10.1002/ps.1518), p. 319–325, ISSN 2078-6913. 11, 21
- GIESY, J. P., S. DOBSON et K. R. SOLOMON. 2000, «Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide», dans *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 167, Springer New York, p. 35–120, doi: [10.1007/978-1-4612-1156-3_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2). 22

- HERRMANN, K. M. et L. M. WEAVER. 1999, «THE SHIKIMATE PATHWAY», *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 50, n° 1, doi: [10.1146/annurev.arplant.50.1.473](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473), p. 473–503, ISSN 1040-2519. 21
- JANSSENS, L. et R. STOKS. 2017, «Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae», *Aquatic Toxicology*, vol. 193, n° July, doi: [10.1016/j.aquatox.2017.10.028](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.028), p. 210–216, ISSN 0166-445X. 22
- MESNAGE, R. et M. N. ANTONIOU. 2018, «Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides», *Frontiers in Public Health*, vol. 5, n° January, doi: [10.3389/fpubh.2017.00361](https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361), p. 1–8, ISSN 2296-2565. 22
- MESNAGE, R., C. BENBROOK et M. N. ANTONIOU. 2019, «Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 128, n° January, doi: [10.1016/j.fct.2019.03.053](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053), p. 137–145, ISSN 0278-6915. 22
- PALMA-BAUTISTA, C., J. VAZQUEZ-GARCIA, I. TRAVLOS, A. TATARIDAS, P. KANATAS, J. DOMÍNGUEZ-VALENZUELA et R. DE PRADO. 2020, «Effect of Adjuvant on Glyphosate Effectiveness, Retention, Absorption and Translocation in *Lolium rigidum* and *Conyza canadensis*», *Plants*, vol. 9, n° 3, doi: [10.3390/plants9030297](https://doi.org/10.3390/plants9030297), p. 297, ISSN 2223-7747. 20
- SITE DU MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION. «À partir du 1er janvier 2019, seuls les produits phytopharmaceutiques d'origine naturelle seront disponibles pour les jardiniers amateurs», URL <https://agriculture.gouv.fr/jardiner-avec-des-produits-dorigine-naturelle>. 20
- SPURRIER, E. C. 1973, «Glyphosate-a New Broad-Spectrum Herbicide», *PANS Pest Articles & News Summaries*, vol. 19, n° 4, doi: [10.1080/09670877309411846](https://doi.org/10.1080/09670877309411846), p. 607–612, ISSN 0030-7793. 22
- VAN STRAALLEN, N. M. et J. LEGLER. 2018, «Decision-making in a storm of discontent», *Science*, vol. 360, n° 6392, doi: [10.1126/science.aat0567](https://doi.org/10.1126/science.aat0567), p. 958–960, ISSN 0036-8075. 19, 22
- SZÉKÁCS, A. et B. DARVAS. 2018, «Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union», *Frontiers in Environmental Science*, vol. 6, doi: [10.3389/fenvs.2018.00078](https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078), p. 78, ISSN 2296-665X. 19, 22
- TORRETTA, V., I. KATSOYIANNIS, P. VIOTTI et E. RADA. 2018, «Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain», *Sustainability*, vol. 10, n° 4, doi: [10.3390/su10040950](https://doi.org/10.3390/su10040950), p. 950, ISSN 2071-1050. 19
- UDEIGWE, T. K., J. M. TEBOH, P. N. EZE, M. H. STIETIYA, V. KUMAR, J. HENDRIX, H. J. MASCA-GNI, T. YING et T. KANDAKJI. 2015, «Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health», *Journal of Environmental Management*, vol. 151, doi: [10.1016/j.jenvman.2014.11.024](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.024), p. 267–279, ISSN 1095-8630. 19

WYNN, S. C., S. K. COOK et J. H. CLARKE. 2014, «Glyphosate Use on Combinable Crops in Europe : Implications for Agriculture and the Environment», *Outlooks on Pest Management*, vol. 25, n° 5, doi: [10.1564/v25_oct_07](https://doi.org/10.1564/v25_oct_07), p. 327–331, ISSN 1743-1026. 20

Chapitre 1

Effets du glyphosate et des herbicides à base de glyphosate (GBHs) sur la santé des poissons : une revue bibliographique avec un focus particulier sur l'impact de faibles doses environnementales

« Connaitre, c'est comprendre toute chose au mieux de nos intérêts. »

Friedrich Nietzsche

Sommaire

1.1 Introduction	29
1.2 Description des molécules considérées	30
1.2.1 Glyphosate	30
1.2.2 Metabolite	31
1.2.3 Co-formulants	31
1.3 Exposition des écosystèmes aquatiques	32
1.3.1 Glyphosate	32
1.3.2 Co-formulants	33
1.4 Impact sur la survie	33
1.4.1 Effet du glyphosate seul ou co-formulé	33
1.4.2 Conclusions sur l'impact du glyphosate sur la survie	34
1.5 Impact sur la croissance	35
1.5.1 Effet du glyphosate seul ou co-formulé	35
1.5.2 Conclusions sur l'impact du glyphosate sur la croissance	35

1.6 Impact sur la reproduction	36
1.6.1 Effet du glyphosate seul ou co-formulé	36
1.6.2 Conclusions sur l'impact du glyphosate sur la reproduction	37
1.7 Impact sur le développement embryolaire	38
1.7.1 Effets du glyphosate seul ou co-formulé	38
1.7.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur le développement embryolaire	39
1.8 Impact sur le comportement	40
1.8.1 Effets du glyphosate seul ou co-formulé	40
1.8.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur le comportement des poissons	41
1.9 Impact sur les fonctions immuno-hématologiques	42
1.9.1 Effet du glyphosate seul et co-formulé	42
1.9.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur les paramètres immuno-hématologiques des poissons	44
1.10 Effets sur le métabolisme	45
1.10.1 Effet du glyphosate seul et co-formulé	45
1.10.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur le métabolisme des poissons	46
1.11 Impact sur le stress oxydant	47
1.11.1 Effet du glyphosate seul et co-formulé	47
1.11.2 Conclusions sur la capacité du glyphosate à engendrer du stress oxydant	48
1.12 Effets sur certaines enzymes spécifiques	49
1.12.1 Acétylcholinestérase	50
1.12.2 Anhydrase carbonique	51
1.12.3 Conclusions sur les effets du glyphosate sur certaines enzymes spécifiques	51
1.13 Mode d'action du glyphosate seul ou associé à des co-formulants	52
1.14 Effet du mode de transmission sur la toxicité liée au glyphosate et aux GBHS	54
1.15 Conclusions	57

1.1 Introduction

Le glyphosate, substance active herbicide retrouvée dans les pesticides commerciaux à base de glyphosate (GBHs), est la molécule la plus utilisée dans le monde. Depuis son introduction sur le marché par Monsanto en 1974, son usage dans le secteur agricole n'a cessé d'augmenter et est notamment passé au niveau global de 42 868 de tonnes en 1994 à 746 580 de tonnes en 2014 [BENBROOK, 2016]. En Europe, entre 2013 et 2017, le tonnage estimé des ventes de glyphosate était compris entre 46 981 et 49 427 tonnes [ANTIER et collab., 2020]. L'utilisation de ce composé à haute efficacité s'est très rapidement répandue en agriculture, générant une dépendance forte. Le développement, ces dernières années, de cultures génétiquement modifiées pour être résistantes à cette substance active a encore renforcé l'intérêt de son utilisation [SZÉKÁCS et DARVAS, 2018; TORRETTA et collab., 2018]. L'efficacité herbicide systémique au large spectre du glyphosate est associée à ses capacités d'inhiber l'enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate- 3-phosphate synthase (EPSPS) impliquée dans la voie de synthèse du shikimate chez les plantes [DUKE et POWLES, 2008].

L'ubiquité de ce composé chimique dans l'environnement pose nécessairement des questions concernant son écotoxicité, particulièrement quand il est associé à des co-formulants dans des GBHs. En considérant les différentes études disponibles dans la littérature, il apparaît que certains points concernant la toxicité des GBHs à long terme lors de l'exposition d'organismes à une dose sublétales de glyphosate restent encore à éclaircir [ANNETT et collab., 2014; BRUGGEN et collab., 2018]. L'objectif de cette revue de la littérature est de fournir une description détaillée de la toxicité décrite du glyphosate chez les poissons téléostéens, selon différentes modalités d'exposition. Un des points clefs consiste en la distinction des effets du glyphosate administré seul (substance active) ou co-formulé dans des GBHs. Les co-formulants présents dans les produits commerciaux ont pour objectif d'augmenter l'efficacité de la substance active [PALMA-BAUTISTA et collab., 2020]. Le glyphosate est le point commun de tous les GBHs, mais ceux-ci se différencient entre eux par une composition unique de leur formulation. Cette dernière est composée d'un ensemble de co-formulants, associé à la substance active, dont la nature et la concentration sont majoritairement inconnues, car protégées par le secret industriel [ANNETT et collab., 2014]. La toxicité du glyphosate dépend de la durée de l'exposition, du type d'exposition (c.-à-d. exposition simple, au glyphosate seul, ou exposition complexe à un GBH), de l'âge et de l'espèce considérée [FOLMAR et collab., 1979; GIESY et collab., 2000].

Dans cette revue de la littérature, les effets observés pour de faibles concentrations de substance active, dont le seuil est défini arbitrairement à $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, sont comparés aux effets induits par de fortes doses de glyphosate (c.-à-d. des doses supérieures à $0,5 \text{ mgL}^{-1}$), en intégrant le caractère aigu ou chronique de la contamination. Une majorité d'études s'est focalisée sur les effets de fortes concentrations de glyphosate sur des périodes très courtes (c.-à-d. exposition aiguë), en considérant des points finaux peu sensibles comme la croissance ou la reproduction [ANNETT et collab., 2014]. Il semble néanmoins également important de considérer des effets sublétaux qui peuvent se développer à des concentrations environnementales et qui pourraient impacter les organismes dans leurs milieux aquatiques naturels. En effet, les organismes aquatiques sont souvent dans un contexte de stress multiples, où les différents contaminants peuvent interagir entre eux mais également avec d'autres

facteurs biotiques et abiotiques, modifiant ainsi l'effet final de ces contaminants sur un organisme donné [ARTS et collab., 2017; GANDAR et collab., 2015]. Ainsi, certains effets sublétaux observés dans des études en laboratoires utilisant un seul composé chimique peuvent, dans l'environnement, être amplifiés par différents stress environnementaux (p. ex. l'exposition à différents produits chimiques, encore appelée "effet cocktail", à différents stress abiotiques comme des changements de température ou d'oxygénation de l'eau, à des stress biotiques comme des infections par des pathogènes) et ainsi impacter, au final, la valeur sélective des individus et, par extension, les populations naturelles.

Le mode d'action toxique du glyphosate sur les organismes aquatiques non-cibles n'est pas encore clairement défini. Il est probablement multiple et variable en fonction du mode de contamination et de l'espèce considérée [ANNETT et collab., 2014]. Cette revue propose donc également une analyse de modes d'action toxiques potentiels en fonction des modes de contamination (simples ou complexes) et de la dose de substance active considérée.

Enfin, un point largement moins étudié est celui de la transmission générationnelle du glyphosate. Plusieurs autres études, portant sur différentes espèces animales et d'autres substances que le glyphosate, montrent une transmission de la toxicité par les parents (génération F1) ou par les grands-parents (génération F2) voire par les arrière-grands-parents et les générations antérieures (\geq F3). Bien que la transmission générationnelle de la toxicité du glyphosate chez les poissons soit peu documentée, le dernier point clef de cet état de l'art vise à discuter ce mode de transmission à la lumière des études déjà réalisées sur les poissons, mais aussi sur d'autres espèces, en intégrant d'autres contaminants ou stressseurs environnementaux.

1.2 Description des molécules considérées

1.2.1 Glyphosate

Le glyphosate (formule $C_3H_8NO_5P$; CAS 1071-83-6, Figure 1.1) et son sel d'isopropilamine (formule $C_3H_9NC_3H_8NO_5P$; CAS 38641-94-0), sont deux substances organophosphorées utilisées pour leur propriété herbicide [BONNARD et collab., 2019]. À la différence du glyphosate, le glyphosate sous forme de sel d'isopropilamine est très soluble dans l'eau. Une description de certains paramètres physico-chimiques liés au glyphosate et à son métabolite principal, l'AMPA, est présentée dans le tableau 1.1.

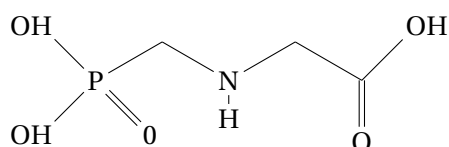


FIGURE 1.1 – Molécule de glyphosate.

1.2.2 Metabolite

L'acide aminométhylphosphonique (AMPA) est le métabolite principal du glyphosate (Figure 1.2). Il est issu de la dégradation, principalement par les microorganismes, du glyphosate en AMPA et en glyoxylate par la glyphosate-oxydoréductase [GRANDCOIN et collab., 2017].

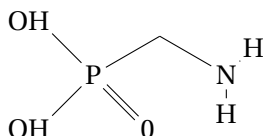


FIGURE 1.2 – Molécule d'AMPA

TABEAU 1.1 – Description de paramètres physico-chimiques associés au glyphosate et à son métabolite principal, l'AMPA. Données extraites du rapport de l'Ineris [INERIS, 2020].

	Glyphosate	AMPA
Formule chimique	C ₃ H ₈ NO ₅ P	CH ₆ NO ₃ P
Masse molaire (g mol⁻¹)	169,07	186,17
CAS	1071-83-6	1066-51-9
Solubilité	10 à 12 g L ⁻¹ à 20 °C et pH 2	-
Forme physique	Solide	Solide
Concentration eaux de surface* (µg L⁻¹)	Moyenne : 0,22 Médiane : 0,076 Max : 558	Moyenne : 0,45 Médiane : 0,015 Max : 164

*Quantification eaux de surface en France selon la base de données Naiade entre 2014 et 2018.

1.2.3 Co-formulants

Un large panel de co-formulations à base de glyphosate existe sur le marché. Ces formulations sont constituées de glyphosate associé à des co-formulants dont la nature et la proportion relative sont propriétaires (c.-à-d. protégées légalement par le secret industriel; [ANNETT et collab., 2014]) et ne sont donc connues que par le producteur ainsi que par les agences chargées de l'évaluation officielle des dossiers d'autorisation de mise sur le marché des formulations commerciales. La nature de certains co-formulants incorporés dans les GBHs est néanmoins connue par le grand public. C'est le cas de la polyoxyéthylène tallowamine (POE-tallowamine), retirée du marché français en 2016 et désormais remplacée par des surfactants moins toxiques de type polyoxyéthylène amine (POEA) [MESNAGE et collab., 2019]. D'autres co-formulants, comme le nitrotyl ou les alkyles polyglucosides, sont aussi utilisés [MESNAGE et collab., 2019]. Le POE-tallowamine a été décrit, il y a de nombreuses années, comme étant plus toxique pour les poissons que le glyphosate lui-même [FOLMAR et collab.,

1979]. Il apparaît donc nécessaire d'inclure dans les études de toxicologie les co-formulants associés au glyphosate dans les GBHs [MESNAGE et ANTONIOU, 2017, 2018; MESNAGE et collab., 2019]. Dans les parties suivantes, il est important de noter que quand une concentration est donnée pour un GBH, cette concentration correspond à la concentration de glyphosate dans ce GBH. Ainsi, une exposition à 1 gL^{-1} d'un GBH correspond à une exposition à 1 gL^{-1} de glyphosate associé à une concentration inconnue de plusieurs co-formulants.

1.3 Exposition des écosystèmes aquatiques

1.3.1 Glyphosate

La présence et la quantité de glyphosate dans les eaux de surface dépendent du bassin agricole considéré, de la fréquence de traitement et de la dose d'herbicide appliquée [COUPE et collab., 2011]. Les plus fortes concentrations sont retrouvées dans les zones où l'herbicide est massivement utilisé et où de fortes pluies amènent le composé chimique directement dans les eaux de surface sans qu'il n'ait pu passer un certain temps dans le sol, dans lequel des micro-organismes peuvent habituellement le dégrader. La présence de glyphosate dans les eaux de surface est aussi dépendante de sa demi-vie, qui peut varier de plusieurs jours à plusieurs mois en fonction des propriétés physico-chimiques et biologiques du site considéré [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015; MYERS et collab., 2016]. GIESY et collab. [2000] ont rapporté une demi-vie plus courte du glyphosate dans le milieu aquatique (entre 7 et 14 jours) que dans le sol (entre 1,2 et 197,3 jours). Les valeurs reportées par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), et donc celles considérées lors de la dernière ré-évaluation de l'autorisation de mise sur le marché du glyphosate au niveau européen, étaient comprises entre 2,8 et 500,3 jours dans le sol et 6,8 et 21,8 jours dans la phase aqueuse d'un système eau-sédiment [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015]. Il est donc possible que la dégradation du composé, bien que variable, soit accélérée dans le milieu aquatique. Quoi qu'il en soit, l'utilisation fréquente de GBHs, à de fortes concentrations, entraîne une quasi-ubiquité de la substance active dans le milieu aquatique.

Un rapport de l'Anses a établi qu'entre 2007 et 2017, en France, le glyphosate et l'AMPA avaient une forte prévalence. Les auteurs indiquent que le glyphosate a été retrouvé dans 22,2% des prélèvements d'eaux de surface en 2007 et dans 49,7% en 2017. L'AMPA, sur les mêmes années, a été détecté respectivement dans 43,1 et 74,4% des prélèvements. Ces données montrent que la prévalence de ces deux composés suit globalement une courbe ascendante sur cette période de 10 ans. Les valeurs maximales de concentrations moyennes retrouvées chaque année, tous points de prélèvement confondus, présentaient une grande variabilité entre les années avec des valeurs comprises entre $2,4$ et $70,2 \mu\text{gL}^{-1}$ ainsi que $8,4$ et $67,8 \mu\text{gL}^{-1}$ pour le glyphosate et l'AMPA, respectivement [ANSES, 2019]. Il faut ici préciser que seule une des analyses effectuées en 10 ans sur 21 561 points de prélèvements dépassait la valeur de concentration maximale pour laquelle aucun effet indésirable pour l'environnement n'est prédit (PNEC) et qui est, selon ce même rapport, de $60 \mu\text{gL}^{-1}$.

L'EFSA prédisait, en 2015, une concentration maximale de glyphosate dans les eaux de surface en Europe (PEC_{SW}) de $104,8 \mu\text{gL}^{-1}$ selon le scénario d'exposition le plus pessimiste (c.-à-d. le scénario pire-cas) [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015]. Il est important de noter que, dans les régions du monde où la culture de plantes modifiées génétiquement pour être résistantes au glyphosate est pratiquée, des concentrations plus fortes peuvent être retrouvées dans l'environnement (p. ex. des concentrations supérieures à $300 \mu\text{gL}^{-1}$ ont été mesurées dans certains cours d'eau aux États-Unis d'Amérique; [BRUGGEN et collab., 2018]). Lors de dispersions ponctuelles de glyphosate, comme dans le cas du contrôle du développement algal, des concentrations relativement élevées peuvent également être observées de façons périodiques [GIESY et collab., 2000; GONÇALVES et collab., 2019].

1.3.2 Co-formulants

Les études évaluant la persistance et la prévalence dans l'environnement des co-formulants des GBHs sont rares par rapport au nombre d'études disponibles sur la substance active. Toutefois, des travaux ont été réalisés sur le POE-tallowamine, interdit en France depuis 2016. GIESY et collab. [2000] ont rapporté que, contrairement au glyphosate, ce co-formulant aurait une demie-vie plus longue dans l'eau, avec des valeurs comprises entre 21 et 42 jours, que dans le sol, dans lequel elle serait inférieure à une semaine. En 2015, une étude a démontré que ce surfactant non ionique avait une demi-vie d'environ 13 à 18 heures dans un microcosme expérimental, dépendamment de la composition du sédiment [WANG et collab., 2005]. Plus récemment, TUSH et collab. [2018] ont mis en évidence du POE-tallowamine dans le sol et le sédiment des bassins-versants agricoles. Bien que pouvant contaminer les eaux de surface, ce surfactant était tout de même retrouvé en plus faibles quantités comparées au glyphosate et à l'AMPA.

1.4 Impact sur la survie

De nombreuses équipes de recherche se sont penchées sur l'impact de la toxicité du glyphosate sur la survie des poissons, en testant différentes modalités d'exposition (revues de EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY [2015]; GIESY et collab. [2000]; KENNEDY [2017]) qui permettent d'examiner l'influence de certains paramètres comme le stade de vie, la présence ou non de co-formulants, la nature des formulations, l'espèce considérée, mais également des propriétés physico-chimiques du milieu.

1.4.1 Effet du glyphosate seul ou co-formulé

La valeur de référence pour la substance active seule retenue dans le rapport de l'EFSA [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015] présente une valeur de concentration létale pour la moitié des poissons contaminés de l'expérimentation (DL_{50}) en 96 h de 38mgL^{-1} pour l'espèce *Oncorhynchus mykiss* et de 123mgL^{-1} pour l'espèce *Danio rerio*. Pour *O. mykiss*, cette valeur, répétée lors d'une exposition à un GBH, est de 306mgL^{-1} de substance active. Une toxicité plus forte de la substance active est donc indiquée dans le rapport de l'EFSA, ce qui est généralement retrouvé pour des formulations commerciales n'incluant pas de surfactant de type polyoxyéthylène amine (POEA), ce der-

nier augmentant la toxicité globale d'un facteur environ égal à 10 [MESNAGE et collab., 2019]. Il est également intéressant de noter que, dans leur étude, WAN et collab. [1989] ont montré que, dépendamment de l'espèce de salmonidés ainsi que du type d'eau considérés (c.-à-d. provenance, dureté), toutes les formulations de glyphosate ne se sont pas révélées aussi toxiques que le glyphosate pur. Les auteurs évoquent l'impact potentiel de la concentration de l'un des adjuvants communs aux trois formulations testées sur les propriétés physico-chimiques de l'eau, celles-ci pouvant influencer la toxicité du glyphosate. Cette influence des paramètres physico-chimiques de l'eau a également été rapportée par FOLMAR et collab. [1979].

De manière générale, une plus forte toxicité des GBHs par rapport à la substance active seule peut être théoriquement liée à trois configurations :

1. la présence de co-formulants ayant une plus forte toxicité que le glyphosate (et ce indépendamment de celui-ci). La toxicité des co-formulants vient s'ajouter, dans ce cas-là, à celle du glyphosate ;
2. une potentialisation de l'effet du glyphosate par les co-formulants qui pourraient, par exemple, faciliter la pénétration de la substance active dans les tissus ;
3. un effet synergique entre la toxicité du glyphosate et celle des adjuvants, entraînant une toxicité supérieure à l'addition des toxicités individuelles des produits séparés.

Le stade de vie influe aussi sur la sensibilité d'une même espèce vis-à-vis de la contamination chimique. Les stades de vie précoce et juvénile des poissons semblent être les plus sensibles à la contamination au glyphosate [KENNEDY, 2017], même si toutefois les résultats obtenus varient en fonction des études considérées. Certains auteurs ont notamment observé une augmentation significative du taux de mortalité chez les stades précoces de l'espèce *D. rerio* à partir de concentrations en glyphosate de $50 \mu\text{gL}^{-1}$ lors d'expositions sous forme pure [FIORINO et collab., 2018], quand d'autres la rapportent à partir de 1mgL^{-1} [SULUKAN et collab., 2017] ou de $8,5 \text{mgL}^{-1}$ [LANZARIN et collab., 2019] lors d'expositions sous forme de GBHs, voir à partir de 400mgL^{-1} lors d'expositions à la substance active seule [ZHANG et collab., 2017]. À ce stade de vie, l'espèce *Cyprinus carpio* paraissait encore plus sensible et FIORINO et collab. [2018] ont noté une augmentation significative du taux de mortalité dès $5 \mu\text{gL}^{-1}$ de substance active seule. Au stade juvénile, la valeur de DL_{50} à 96 h pour *Oreochromis niloticus* exposé au glyphosate seul était de $1,05 \text{mgL}^{-1}$ [SELVARANI et collab., 2019], tandis que cette valeur, chez une espèce moins sensible comme *Jordanella floridae*, était de 30mgL^{-1} [HOLDWAY et DIXON, 1988].

1.4.2 Conclusions sur l'impact du glyphosate sur la survie

La toxicité du glyphosate, associé ou non à des co-formulants, dépend d'un nombre important de paramètres à la fois biologiques (p. ex. âge, espèce, condition nutritionnelle) et physico-chimiques (p. ex. type d'eau, température). Certains produits co-formulés semblent présenter une toxicité supérieure à celle de la substance active seule dépendamment de la présence de co-formulants toxiques qui tendent néanmoins à être remplacés dans les nouvelles formulations commerciales [MESNAGE

et collab., 2019]. Toutefois, le glyphosate possède aussi sa propre toxicité et l'existence de possibles mécanismes d'interactions entre les co-formulants et la substance active ne peut être écartée. Quoiqu'il en soit, comme le confirme l'EFSA [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015], les impacts du glyphosate ou des GBHs sur la survie sont retrouvés pour des concentrations en glyphosate qui sont probablement peu rencontrées dans les pays où l'utilisation de cet herbicide est contrôlée, comme c'est le cas en Europe.

1.5 Impact sur la croissance

La croissance est un paramètre capital dans la biologie des poissons, elle conditionne leur valeur sélective puisqu'une atteinte rapide de la taille de maturité sexuelle augmente les chances de reproduction et l'évitement des prédateurs. Ce paramètre est donc très souvent utilisé pour quantifier le risque associé à des contaminants chimiques sur une espèce définie.

1.5.1 Effet du glyphosate seul ou co-formulé

L'EFSA, dans son rapport publié en 2015 [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015], indique que les plus fortes concentrations n'induisant aucun effet observable (NOECs en relation avec la croissance) étaient de 25.7, 9,6 et 1 mgL⁻¹ pour les espèces *Pimephales promelas*, *O. mykiss* et *Brachydanio rerio*, respectivement. MORGAN et KICENIUK [1992] n'ont pourtant trouvé aucun effet sur la croissance de *O. mykiss* juvéniles exposées durant 2 mois à une concentration environnementale de GBH (comprise entre 6.25 et 100 µgL⁻¹ de substance active). MER et collab. [2013] n'ont pas non plus observé d'effet de la substance active sur la croissance de l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) exposée à des concentrations comprises entre 0.1 et 100 µgL⁻¹ durant 42 jours. La croissance en taille et en poids de *Leporinus obtusidens*, sur une période de 90 jours, a par contre été impactée par un GBH à une dose de substance active de 1 et 5 mgL⁻¹ [SALBEGO et collab., 2010].

1.5.2 Conclusions sur l'impact du glyphosate sur la croissance

Au vu des quelques données disponibles dans la littérature, le glyphosate, co-formulé ou non, semble avoir un impact sur la croissance des poissons. Cet effet est toutefois visible à des concentrations probablement supérieures à 1 mgL⁻¹ et varie en fonction de l'espèce considérée. Compte tenu de la concentration nécessaire pour que le glyphosate, seul ou associé à des co-formulants, ait un impact sur la croissance, seuls les individus appartenant à des espèces sensibles et vivant dans des zones particulièrement exposées (p. ex. étangs recevant les écoulements de champs contenant des cultures traitées avec de fortes doses de GBHs) sont à risque potentiel.

1.6 Impact sur la reproduction

Le glyphosate étant un composé universellement répandu dans l'environnement, les organismes terrestres et aquatiques y sont exposés durant toutes les phases de leur développement. Des équipes de recherches se sont intéressées à évaluer l'impact potentiel du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé reproductive des animaux (mammifères : revue par MESNAGE et collab. [2015]; poissons : revue par ARGOU-CARDOZO et ZEIDÁN-CHULIÁ [2019]). Les contaminants aquatiques ont en effet été pointés du doigt pour leurs propriétés à influencer les capacités reproductives des poissons, de manière directe ou indirecte (p. ex. baisse de la fertilité, diminution de la survie de la progéniture), via différents effets tels que la perturbation hormonale ou la modification du comportement [SEGNER, 2011].

1.6.1 Effet du glyphosate seul ou co-formulé

L'exposition aiguë d'adultes de l'espèce *Hypomesus transpacificu* à une dose comprise entre 0.078 et 896 mgL⁻¹ de glyphosate via un GBH a entraîné une perturbation du taux d'une hormone sexuelle, la 17β-estradiol, uniquement chez les mâles et pour les concentrations d'exposition basses (c.-à-d. 0.078 et 0,710 mgL⁻¹) et la concentration haute (c.-à-d. 896 mgL⁻¹) mais, de manière surprenante, pas aux concentrations médianes [JIN et collab., 2018]. Une réduction de la fécondité relative associée à une augmentation de la taille des embryons de *Amatitlania nigrofasciata* a également été rapportée chez des adultes exposés pendant 96 h à une dose de 0,36 mgL⁻¹ d'un GBH [ZEBRAL et collab., 2018].

En ce qui concerne les expositions chroniques, ARMILIATO et collab. [2014] ont démontré qu'une exposition de 15 jours à une concentration de glyphosate pur de 65 μgL⁻¹ pouvait induire une augmentation du diamètre des ovaires chez des femelles de *D. rerio*, avec des changements au niveau de leurs ultrastructures probablement associées à la surexpression d'un gène impliqué dans le contrôle endocrinien de la maturation ovarienne. Concernant les expositions aux GBHs, une concentration en glyphosate de 0,5 mgL⁻¹ a impacté la reproduction de *Jenynsia multidentata* en réduisant le succès d'accouplement des mâles [SÁNCHEZ et collab., 2017]. SOSO et collab. [2007] ont également détecté une diminution du taux de 17β-estradiol chez *Rhamdia quelen* après une exposition de 40 jours à un GBH à une concentration de 3,6 mgL⁻¹ de glyphosate. L'équipe de SMITH et collab. [2019] n'a observé aucune modification évidente de la fécondité et de la fertilité lors d'une exposition chronique de *Oryzias latipes* au glyphosate seul ou co-formulé. Toutefois, une modulation de l'expression de certains gènes impliqués dans la spermatogénèse à une concentration de 0,5 mgL⁻¹ a été notée. Cette étude a également montré certains effets toxiques des co-formulants mais aussi, parfois, leur capacité à réduire les perturbations engendrées par la substance active.

Plusieurs études indiquent également une toxicité du glyphosate seul ou co-formulé sur le sperme de différentes espèces de poissons. Une réduction considérable de la mobilité du sperme a notamment été mise en évidence par LOPES et collab. [2014] chez les mâles de *D. rerio* exposés durant 24 et 96 h à 5 et 10 mgL⁻¹ de glyphosate. Ce résultat était associé à une réduction de l'intégrité de l'ADN, à

des dommages membranaires et à une diminution de la fonctionnalité mitochondriale. À noter néanmoins que les concentrations testées sont rarement retrouvées dans l'environnement. Par contre, à de très faibles concentrations (c.-à-d. aussi basses que $50 \mu\text{gL}^{-1}$ de glyphosate), GONÇALVES et collab. [2018] ont montré qu'un GBH pouvait diminuer *in vitro* la mobilité du sperme de *Astyanax lacustris*. Lors d'une étude *in vivo*, SÁNCHEZ et collab. [2017] ont mis en évidence une diminution de la mobilité du sperme de *Jenynsia multidentata* exposés de façon aiguë à une dose de $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ d'un GBH. À des concentrations plus proches de celles rencontrées dans l'environnement (c.-à-d. 0,13 et $0,7 \text{ mgL}^{-1}$ de substance active), l'exposition aiguë d'adultes de l'espèce *Poecilia vivipara* à un GBH a engendré une réduction de la qualité du sperme, particulièrement marquée à la plus forte concentration testée et potentiellement due à une réduction de l'intégrité membranaire [CA et collab., 2013].

1.6.2 Conclusions sur l'impact du glyphosate sur la reproduction

L'impact du glyphosate sur la reproduction des poissons a été étudié par un nombre relativement restreint d'équipes de recherche, qui se sont particulièrement concentrées sur les co-formulations. Quelques études utilisant le glyphosate pur montrent cependant que ce dernier, à des concentrations inférieures à $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, peut perturber l'expression de certains gènes ou le taux de certaines hormones impliquées dans la reproduction. Dans certains cas, la présence d'adjuvants dans les formulations à base de glyphosate semble modifier l'impact de la substance active. Chez les mâles, la principale modification observée est une diminution de la qualité du sperme, pouvant être engendrée par des expositions chroniques comme aiguës. Si certaines études montrent des effets à des doses inférieures à $0,5 \text{ mgL}^{-1}$, ceux-ci varient en fonction de l'espèce considérée et sont toutefois observés à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans l'environnement aquatique en Europe. Des études complémentaires seraient intéressantes sur le sperme des poissons, et notamment : 1. une comparaison, *in vitro*, de la substance active et de différents GBHs, afin de voir si l'effet rapporté dans la littérature est associé à la substance active, aux co-formulants ou aux interactions entre les deux; 2. une détermination des niveaux de concentration en glyphosate retrouvés dans le sperme de poissons exposés *in vivo*, le glyphosate étant faiblement bioaccumulable dans les tissus animaux [DUKE, 2020], cela permettrait d'évaluer si ceux-ci sont suffisants pour inhiber sa mobilité. Plusieurs travaux montrent des effets reprotoxiques ne suivant pas une réponse monotone (c.-à-d. dont la dose d'exposition n'est pas systématiquement corrélée positivement aux effets toxiques induits). Les mécanismes d'action responsables de telles réponses ne sont pas clairement identifiés et des études doivent être engagées pour mieux caractériser l'impact du glyphosate sur la reproduction à de faibles doses environnementales, particulièrement dans le cas d'expositions prolongées, et les modes d'action associés. En effet, dans certaines études, les doses employées ne sont pas adaptées à la mise en évidence d'un effet reprotoxique lié, par exemple, à une activité de perturbation endocrinienne [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2017; MESNAGE et collab., 2015]. De plus, il est nécessaire, afin de faciliter les prises de décision des autorités réglementaires en charge des autorisations d'utilisation des GBHs, que le protocole expérimental de ces études permette la discrimination des effets associés au glyphosate pur de ceux induits par le glyphosate associé à différents co-formulants.

1.7 Impact sur le développement embryolarvaire

Le développement embryo-larvaire chez les poissons téléostéens est un processus complexe où se succèdent différentes étapes critiques dont la synchronisation précise est indispensable pour la survie des individus [ARAL et collab., 2011]. Cette phase de développement précoce est particulièrement sensible aux pesticides et les effets observés durant cette dernière sont aussi prédictifs des effets reprotoxiques [WHEELER et collab., 2014].

1.7.1 Effets du glyphosate seul ou co-formulé

L'exposition de *D. rerio* à un GBH durant l'embryogenèse, à des concentrations de substance active comprises entre 1 et 100 mgL⁻¹, a permis de mettre en évidence que seule la plus forte concentration testée retardait l'éclosion à 72 hpf [SULUKAN et collab., 2017]. En revanche, lors d'une exposition au glyphosate pur, une éclosion précoce a été observée mais cependant à une très forte concentration (c.-à-d. 400 mgL⁻¹) [ZHANG et collab., 2017]. Les auteurs relevaient que ce phénomène pourrait être potentiellement associé à une réduction de la tension de surface du chorion ainsi qu'à une activité locomotrice élevée des embryons. Toujours chez la même espèce, les résultats de FIORINO et collab. [2018] ont confirmé qu'un retard de l'éclosion était possiblement engendré par une dose de substance active pure élevée et comprise entre 5 et 50 mgL⁻¹. À plus faibles concentrations, la dose de 50 µgL⁻¹ a entraîné une augmentation du pourcentage d'éclosion alors qu'aucun effet n'était observé à 5 µgL⁻¹. Dans une autre étude, effectuée sur l'espèce *Amatitlania nigrofasciata*, ZEBRAL et collab. [2018] ont rapporté qu'une exposition aiguë à un GBH à une concentration de 3,6 mgL⁻¹ de substance active entraînait un retard dans le développement embryonnaire.

L'apparition de malformations lors du développement des stades embryo-larvaires de poissons est communément engendrée par l'exposition au glyphosate seul ou co-formulé. FIORINO et collab. [2018] ont observé, lors d'exposition à la substance active seule, que la fréquence de malformations était augmentée à partir d'une concentration de 5 µgL⁻¹ chez *C. carpio* tandis que celle-ci était peu impactée, même à 50 mgL⁻¹, chez *D. rerio*. Pourtant, chez cette espèce, d'autres auteurs ont détecté une augmentation du taux de malformations ainsi qu'une diminution de différents paramètres morphométriques à une concentration de 8,5 mgL⁻¹. À une plus forte concentration (c.-à-d. des doses supérieures à 100 mgL⁻¹), un effet similaire de la contamination au glyphosate pur a été observé par ZHANG et collab. [2017] chez les larves de *D. rerio* telles qu'une diminution de la longueur du corps, de la surface de la tête et de l'œil. Chez la même espèce cette fois-ci contaminée à un GBH, l'exposition, durant l'embryogenèse, à des concentrations de substance active comprises entre 1 et 100 mgL⁻¹ induisaient des malformations sévères, concentration-dépendantes, sur les larves telles que des oedèmes péricardiques et du sac vitellin, des courbures vertébrales et des malformations du corps [SULUKAN et collab., 2017]. Toujours chez *D. rerio*, des concentrations comprises entre 11,7 et 58,3 mgL⁻¹ de glyphosate engendraient également une réduction du gonflement de la vessie natatoire potentiellement associée à l'inhibition (vérifiée *in silico* par les auteurs) de l'hexokinase des embryons. Dans une autre étude, l'exposition durant le stade embryo-larvaire de *D. rerio* à la concentration de

0,5 mgL⁻¹ de substance active pure induisait une réduction du diamètre oculaire tandis que toutes les doses testées (c.-à-d. de 0.01 à 0,5 mgL⁻¹) généraient une réduction de la longueur totale des poissons lorsque l'exposition se faisait via un GBH [BRIDI et collab., 2017]. D'autre part, il a été démontré qu'une exposition de *Odontesthes humensis* à un GBH lors de l'embryogenèse à des concentrations en substance active allant de 0.36 à 5,43 mgL⁻¹, conduisait à une réduction concentration-dépendante du diamètre de l'œil ainsi que de l'espace entre les deux yeux des embryons [ZEBRAL et collab., 2017]. L'exposition chronique de stades précoces de l'espèce *O. mykiss* à un GBH n'a pas induit de malformations larvaires aux concentrations de 0.1 et 1 mgL⁻¹ [WEEKS SANTOS et collab., 2019]. En revanche, les auteurs ont noté une diminution de la longueur de la tête durant l'exposition à la plus forte concentration. Aussi, les deux concentrations testées diminuaient le ratio entre la longueur de la tête et celle du corps.

D'autres formes d'expression de la toxicité du glyphosate seul ou co-formulé ont également été observées à des niveaux d'intégrations biologiques plus faibles. Des embryons de *D. rerio*, lors d'une exposition de 24 h à 50 mgL⁻¹ de glyphosate pur, ont présenté des perturbations du développement cardiaque et cérébral [ROY et collab., 2016a,b]. Toujours au niveau cardiaque, la présence de co-formulants n'a pas modifié les effets toxiques observés sur le développement cardiaque avec la substance active seule. LANZARIN et collab. [2019] ont aussi détecté une diminution du rythme cardiaque chez cette espèce exposée à une dose de 5 mgL⁻¹ de substance active via un GBH. Certains auteurs ont rapporté qu'une concentration de substance active pure de 10 mgL⁻¹ avait induit une modulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement embryonnaire [ZHANG et collab., 2017]. Une exposition au glyphosate, à l'AMPA, à un GBH ou à un co-formulant de type amine grasse de suif éthoxylée (polyéthoxylated tallow amine ou POEA) avait généré des dommages à l'ADN, mis en évidence par le test des comètes chez les larves de *D. rerio*, quelque soit le contaminant considéré [DE BRITO RODRIGUES et collab., 2019]. Ce résultat n'a pas été observé par WEEKS SANTOS et collab. [2019] sur des larves de *O. mykiss* exposées à un GBH durant le développement embryo-larvaire à des concentrations en substance active de 0.1 et 1 mgL⁻¹. Par contre, sur une lignée cellulaire de foie de truite exposée à ces deux concentrations, les auteurs ont mis en évidence une génotoxicité induite par la contamination avec la substance active seule ou avec un GBH.

1.7.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur le développement embryo-larvaire

Au vu des différentes études réalisées sur l'effet du glyphosate seul ou co-formulé sur le développement embryo-larvaire des poissons, ce stade de développement critique apparaît être le plus sensible à la contamination par la substance active ou un GBH. Lorsque ce stade de développement coïncide, dans le milieu naturel, avec une hausse de la concentration en glyphosate, des effets négatifs sur le développement et la survie à long terme des poissons peuvent être attendus. Cependant, les effets observés varient considérablement en fonction de l'espèce de poisson considérée ainsi que de

la dose de glyphosate et de la présence ou non de co-formulants. Lors de l'exposition de stades précoces aux GBHs, la présence de co-formulants semble, dans certains cas, moduler les effets toxiques observés.

1.8 Impact sur le comportement

Le comportement est défini comme une séquence d'actions quantifiables permises par le contrôle du système nerveux à la fois périphérique et central. Il est influencé par des processus génétiques, biochimiques et physiologiques et est constamment ajusté grâce aux informations internes et externes reçues par l'organisme, lui permettant de faire face à un environnement changeant [HALAPPA et DAVID, 2009]. L'étude du comportement est un outil intéressant pour les études écotoxicologiques, particulièrement dans le cas du glyphosate. Il est considéré comme un point final sensible permettant de détecter les effets de faibles doses qui pourraient se répercuter sur la survie des populations naturelles [LUIS et collab., 2011].

1.8.1 Effets du glyphosate seul ou co-formulé

Plusieurs auteurs ont notamment observé des perturbations du comportement exploratoire ou de nage de l'espèce *D. rerio* en réponse à une exposition aiguë ou chronique au glyphosate seul ou co-formulé. Dans le cas des expositions au glyphosate pur, ZHANG et collab. [2017] ont observé qu'une exposition durant le développement embryonnaire de l'espèce *D. rerio* pouvait engendrer une modification du comportement des larves, avec une augmentation de l'activité durant la journée ainsi qu'une augmentation de l'activité motrice. Cette observation a été particulièrement mise en évidence pour des concentrations comprises entre 0.01 et 1 mgL⁻¹, alors que des concentrations jusqu'à 10 mgL⁻¹ avaient été testées. Chez la même espèce, une réduction du comportement anti-prédateur (c.-à-d. de la réaction d'effarouchement) a été remarquée après seulement 24 h d'exposition à une dose de 15 µgL⁻¹, tandis qu'aucun effet n'est survenu à une concentration dix fois supérieure [FARIA et collab., 2020]. Toutefois, des modifications comportementales des stades précoces chez cette espèce n'ont pas toujours été mises en évidence. Dans leur étude, LANZARIN et collab. [2020] n'ont notamment montré aucune modification du comportement de larves de truites exposées pendant l'embryogenèse à des concentrations de glyphosate comprises entre 1 et 5 µgL⁻¹ de glyphosate. Au stade adulte de l'espèce *D. rerio*, une modification du comportement exploratoire et natatoire des poissons exposés à des doses de substance active de 0.065 et 0,5 mgL⁻¹ (mais pas à une dose intermédiaire) via un GBH a été détectée. Lors d'une exposition au glyphosate pur, seule la plus forte concentration a engendré cet effet [BRIDI et collab., 2017]. Dans le même sens, une période de 7 jours d'exposition sous forme de GBH à des doses de substances actives comprises entre 0.065 et 10 mgL⁻¹ a induit un changement comportemental chez des adultes de l'espèce *D. rerio* [PEREIRA et collab., 2018]. Le comportement des poissons a été différent en fonction de la concentration testée et, de plus, le changement comportemental le plus important a été observé pour la plus faible dose testée. Selon les auteurs, ces changements pourraient être associés à un dysfonctionnement mitochondrial au niveau

du cerveau générant lui-même, potentiellement, une production d'espèce réactive de l'oxygène et une réduction de la viabilité cellulaire. Au même stade de vie chez la même espèce, DA COSTA CHAULET et collab. [2019] ont observé des résultats similaires chez des poissons exposés de façon aiguë à des concentrations de 3 à 5 mgL⁻¹ de glyphosate, poissons qui passaient plus de temps dans la partie haute de l'aquarium. En revanche, les auteurs n'ont observé aucun effet à la dose de 1 mgL⁻¹. Ces comportements, probablement induits par le stress chimique, pourraient entraver la capacité des poissons à éviter et fuir des prédateurs. Chez une autre espèce, *O. mykiss*, l'exposition à un GBH durant le développement embryon-larvaire a provoqué une modification du comportement natatoire, avec une augmentation de la vitesse moyenne observée chez les truites soumises à une concentration de glyphosate de 0,1 mgL⁻¹ [WEEKS SANTOS et collab., 2019]. Aucun effet comparable n'a par contre été détecté par les auteurs à une concentration de 1 mgL⁻¹. L'exposition de juvéniles hybrides de deux espèces du genre *Pseudoplatystoma* a également entraîné une augmentation de l'activité de nage à des concentrations allant de 2.25 à 15 mgL⁻¹ de glyphosate au bout de 5 min d'exposition [SINHORIN et collab., 2014].

Certaines études ont démontré que la mémoire des poissons semble aussi pouvoir être perturbée par l'exposition au glyphosate, qu'il soit co-formulé ou non. Par exemple, l'exposition à 0,5 mgL⁻¹ d'un GBH aurait un effet sur la capacité de mémorisation des poissons adultes de l'espèce *D. rerio* [BRIDI et collab., 2017]. Chez la même espèce, l'exposition d'adultes à 15 µgL⁻¹ de substance active pure durant 24 h a altéré la réponse d'habituation des poissons face à un stimulus vibratoire [FARIA et collab., 2020].

Des modifications d'autres traits comportementaux peuvent également être observées lors d'exposition de poissons au glyphosate seul ou co-formulé. Des perturbations au niveau de la prise de nourriture chez des juvéniles de l'espèce *Piaractus mesopotamicus* exposés durant 15 jours à un GBH ont été rapportés [GIAQUINTO et collab., 2017]. À une concentration de 0.2 et 0,6 mgL⁻¹, la prise de nourriture a diminué au 13e jour puis est revenue à la normale au 15e; tandis qu'à 1,8 mgL⁻¹, la consommation alimentaire a été considérablement diminuée, sans un retour à la normale observé. Dans une autre étude, une modification du comportement sexuel de l'espèce *Jenynsia multidentata* a été notée (c.-à-d. une réduction du nombre et du succès des accouplements) suite à l'exposition de 7 ou 28 jours à un GBH à une dose de 0,5 mgL⁻¹ de substance active [HUED et collab., 2011].

1.8.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur le comportement des poissons

L'évaluation du comportement semble être un moyen efficace pour mettre en évidence des effets du glyphosate à faibles doses. Plusieurs études montrent que le glyphosate, qu'il soit seul ou co-formulé, semble être capable de modifier le comportement de nage et d'exploration des poissons adultes et juvéniles. Ces modifications, associées dans certains cas à de faibles doses de substance active, pourraient engendrer une vulnérabilité accrue des poissons face au prédateur, impactant ainsi leur valeur sélective et donc la pérennité des populations naturelles. Ces différentes modifications

comportementales, observées dans un contexte d'expositions aiguës comme chroniques, sont parfois plus prononcées lors d'expositions à de faibles doses de substance active, suggérant une courbe de réponse non monotone. Il serait intéressant que des études considèrent des concentrations de l'ordre du μgL^{-1} , pour lesquelles les données disponibles ne suggèrent pas systématiquement un impact sur le comportement. Même si des effets sont détectés à de faibles doses en comparaison des doses impactant certains paramètres comme la survie, il est peu probable que les poissons soient exposés durant de longues périodes à de telles concentrations dans l'environnement, notamment dans les zones où l'utilisation du glyphosate est fortement réglementée. Toutefois, dans le cas d'espèces particulièrement sensibles vivant dans des milieux aquatiques très exposés à cette substance active, des effets négatifs sur la santé des poissons sont à prévoir. Un faible nombre d'études est cependant disponible, et la comparaison de leurs résultats est rendue difficile par l'utilisation de dispositifs expérimentaux souvent assez différents. Une augmentation de la force de recherche concernant les effets comportementaux du glyphosate et leur modulation par les co-formulants est donc requise.

1.9 Impact sur les fonctions immuno-hématologiques

L'hématologie est souvent utilisée comme marqueur pour évaluer l'impact de différents stress, y compris l'exposition à des pesticides, sur la santé des poissons [BURGOS-ACEVES et collab., 2019]. Il a été démontré que certains paramètres immuno-hématologiques peuvent être perturbés par le glyphosate et/ou des GBHs [BADO-NILLES et collab., 2015; PEILLEX et PELLETIER, 2020], et que les contaminants chimiques ont la capacité de moduler des réponses immunitaires innées et acquises chez le poisson [EL-GENDY et collab., 1998; REHBERGER et collab., 2017; WANG et collab., 2020].

1.9.1 Effet du glyphosate seul et co-formulé

Un faible nombre d'études concernant l'immuno-hématotoxicité du glyphosate pur est disponible dans la littérature. À fortes doses, comprises entre 5.4 et 12,6 mgL^{-1} , MICAH [2016] ont observé une érythropénie ainsi qu'une leucocytose, une diminution du taux d'hémoglobine et d'autres modifications des paramètres érythrocytaires, reflétant une anémie induite par l'exposition chimique. À plus faible dose, lors d'une expérimentation utilisant des poissons de l'espèce *Platichthys flesus* exposés à 1 μgL^{-1} de substance active pure, MARCHAND et collab. [2006] ont montré une surexpression d'un gène lié à l'immunité (c.-à-d. Fucosectin 1) après 30 jours d'exposition, indiquant une potentielle activation du système immunitaire. Cette hypothèse tend à être confirmée par les résultats de WEBSTER et SANTOS [2015], dans le cadre d'une exposition de *Salmo trutta* durant 14 jours à des doses comprises entre 0.01 et 10 mgL^{-1} . En effet, les auteurs ont observé que l'expression de plusieurs gènes (p. ex. toll-like receptor tlr5b et tlr21; composés du système du complément itgax et c7; régulateurs des voies de signalisation de l'expression de cytokines telles que les interleukines il4r, il10r, il17r, les interférons irf7, ifit5, une protéine associée "mx2" et des chimiokines comme ccl5, ccr4) impliqués dans

l'immunité innée était dérégulée à la fois par la substance active pure et le GBH utilisé. Ces résultats vont dans le sens d'une stimulation de l'immunité innée, confirmant que le système immunitaire est une des cibles du glyphosate co-formulé ou non.

Lorsque l'exposition aiguë ou chronique au glyphosate co-formulé est considérée, des altérations hématologiques chez diverses espèces de poissons exposées à des concentrations de substance active allant de 0.1 à 72 mgL⁻¹ ont été mises en évidence [ERHUNMWUNSE, 2014; FÉLIX et SARADHAMANI, 2015; GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et collab., 2013; GLUSCZAK et collab., 2006; KONDERA et collab., 2018; KREUTZ et collab., 2011; MICAH, 2016; MODESTO et MARTINEZ, 2010a; ORUN et collab., 2013; SALBEGO et collab., 2010; SAMANTA et collab., 2018]. En revanche, la grande majorité de ces études a considéré des doses élevées de glyphosate, supérieures à 1 mgL⁻¹, qui ne sont pas ou très rarement retrouvées dans le milieu naturel. KONDERA et collab. [2018], chez *Cyprinus carpio*, ont observé une leucopénie après 7 jours de contamination à 0.1 et 5 mgL⁻¹, mais pas à une concentration intermédiaire. Le taux de globules rouges n'a pas été modifié par la contamination chimique, et le taux d'hémoglobine a subi une réduction uniquement à 0,5 mgL⁻¹. Chez l'espèce *Catla catla*, les paramètres hématologiques liés aux globules rouges (c.-à-d. numération cellulaire, taux d'hémoglobine et d'hématocrite) ont diminué lors d'une exposition aiguë à 0,46 mgL⁻¹ d'un GBH, tandis qu'une hyper-leucocytose a été observée [FÉLIX et SARADHAMANI, 2015]. Dans le cadre l'exposition aiguë de *Rhamdia quelen* à une dose de 0,73 mgL⁻¹ de substance active via un GBH, KREUTZ et collab. [2011] ont noté à la fois une érythropénie et une leucopénie, une diminution du taux de thrombocyte et une perturbation de la formule leucocytaire associée notamment à une diminution du taux de lymphocytes. La dose d'exposition aiguë de 5 mgL⁻¹ a engendré une modification de certains paramètres hématologiques (c.-à-d. taux de globules rouges et de globules blancs) chez *Prochilodus lineatus*, mais pas une dose cinq fois inférieure. À ces deux mêmes concentrations, une exposition chronique de *Leporinus obtusidens* a provoqué des effets sur le taux de globules rouges, mais pas sur celui de globules blancs [SALBEGO et collab., 2010]. Ceci indique que la sensibilité des individus peut fortement varier en fonction du paramètre étudié, de l'espèce et de la concentration.

Des études évaluant l'immunotoxicité du glyphosate co-formulé chez les poissons ont observé des effets :

1. au niveau de l'expression de certains gènes liés à l'immunité, comme ceux impliqués dans la production de cytokines par exemple; [LI et collab., 2019; MA et collab., 2015; RICHARD et collab., 2014; WEBSTER et SANTOS, 2015];
2. au niveau du système immunitaire [EL-GENDY et collab., 1998; KREUTZ et collab., 2011, 2010; LI et collab., 2019; MA et collab., 2015; MA et LI, 2015];
3. sur la résistance à des pathogènes [KELLY et collab., 2010; KREUTZ et collab., 2010].

EL-GENDY et collab. [1998] ont étudié les effets de concentrations en glyphosate comprises entre 0,002 et 16,9 mgL⁻¹, administrées via un GBH, chez *Tilapia nilotica*. Ils ont observé que la réponse immunitaire cellulaire était perturbée, même avec la plus faible concentration testée. L'altération du contenu en carbohydrates et en protéines du mucus présent à la surface de la peau des poissons, impliqués dans l'immunité innée, chez deux espèces, *Rhamdia quelen* et *Leporinus obtusidens*, exposées à 0,2 et 0,4 mgL⁻¹ de glyphosate pendant 96 h a été rapportée [LORO et collab., 2015]. Une diminution de l'efficacité de protection de cette couche muqueuse pourrait avoir un impact sur la capacité de défense des poissons face à des pathogènes. À très forte dose (c.-à-d. comprises entre 52 et 104 mgL⁻¹), l'exposition aiguë de *Cyprinus carpio* semble avoir un effet important sur l'expression et la concentration tissulaire (p. ex. foie, rein, rate) de différentes cytokines (p. ex. interleukines, interférons et facteurs de nécrose tumorale) [MA et LI, 2015].

Dans une étude d'exposition chronique, KELLY et collab. [2010] ont également montré une synergie entre l'exposition concomitante de *Galaxias anomalus* à un parasite (c.-à-d. *Telogaster opisthorchis*) et au glyphosate administré via un GBH à une concentration de 0,36 mgL⁻¹, avec l'observation d'une mortalité qui n'était pas induite avec le parasite ou l'exposition chimique seuls. Dans une autre étude, l'exposition aiguë de *Rhamdia quelen* à une dose de 0,73 mgL⁻¹ de glyphosate co-formulé avait induit une réduction de l'indice phagocytaire et du nombre de cellules présentes dans la cavité intracœlomique [KREUTZ et collab., 2010]. Ces observations ont pu être associées à une diminution de la survie lorsque les poissons ont reçu une injection intracœlomique de la bactérie *Aeromonas hydrophila*, en comparaison avec la survie observée lors de la même injection chez des poissons non exposés chimiquement.

1.9.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur les paramètres immuno-hématologiques des poissons

Un certain nombre d'études portant sur la toxicité du glyphosate seul ou co-formulé pointent du doigt la capacité de cet herbicide à modifier les paramètres hémato-immunologiques. Plusieurs de ces études montrent un impact du glyphosate à des concentrations relativement élevées, résultant probablement de perturbations de l'état physiologique global du fait d'un état de stress élevé plutôt que d'effets spécifiques qui pourraient refléter sa toxicité immuno-hématologique. Même si certaines études rapportent des effets à des doses faibles pouvant potentiellement être retrouvées dans l'environnement, la situation reste globalement peu claire. Il serait particulièrement intéressant de mesurer si les impacts induits par les contaminants à de bas niveaux d'organisation biologique (p. ex. paramètres sanguins ou expression de gènes) ont des effets sur la capacité de défense globale des poissons à un pathogène. De plus, afin de discriminer les effets toxiques du glyphosate seul de ceux induits lors d'expositions à des GBHs, il serait pertinent d'intégrer dans les dispositifs expérimentaux des expositions chimiques à la fois avec la substance active seule, mais aussi co-formulée.

1.10 Effets sur le métabolisme

L'effet des contaminants sur la physiologie des organismes, et plus précisément sur leur capacité à modifier l'allocation de l'énergie, a été peu étudié bien qu'il représente un élément majeur de la compréhension de leur écotoxicité [ASHAUER et JAGER, 2018]. La considération des effets des stressors environnementaux sous le prisme de la bioénergétique est reconnue comme étant une approche intégrative permettant une meilleure compréhension de leur impact sur les organismes dans le milieu naturel [SOKOLOVA, 2013]. Parmi les effets sublétaux connus du glyphosate, le métabolisme énergétique semble être une cible privilégiée, avec une contribution probablement assez élevée à la toxicité du glyphosate seul ou co-formulé [KENNEDY, 2017]. AMINOV et collab. [2013] ont montré que le glyphosate co-formulé possédait la capacité d'inhiber *in vitro* différentes glycosidases (c.-à-d. l'activité aminolitique de la maltase et de la sucrase) chez plusieurs espèces de poisson, à des doses comprises entre 0.1 et 50 μgL^{-1} de substance active. Les effets observés étaient dépendants de l'espèce de poisson, de l'enzyme et de la dose considérée.

1.10.1 Effet du glyphosate seul et co-formulé

Peu d'études considèrent l'immunotoxicité du glyphosate dans le cadre d'expositions à la substance active uniquement. Chez *Platichthys flesus*, le glyphosate sous sa forme pure à une concentration de 1 μgL^{-1} peut modifier l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme général (p. ex. apolipoprotéine AI, hémoglobine), mais aussi, plus spécifiquement, dans le métabolisme énergétique (p. ex. nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase, cytochrome c oxydase, adénosine triphosphate synthase), après 30 jours d'exposition [MARCHAND et collab., 2006]. Un résultat similaire a également été observé lors de l'exposition de *Salmo trutta* durant 14 jours à des doses comprises entre 0.01 et 10 mgL^{-1} de glyphosate pur ou par l'intermédiaire d'un GBH. En effet, une surexpression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ainsi que dans d'autres processus métaboliques comme des transporteurs de riboflavine (slc52a3 and rft2), un facteur de transcription responsable de la régulation de la biosynthèse du cholestérol (sreb2) ou encore des transporteurs associés à la membrane (slc43, slc3a2, slc6a16) a été mesurée [WEBSTER et SANTOS, 2015]. De plus, le glyphosate à la plus faible concentration a eu un effet perturbateur sur la transcription plus important que la plus forte concentration utilisée. Quoiqu'il en soit, ces observations sont révélatrices d'un potentiel de la substance active, co-formulée ou non, à perturber le métabolisme et à entraîner une réorganisation de ce dernier, même lors d'exposition à de faibles doses.

De nombreuses études menées avec du glyphosate co-formulé, à des concentrations comprises entre 26,5 μgL^{-1} et 298 mgL^{-1} , ont mis en évidence un impact de ce dernier au niveau de différents marqueurs biochimiques du métabolisme [AYANDA et collab., 2015; DO CARMO LANGIANO et MARTINEZ, 2008; DEY et collab., 2016; GHOLAMI-SEYEDKOLAEI et collab., 2013; GLUSCZAK et collab., 2011, 2006, 2007; LI et collab., 2017, 2016; LORO et collab., 2015; LUSHCHAK et collab., 2009; SALBEGO et collab., 2010], de la cellule [KONDERA et collab., 2018; MENÉNDEZ-HELMAN et collab., 2015; ROCHA et collab., 2015] ainsi que de l'organisme entier [SAMANTA et collab., 2018; SOSO et collab., 2007]. Il est

possible que ces modifications perturbent la performance de l'organisme, comme le suggèrent les résultats de TOPAL et collab. [2015] chez la *O. mykiss* soumise à des concentrations comprises entre 2.5 et 10 mgL⁻¹. En effet, à ces concentrations en substance active, les auteurs ont observé que la vitesse critique de nage chez cette espèce avait été réduite par l'exposition aiguë ou chronique à un GBHs. Selon eux, ce type de modifications physiologiques représenterait un bon indicateur de perturbations au niveau du métabolisme énergétique.

À de plus faibles concentrations (c.-à-d. entre 26.5 et 106 µgL⁻¹) et lors d'une exposition chronique de 8 semaines de *Clarias gariepinus*, le glyphosate co-formulé a engendré une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) pouvant refléter un accroissement du métabolisme anaérobie [AYANDA et collab., 2015]. Une augmentation de la phosphatase alcaline à partir de 53 µgL⁻¹ a également été notée. D'autres travaux de recherches ont rapporté une modification du taux de certains métabolites dans le foie et le muscle après une exposition aiguë de *Carassius auratus* à des concentrations en glyphosate de 0.2 et 0,4 mgL⁻¹, indiquant une possible perturbation du métabolisme énergétique [GLUSCZAK et collab., 2007]. Ces effets du glyphosate co-formulé ne sont pas systématiquement retrouvés en fonction de l'espèce et de la dose considérées. VON OSTEN et collab. [2005] n'ont par exemple montré aucune modification de l'activité de la LDH dans le muscle après une contamination aiguë de *Gambusia yucatana* à des concentrations de glyphosate comprises entre 9.4 et 150 mgL⁻¹.

Le glyphosate co-formulé ou certains co-formulants semblent aussi avoir un pouvoir perturbateur sur la physiologie mitochondriale. L'exposition à des GBHs a induit des dysfonctionnements sur des mitochondries isolées [PEIXOTO, 2005] (N.-B. dans cette étude, la substance active ne présentait aucun effet sur la mitochondrie), des cellules *in vitro* [LUO et collab., 2017] et des poissons [PEREIRA et collab., 2018]. Parmi ces études, les expérimentations *in vitro* relatent des effets au niveau de la membrane mitochondriale ainsi que des complexes II et III de la chaîne de transport d'électrons. L'étude réalisée sur des cerveaux de *D. rerio* exposés chroniquement *in vivo* à un GBH à de faibles concentrations (65 µgL⁻¹ de substance active) a confirmé que le glyphosate co-formulé affectait bien la membrane mitochondriale, mais avec un impact sur les complexes I et IV de la chaîne de transport d'électrons (le complexe III n'a pas été testé dans cette étude) [PEREIRA et collab., 2018]. Les effets les plus forts étaient dans certains cas retrouvés pour la plus faible concentration alors qu'aucun effet n'était observé lors de l'exposition des poissons à 10 mgL⁻¹. L'hypothèse émise est que l'inhibition du complexe I pourrait être à l'origine de l'augmentation de la production de ROS, augmentation observée chez les poissons contaminés chimiquement.

1.10.2 Conclusions sur les effets du glyphosate sur le métabolisme des poissons

Le métabolisme, et plus particulièrement le métabolisme énergétique, semble être affecté par de faibles concentrations de glyphosate seul ou co-formulé. Toutefois, les études qui démontrent un impact sur le métabolisme de l'exposition à des doses présentant une pertinence environnementale observent généralement des effets uniquement au niveau cellulaire ou à des niveaux d'organisations inférieurs. De plus, une majorité d'études se concentrent sur les produits co-formulés. Il est donc né-

cessaire que des investigations *in vivo* soient réalisées pour comparer l'effet du glyphosate pur et co-formulé à de faibles doses de substance active, mais aussi pour mettre en relation les effets toxiques observés avec des impacts au niveau de l'organisme (p. ex. performance de nage, croissance). Ces indications permettraient une meilleure caractérisation du risque, lié à un éventuel impact métabolique, concernant les poissons dans les populations naturelles ou les élevages.

1.11 Impact sur le stress oxydant

Du stress oxydant peut être généré par certains pesticides, dont le glyphosate, qui peuvent interférer, chez le poisson, avec les éléments de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant et induire une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des changements au niveau des composés antioxydants ainsi que des dommages cellulaires (p. ex. peroxydation des lipides, LPO, ou la carbonatation des protéines ainsi que l'oxydation de l'ADN) [LUSHCHAK et collab., 2001; SLANINOVA et collab., 2009]. Si le niveau de ROS s'élève en raison de l'exposition à une contamination chimique, le système antioxydant peut être activé pour permettre le retour à un niveau basal. Cependant, si un niveau de ROS légèrement augmenté persiste dans les cellules, cela peut conduire, dans certains cas, à l'apparition de pathologies principalement liées à une inflammation chronique [LUSHCHAK, 2015].

1.11.1 Effet du glyphosate seul et co-formulé

Peu d'études considèrent l'impact d'une exposition à la substance active seule sur la génération du stress oxydant chez les poissons. Toutefois, SOBJAK et collab. [2017] ont rapporté que l'exposition, durant le développement précoce, de *Rhamdia quelen* à une concentration de 6,5 mgL⁻¹ pouvait perturber certaines enzymes du système antioxydant comme la glutathion-transférase (GST) et la glutathion réductase (GR), tandis qu'aucune modification de la catalase n'était détectée. Une augmentation de la peroxydation lipidique a aussi été mise en évidence après 48 heures de contamination chimique.

Certaines études montrent que les GBHs sont capables de modifier les niveaux de ROS [SÁNCHEZ et collab., 2017], de perturber certains paramètres biochimiques liés au maintien de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant [AYANDA, 2018; BRAZ-MOTA et collab., 2015; DO CARMO LANGIANO et MARTINEZ, 2008; DEY et collab., 2016; FERREIRA et collab., 2010; GLUSCZAK et collab., 2011; GUILHERME et collab., 2012a; JIN et collab., 2018; LUSHCHAK et collab., 2009; MENEZES et collab., 2010; MODESTO et MARTINEZ, 2010a,b; DE MOURA et collab., 2017; NWANI et collab., 2013; PERSCH et collab., 2017; SINHORIN et collab., 2014; TOPAL et collab., 2015; UJOWUNDU et collab., 2017], mais engendrent également des dommages en relation avec le stress oxydatif [AYANDA, 2018; BRAZ-MOTA et collab., 2015; DEY et collab., 2016; GLUSCZAK et collab., 2007; GUILHERME et collab., 2012a, 2010; LI et collab., 2019; MENEZES et collab., 2010; MODESTO et MARTINEZ, 2010a,b; DE MOURA et collab., 2017; NWANI et collab., 2013; SÁNCHEZ et collab., 2017; SINHORIN et collab., 2014; UJOWUNDU et collab., 2017]. À de faibles concentrations d'un GBH comprises entre 2 et 8,5 µgL⁻¹, LANZARIN et collab. [2019] n'ont vu

aucun effet de la contamination aiguë d'embryons de *D. rerio* sur la production de ROS, l'activité d'enzymes antioxydantes (c.-à-d. Superoxyde dismutase, SOD; Catalase, CAT; GST), le niveau de glutathion ainsi que la peroxydation lipidique. En revanche, une augmentation de l'activité de la CAT a été observée lors de l'exposition de juvéniles de *Rhamdia quelen* à un GBH à partir de 36 et jusqu'à 144 μgL^{-1} (mais pas à 18 μgL^{-1}) [PERSCH et collab., 2017]. Aucune augmentation de la LPO n'a par contre été constatée. Lors d'une exposition de *Clarias gariepinus* à des concentrations de glyphosate co-formulé comprises entre 26.5 et 106 μgL^{-1} durant 8 semaines, tous les paramètres liés au stress oxydant ont été augmentés : activités enzymatiques de la SOD, de la CAT et de la glutathion peroxydase (GPx) ainsi que LPO [AYANDA, 2018].

Dans une autre étude, GUILHERME et collab. [2012a] ont observé peu de réponse du système antioxydant lors d'une exposition à un GBH de *Anguilla anguilla* à des doses de 58 et 116 μgL^{-1} de substance active. Seuls quelques changements dans l'activité de certaines enzymes (p. ex. SOD et CAT) après 96 h d'exposition indiquaient la génération d'un stress oxydant qui, dans le cas de la plus forte concentration, était probablement associée aux dommages à l'ADN observés. Dans une autre étude, l'exposition aiguë à un GBH des adultes de l'espèce *Poecilia vivipara* aux doses de 0.13 et 0,7 μgL^{-1} n'avait pas non plus perturbé le système antioxydant [CA et collab., 2013]. Par contre, GLUSZAK et collab. [2007], lors d'une exposition aiguë à un GBH de *Rhamdia quelen* juvéniles à des concentrations en glyphosate de 0.2 et 0,4 mgL^{-1} , ont détecté une augmentation de la LPO dans le muscle, avec cependant aucune modification du niveau d'activité de la CAT. Dans une autre étude chez la même espèce, une exposition pendant 8 jours à un GBH, à des doses de 0.45 et 0,95 mgL^{-1} de substance active, a généré une diminution de l'activité de la GST et une augmentation de la LPO ainsi que de la carbonylation des protéines. Aucun effet n'a cependant été détecté sur la CAT et la SOD. Dans leurs travaux de recherches, JIN et collab. [2018] ont montré que le glyphosate à une concentration d'environ 0,71 mgL^{-1} pouvait réduire, lors d'une exposition aiguë de *Hypomesus transpacificu* adultes, le niveau de glutathion, composant majeur des mécanismes antioxydants non enzymatiques. Par contre, aucun effet n'a été observé à des concentrations inférieures de substance active (c.-à-d. 78 μgL^{-1}). À plus fortes concentrations, TOPAL et collab. [2015] ont démontré qu'une contamination de *O. mykiss* juvéniles engendrait des effets différents sur le système antioxydant selon que la contamination était aiguë ou chronique, et ce avec les mêmes quantités de GBH administrées. La GPx, la CAT et la SOD étaient impactées par des concentrations de 2.5 et 5 μgL^{-1} en exposition aiguë, tandis qu'une exposition chronique de 21 jours n'induisait qu'un effet sur la GPx à la plus forte concentration.

1.11.2 Conclusions sur la capacité du glyphosate à engendrer du stress oxydant

De manière globale, les études disponibles dans la littérature suggèrent que le glyphosate, particulièrement quand il est co-formulé et aussi bien lors d'expositions aiguës que chroniques à des concentrations allant de 26,5 μgL^{-1} à 540 mgL^{-1} , affecte les éléments de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant. Tous les éléments permettant le maintien de l'équilibre red/ox ne sont pas systématiquement perturbés, et les effets observés dépendent probablement de la combinaison de différents paramètres

biotiques et abiotiques comme la dose, la durée d'exposition, l'espèce, le stade de vie ainsi que l'organe considéré. Cette observation est aussi vraie pour des concentrations de glyphosate supérieures à 1 mgL^{-1} . Il est connu que les paramètres de la défense antioxydante peuvent varier avec différents stress biotiques et abiotiques [MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et collab., 2005], et il est donc possible que les effets toxiques observés par certains auteurs ne soient pas réellement spécifiques de la toxicité au glyphosate. Les réponses de certains marqueurs, tantôt augmentés, tantôt diminués, par rapport aux contrôles, dépendamment du temps d'exposition, tendent à apporter des preuves en faveur de cette hypothèse. Toutefois, et particulièrement dans le cas de l'étude des GBHs, il apparaît évident que le glyphosate co-formulé présente la capacité de perturber les éléments régissant l'équilibre red/ox. Il est important de noter que ces perturbations ne sont pas systématiquement associées à des dommages cellulaires, même si ces dommages sont rapportés dans plusieurs études. L'inverse est aussi vrai, car des dommages cellulaires sont parfois observés sans effets détectés sur le système antioxydant. Notons que l'évaluation de ces dommages n'est pas toujours extrêmement fiable [MARROCCO et collab., 2017]. Certains auteurs remettent en question, par exemple, l'évaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), car ce dernier présenterait notamment une faible spécificité vis-à-vis du malondialdéhyde (MDA, marqueur de faible stabilité de l'oxydation des lipides) [ANSARIN et collab., 2017]. Il reste néanmoins fortement probable que le glyphosate co-formulé puisse entraîner, en association avec une réponse du système antioxydant, des dommages cellulaires à fortes concentrations (c.-à-d. des doses ayant un même ordre de magnitude que la DL_{50} correspondant à l'espèce étudiée). À des doses proches de celles rencontrées dans l'environnement, des effets suggérant un impact du glyphosate sont rapportés. Des études complémentaires seraient cependant nécessaires pour tirer des conclusions fiables quant à l'implication du stress oxydant dans le mode d'action toxique du glyphosate à faibles doses lors d'expositions sous sa forme pure ou associé à différents co-formulants. Enfin, des études plus approfondies du lien entre le maintien de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant et la toxicité à de plus hauts niveaux d'organisation biologique (p. ex. performance de nage, comportement de fuite ou reproducteur) seraient aussi intéressantes. En effet, différentes études de la littérature observent de tels effets sans toutefois détecter systématiquement une induction du stress oxydant. Soit, ces effets en sont donc indépendant soit les marqueurs utilisés sont inadéquats pour détecter les dommages oxydatifs ou les prélèvements sont réalisés dans une mauvaise fenêtre temporelle.

1.12 Effets sur certaines enzymes spécifiques

Comme décrit précédemment, l'activité herbicide du glyphosate est associée à une inhibition, chez les espèces cibles, de l'enzyme EPSPS. Cette action se fait grâce à l'interaction du glyphosate avec le site de liaison d'un des substrats de l'enzyme [SCHONBRUNN et collab., 2001]. La dose de glyphosate qui inhibe 50% de l'activité de l'enzyme EPSPS pure (IC_{50}) *in vitro* est d'environ $3,4 \text{ mgL}^{-1}$, tandis qu'une dose de $4,7 \text{ gL}^{-1}$ inhibe 50% de la croissance cellulaire de cellules végétales *in vitro* [RUBIN et collab., 1984]. Certains chercheurs ont néanmoins démontré que le glyphosate ne présentait pas une spécificité complète pour la EPSPS, mais avait aussi la capacité d'inhiber des enzymes

présentes chez les animaux [EL-DEMERDASH et collab., 2001; L NC et collab., 2013], comme l'acétylcholinestérase (AChE), la LDH, l'aspartate amino-transférase (AST), l'alanine aminotransférase (ALT) et la phosphatase alcaline (ALP). Toutefois, même dans les cas où une inhibition était détectée, les valeurs d'IC₅₀ rapportées par les auteurs restent très élevées comparées aux concentrations retrouvées dans l'environnement (IC₅₀ comprises entre 12,1 et 120,7 gL⁻¹).

1.12.1 Acétylcholinestérase

L'AChE (EC 3.1.1.7) est fréquemment retrouvée comme biomarqueur lors d'expositions de poissons aux organophosphates [PAYNE et collab., 1996]. L'engouement pour ce biomarqueur a été particulièrement important dans le cadre des études sur l'écotoxicité du glyphosate, composé qui est pourtant un organophosphoré mais qui possède tout de même une capacité, toutefois bien plus restreinte que les organophosphates, d'inhibition de l'AChE [LARSEN et collab., 2016]. Cette capacité d'action des organophosphates est associée à la liaison de type C – O – P spécifiquement impliquée dans l'inhibition de l'AChE [ALDRIDGE, 1971]. Le glyphosate possède quant à lui une liaison C – P, cette différence est probablement liée à la capacité restreinte d'inhibition du glyphosate vis-à-vis de l'AChE.

Chez les poissons, les études montrent que le glyphosate est capable d'inhiber *in vivo* l'AChE quand il est administré sous forme pure ou avec des co-formulants à des concentrations comprises entre 1 et 30 mgL⁻¹ [MENÉNDEZ-HELMAN et collab., 2011] et entre 0,2 et 20 mgL⁻¹ respectivement [CATTANEO et collab., 2011; GLUSCZAK et collab., 2006, 2007; MODESTO et MARTINEZ, 2010a]. Même si la grande majorité des études portent sur des expositions aiguës, des perturbations de l'AChE ont aussi été détectées lors d'expositions chroniques [DEY et collab., 2016], mais avec des effets (inhibition, activation) qui sont fonction de l'espèce de poisson et de l'organe considéré. Des mécanismes de réponse au stress liés à l'inhibition de cette enzyme sont suspectés et pourraient être à l'origine d'une activation compensatrice, particulièrement lors d'expositions sur le long terme avec des phases de récupération [CATTANEO et collab., 2011]. D'autre part, certains auteurs suggèrent que la capacité d'inhibition de l'AChE par le glyphosate fait partie intégrante de son MoA toxique chez les espèces non-cibles. En effet, cette inhibition pourrait entraîner une hyperactivité musculaire générant une production de ROS qui, à leur tour, induiraient des dommages oxydatifs comme la peroxydation des lipides [CATTANEO et collab., 2011; MODESTO et MARTINEZ, 2010a].

L'inhibition de l'AChE n'est cependant pas systématiquement observée lors d'expositions au glyphosate, comme l'ont démontré JIN et collab. [2018] lors d'une exposition aiguë d'adultes de l'espèce *Hypomesus transpacificus* à une dose comprise entre 0,078 et 896 mgL⁻¹ d'un GBH. Il est donc possible que l'effet du glyphosate sur l'AChE soit dépendant de plusieurs paramètres comme l'espèce ou le stade de vie du poisson. De plus, lorsqu'une inhibition de l'AChE est mesurée dans le cas d'une exposition à un GBH, elle peut-être théoriquement associée à des effets directs ou indirects : 1. du glyphosate seul; 2. du glyphosate en association avec un ou plusieurs co-formulants; ou 3. d'un ou

plusieurs des co-formulants. En effet, l'inhibition de l'AChE peut être induite par d'autres composés que les organophosphates ou le glyphosate [EL-DEMERDASH et collab., 2001]. Elle peut également résulter de mécanismes indirects liés à l'activité globale des poissons [PAYNE et collab., 1996].

1.12.2 Anhydrase carbonique

L'anhydrase carbonique (CA; EC 4.2.1.1) est une enzyme catalysant une réaction physiologique d'importance majeure (c.-à-d. l'hydratation de CO₂ pour donner H⁺ et HCO³⁻) qui est retrouvée, sous différentes isoformes, de façon ubiquiste dans la nature. Plusieurs études écotoxicologiques ont utilisé l'activité de cette enzyme comme biomarqueur de la contamination à divers composés chimiques [DİNÇER et collab., 2015; VITALE et collab., 1999], dont les pesticides [CEYHUN et collab., 2010; MELA et collab., 2013; L NC et collab., 2013; SULUKAN et collab., 2017]. LIONETTO et collab. [2012] ont discuté le potentiel biomarqueur de cette enzyme pour le suivi de l'impact des polluants environnementaux sur les organismes vivants. Selon eux, la CA constitue un biomarqueur quantitatif pertinent présentant une réponse dose dépendante face à différents polluants. De plus, de par son implication dans plusieurs processus physiologiques clefs, l'inhibition de son activité par différents polluants se répercute très probablement sur la physiologie de l'organisme. Le glyphosate peut inhiber la CA *in vitro* avec une IC₅₀ égale à 26,2 µg L⁻¹ [L NC et collab., 2013]. SULUKAN et collab. [2017] ont observé une inhibition significative de la CA chez des larves de *D. rerio* soumises à des concentrations allant de 1 et jusqu'à 100 mg L⁻¹ de glyphosate co-formulé. Les auteurs concluent que cette inhibition est responsable d'une acidose respiratoire entraînant différents effets toxiques comme l'apoptose cellulaire ou des malformations larvaires.

1.12.3 Conclusions sur les effets du glyphosate sur certaines enzymes spécifiques

Le glyphosate semble avoir un potentiel d'inhibition relativement modéré sur d'autres enzymes que l'EPSPS, à l'exception de l'anhydrase carbonique. Toutefois, plusieurs études ont rapporté que le glyphosate seul et co-formulé pouvait inhiber l'acétylcholinestérase chez les poissons, avec un impact potentiel sur la physiologie générale de ces derniers. L'inhibition de cette enzyme aux doses retrouvées dans l'environnement dans les zones où l'utilisation du glyphosate est réglementairement contrôlée, comme en Europe, n'a pas encore été mise en évidence et doit probablement être limitée compte tenu des données actuellement disponibles. Certains effets spécifiques sur des espèces sensibles et dans des zones particulièrement impactées par le glyphosate ne sont néanmoins pas à exclure. Étant donné que les effets à long terme du glyphosate sur cette enzyme ne sont pas encore bien connus, des investigations sont nécessaires pour tenter de comprendre les mécanismes de compensation pouvant être mis en jeu chez les poissons pour pallier à sa possible inhibition lors d'expositions chroniques. Le glyphosate semblant présenter une forte capacité d'inhibition de la CA *in vitro*, qui pourrait éventuellement se répercuter sur la physiologie globale des poissons, il apparaît primordial de mener en complément des études d'expositions chroniques à faibles doses pour déterminer si cet effet est lié à un mécanisme direct (p. ex. inhibition non compétitive) ou à des mécanismes indirects qui résulteraient, par exemple, d'une perturbation globale du métabolisme des poissons.

1.13 Mode d'action du glyphosate seul ou associé à des co-formulants

L'enzyme responsable du mode d'action (MoA) du glyphosate chez les plantes n'étant pas présente chez les animaux, un ou plusieurs MoAs toxiques doivent exister chez ces derniers. À l'heure actuelle, aucun consensus n'existe quant au(x) MoA(s) toxique(s) du glyphosate chez les espèces non ciblées. Plusieurs hypothèses ont été formulées dans la littérature et il est possible que plusieurs mécanismes co-existent (cf. revue de ANNETT et collab. [2014]). Aucune étude n'a démontré que la durée d'exposition influence les MoAs du glyphosate, même si cette hypothèse n'est toujours pas infirmée. Selon les doses d'expositions étudiées, les mêmes mécanismes de toxicité sont globalement retrouvés, tels que l'inhibition de certaines enzymes ou la génération de stress oxydatifs. Il est toutefois possible que cette observation soit liée à plusieurs biais :

- conceptuels, les auteurs étudiant de faibles doses utilisent bien souvent les mêmes marqueurs que ceux qui ont mis en évidence des effets à plus fortes doses ;
- techniques, lors d'études sans *a priori* avec des approches de type transcriptomique, protéomique ou métabolomique, de nombreux processus physiologiques sont mis en évidence, mais il reste cependant difficile de les cibler et de les étudier plus en profondeur afin de les relier avec une pertinence biologique permettant d'identifier de nouveaux MoAs.

Plusieurs auteurs ont cependant évoqué que certaines réponses non monotones au glyphosate, notamment liées à une modification de paramètres hormonaux, pourraient être à l'origine de sa capacité à agir comme perturbateur endocrinien [MYERS et collab., 2016; SMITH et collab., 2019; VANDENBERG et collab., 2017]. Une hypothèse à ce niveau serait que le glyphosate agirait par mimétisme de structures chimiques [PEILLEX et PELLETIER, 2020]. Celle-ci n'a toutefois pas été confirmée et la démontrer *in vivo* demanderait des études établissant des protocoles très robustes où les effets d'autres facteurs biotiques et abiotiques seraient drastiquement contrôlés afin de mettre en évidence des effets de la substance à long terme avec des doses relativement faibles. Un grand nombre de répétitions serait également nécessaire afin de confirmer que les variations inhérentes à tous dispositifs expérimentaux ne soient pas à l'origine des éventuelles différences observées entre les conditions d'expositions chimiques. Il est également possible que les co-formulants venant potentiellement moduler l'action du glyphosate dans les organismes animaux entraînent l'apparition d'autres MoAs. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant que les futures études sur le(s) MoA(s) du glyphosate intègrent dans leur conception ou leur plan expérimental à la fois des contaminations à la substance active et aux GBHs. Pour affirmer que le MoA d'un GBH est attribué au moins en partie à la substance active, il faudrait tester individuellement la toxicité de chacun des co-formulants, ce qui se révèle extrêmement difficile.

Les pistes les plus probantes concernant les MoAs du glyphosate à l'heure actuelle sont : 1. L'inhibition de l'ACHé, qui entraînerait une potentielle accumulation du neurotransmetteur acétylcholine, induisant à son tour d'autres effets dans l'organisme. 2. L'inhibition de la CA, qui provoquerait une réduction de la capacité de transport du CO₂ et, par voie de conséquence, une acidification de l'organisme liée à son accumulation. Cette voie a toutefois été beaucoup moins explorée que la précédente.

3. La génération d'un stress oxydant, qui résulte probablement d'une propriété du glyphosate à affecter un ou plusieurs mécanismes, entraînant une augmentation de la production de composés pro-oxydants et une diminution de la capacité du système antioxydant à prendre en charge ces composés.

4. Une perturbation du métabolisme énergétique, souvent observée et qui pourrait résulter de l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans des voies métaboliques ainsi que d'une perturbation du métabolisme mitochondrial via l'interférence avec des éléments de la chaîne de transport d'électrons.

5. Une modification du microbiote intestinal, crucial pour le processus de digestion [PEILLEX et PELLETIER, 2020]. La figure 1.3 résume ces différentes hypothèses et montre les interactions potentielles entre les acteurs biologiques possiblement impactés. De manière générale, il est possible que le glyphosate seul ou co-formulé agisse sur plusieurs cibles cellulaires, induisant une perturbation de différents mécanismes physiologiques spécifiques ainsi qu'une production de ROS qui vont avoir un effet toxique sur un nombre plus important de fonctions générales. Certains mécanismes, comme la production de ROS, peuvent influencer les mécanismes dont ils sont à l'origine. Ces phénomènes de rétroaction peuvent potentiellement aggraver les effets toxiques de la contamination chimique au niveau de la cellule.

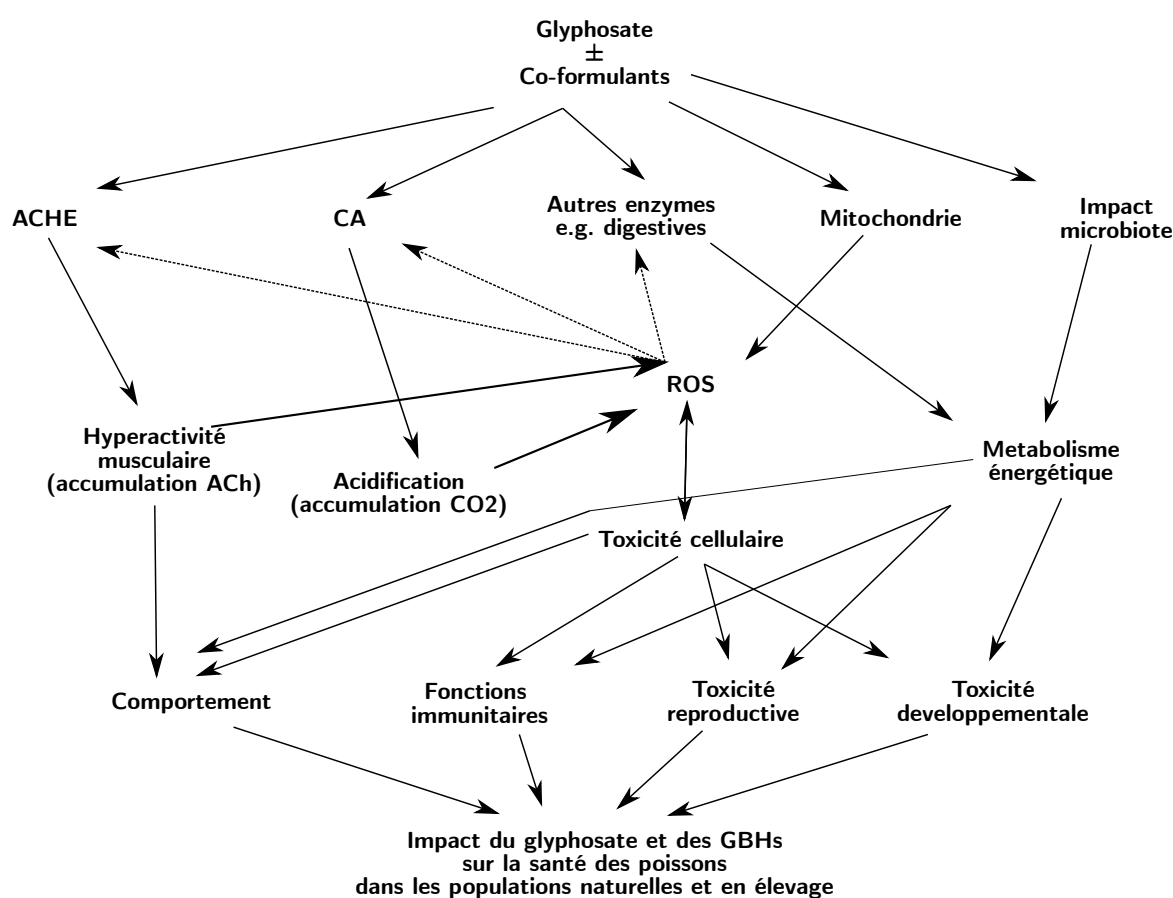


FIGURE 1.3 – Diagramme conceptuel représentant une vue non exhaustive des différentes hypothèses existantes quant au mode d'action toxique du glyphosate chez les poissons. Les flèches en pointillés représentent des phénomènes de rétroaction potentiels.

1.14 Effet du mode de transmission sur la toxicité liée au glyphosate et aux GBHs

En plus des effets observés chez les organismes directement exposés dans leur environnement aux contaminants chimiques, une toxicité peut également être induite au travers des générations. Différents modes de transmission de la toxicité à la descendance existent : intergénérationnel, transgénérationnel, et multigénérationnel. Pour avoir un effet sur les générations futures, les stressseurs environnementaux doivent tout d'abord présenter une toxicité au niveau des cellules germinales [HANSON et SKINNER, 2016], en agissant sur les gènes ou certains mécanismes non génétiques (c.-à-d. réserves nutritives fournies à l'embryon, hormones et protéines, modifications épigénétiques) [MUNDAY, 2014]. Une toxicité intergénérationnelle est définie comme étant transmise à la génération F1 par la génération de parents F0 [STENZ et collab., 2018]. Ce mode de transmission se différencie du mode transgénérationnel par le fait que la génération F1 a été directement exposée au stade de cellules germinales dans l'organisme des parents [STENZ et collab., 2018]. Une toxicité transgénérationnelle est une toxicité transmise via des cellules germinales qui n'ont subi aucune exposition directe au contaminant [HANSON et SKINNER, 2016]. À l'inverse des mammifères, chez qui des effets transgénérationnels peuvent être observés uniquement à partir de la génération F3 (car les cellules germinales de la F1 sont exposées directement si la contamination a lieu pendant la gestation) [SKINNER, 2008], ces mêmes effets peuvent être détectés chez les poissons à partir de la génération F2, car la fécondation est externe [BLANC et collab., 2020]. Pour résumer, quand seule la génération F0 est contaminée directement au niveau de l'organisme entier, la génération F1 est dite contaminée intergénérationnellement tandis que la génération F2 est dite contaminée transgénérationnellement (Figure 1.4) [BEST et collab., 2018]. Enfin, une toxicité multigénérationnelle est définie comme une toxicité provenant à la fois de l'exposition des générations antérieures et d'une exposition directe de la génération considérée après la naissance [HANSON et SKINNER, 2016]. L'ensemble des générations considérées sont donc exposées directement.



FIGURE 1.4 – Schéma expliquant le mode d'exposition en fonction de la génération considérée dans le cas où seule la génération F0 subit une contamination directe au niveau de l'organisme entier.

Les mécanismes épigénétiques sont des mécanismes modifiant de manière réversible, transmissible et adaptative l'expression des gènes sans en changer la séquence nucléotidique. En partie responsables des phénotypes observés chez les poissons, ils peuvent être définis comme étant les facteurs qui régulent de manière héréditaire l'expression spatio-temporelle du génome, expression dont dépend l'apparition de phénotypes physiologiques particuliers (d'après BEST et collab. [2018]). Trois principaux mécanismes sont impliqués dans la régulation de cette expression : 1. la modification

des histones, principaux constituants protéiques des chromosomes qui permettent la compaction de l'ADN; 2. la méthylation de l'ADN, addition d'un groupement méthyle à certaines bases nucléotidiques; et 3. les microARNs (miARNs), petits ARNs non codants jouant le rôle de régulateurs post-transcriptionnels. Les deux premiers mécanismes contrôlent la structure de la chromatine tandis que le troisième module la translation des ARNs après leur transcription [BEST et collab., 2018]. Si les mécanismes épigénétiques sont reconnus pour moduler l'adaptation des animaux à leur environnement, leurs rôles dans la transmission de la toxicité aux générations futures restent à éclaircir [CHATTERJEE et collab., 2018].

Différentes études montrent une génotoxicité induite par l'exposition au glyphosate chez le poisson, pour des concentrations comprises entre 0.018 et 118 mgL⁻¹ lors d'exposition à la substance active seule [ALVAREZ-MOYA et collab., 2014; GUILHERME et collab., 2012b] et entre 0.058 et 10 mgL⁻¹ lors d'exposition à des GBHs [CAVALCANTE et collab., 2008; GUILHERME et collab., 2012a; MORENO et collab., 2014]. À des concentrations largement supérieures (5 et 10 mgL⁻¹) à celles retrouvées dans l'environnement, LOPES et collab. [2014] ont détecté une génotoxicité dans des cellules de sperme de l'espèce *D. rerio*. Celle-ci était associée à la réduction de la mobilité et de la période de mobilité du sperme chez les poissons exposés. En complément d'un impact direct sur les performances reproductives des géniteurs, cet effet du glyphosate semble ainsi pouvoir être transmis à la descendance via cette dégradation du matériel génétique. Les contaminants environnementaux sont connus pour pouvoir induire des mutations au niveau des cellules germinales, pouvant ainsi être transmises aux générations futures et impacter certaines fonctions physiologiques affectant alors le succès reproducteur des poissons [BICKHAM et collab., 2000]. Le glyphosate, même si sa capacité à induire des mutations génétiques *in vivo* à faible dose reste à confirmer, pourrait ainsi participer à la modification du succès reproducteur des poissons dans le milieu naturel. Toutefois, les mutations étant des phénomènes rares et aléatoires, elles auront tendance à perturber les populations naturelles sur le long terme. Il apparaît donc évident que la majorité des modifications observées à court et moyen termes sont plutôt dues à des mécanismes non génétiques de transmission de la toxicité.

Ce type de mécanismes non génétiques a été relié à l'adaptation des poissons à différents stress environnementaux au travers des générations [MUNDAY, 2014]. Dans l'étude de BLANC et collab. [2020], une exposition directe à une dose de 1 µgL⁻¹ de perméthrine a induit un impact non monotone (c.-à-d. diminution de la fertilité à faible dose uniquement) chez une génération F0 de *D. rerio*, générant des effets sur le comportement des générations F1 (c.-à-d. effets intergénérationnels) et F2 (c.-à-d. effets transgénérationnels). L'exposition de la génération F0 n'ayant duré que 4 jours au moment du développement précoce des poissons, aucun effet sur le comportement n'a été observé tandis que la mobilité des larves des générations F1 et F2 a été diminuée. Ces effets seraient potentiellement dûs à d'éventuelles propriétés de perturbation endocrinienne du contaminant ou à sa capacité à induire des mutations épigénétiques au niveau des cellules germinales des poissons adultes.

L'exposition d'une génération F0 de poissons de l'espèce *Menidia beryllina* à des concentrations environnementales de différents composés perturbateurs endocriniens (bifenthrine, lévonorgestrel, éthinyloestradiol) a provoqué une modification de la méthylation de gènes, avec de possibles consé-

quences phénotypiques [MAJOR et collab., 2020]. Une dérégulation épigénétique des générations F1 et F2 soumises, respectivement, à des expositions intergénérationnelles et transgénérationnelles a également été observée.

KAMSTRA et collab. [2017] ont montré que différents contaminants, le mono(2-ethylhexyl) phtalate et le 5-azacytidine, pouvaient modifier la méthylation de l'ADN de certaines zones spécifiques du génome de *D. rerio* au travers de trois générations alors que seule la première était contaminée directement lors du développement embryonnaire. Les auteurs évoquent un mécanisme transgénérationnel de transmission de la toxicité qui, dans le cas du 5-azacytidine, a également engendré des modifications phénotypiques observées jusqu'à la génération F2.

Dans le cas du glyphosate, une exposition durant l'embryogenèse d'une génération F1 à une dose de 10 mgL^{-1} de substance active seule ou administrée via un GBH a entraîné l'accroissement de la mortalité des embryons de *D. rerio* et une éclosion prématurée. Ceci n'a cependant été observé uniquement dans le cas où la génération F0 avait été aussi exposée durant la gamétogénèse (c.-à-d. dans le cas d'une exposition multigénérationnelle) [WEBSTER et collab., 2014]. Le cas d'une exposition intergénérationnelle a également été exploré par certains auteurs. En effet, SMITH et collab. [2019] ont étudié les effets sur une génération F1 de l'espèce *Oryzias latipes* d'une exposition pendant le développement embryo-larvaire des parents (c.-à-d. une génération F0) au glyphosate durant 15 jours à des doses allant de $0,5$ à 5 mgL^{-1} , administrées sous la forme de substance active pure ou co-formulée. Ils ont observé une réduction du taux d'éclosion associée à des malformations lors du développement de la progéniture (p. ex. courbure spinale, sac vitellin). Ces malformations pourraient être associées à des modifications épigénétiques chez la génération F0 (c.-à-d. les géniteurs) suite à son exposition à un stade précoce au glyphosate, co-formulé ou non. Il est intéressant de noter que la toxicité observée au niveau de l'individu (génération F1) était plus forte lors de l'exposition à une faible dose de substance active comparée à une exposition à une faible dose de GBH, mais aussi à une plus forte dose de substance active. Ces deux observations suggèrent, respectivement, l'interaction du glyphosate avec les co-formulants ainsi que la possibilité de réponses non monotones. Alors qu'à notre connaissance, il n'existe pas d'étude démontrant une toxicité transgénérationnelle du glyphosate seul ou co-formulé chez les poissons, KUBSAD et collab. [2019] ont montré que l'injection de la substance active pure à une femelle rate pouvait générer des effets toxiques (dysfonctionnement de certains organes et apparition de malformations à la naissance), uniquement à partir de la génération F2 et observables également sur la F3. Cette toxicité serait sous-tendue à des épimutations au niveau du sperme.

Un élément à considérer pour la transmission de la toxicité du glyphosate aux générations futures est la capacité de bioconcentration de ce composé dans les gamètes. En effet, si le contaminant était transmis dans les gamètes, il serait alors possible que les individus de la génération F1 (*a minima*) issus de parents contaminés soient exposés de manière directe au-delà du stade de cellules germinales. Compte tenu de la faible capacité du glyphosate à s'accumuler dans les tissus animaux [DUKE, 2020], il apparaît peu probable que de fortes concentrations du contaminant soient bioconcentrées dans les gamètes. Cette hypothèse est confirmée par FOLMAR et collab. [1979], qui ont démontré que la bioconcentration dans les œufs de *O. mykiss* est inexistante dans le cas de la substance active seule à des

concentrations de 0,02, 0,2 et 2 mgL⁻¹. Toutefois, dans le cas d'un GBH, une quantité de 60 µgkg⁻¹ a été retrouvée dans les œufs d'une génération F0 exposée à une dose de 2 mgL⁻¹. Il semblerait donc que certains co-formulants pourraient induire ou faciliter le passage du glyphosate dans les gamètes, en faible quantité néanmoins au regard des fortes doses d'exposition nécessaires pour détecter ce phénomène. L'exposition des générations filles au glyphosate, via sa bioaccumulation dans les gamètes, n'influe par conséquent probablement pas ou très peu les effets induits à des concentrations proches de celles retrouvées dans l'environnement. LANZARIN et collab. [2019] ont toutefois montré que l'exposition durant l'embryogenèse de *D. rerio* à un GBH à des concentrations comprises entre 2 et 8,5 mgL⁻¹ de substance active entraînait des facteurs de bioconcentration du glyphosate dans les embryons compris entre 166 et 2492. Ce résultat, qui illustre la capacité du glyphosate à se bioaccumuler dans les embryons, est toutefois surprenant puisque le glyphosate est considéré comme étant faiblement bioaccumulable [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015]. L'accumulation de glyphosate ayant été détecté uniquement chez les stades précoces de l'espèce *D. rerio*, celle-ci pourrait être associée, selon les auteurs, à la faible capacité de métabolisation de ces stades de vie. Étant donné que les facteurs de bioaccumulation ne se sont pas révélés proportionnels à la concentration d'exposition, ceux-ci restent néanmoins à confirmer.

En résumé, la répercussion des effets toxiques du glyphosate sur les futures générations n'est pas encore bien connue. Certaines études montrent que des effets, y compris quand ils ne sont pas observés chez la génération directement exposée, peuvent être induits et que ces derniers seraient potentiellement dus à des mécanismes épigénétiques. Cependant, l'absence d'études transgénérationnelles chez les poissons rend difficile la mise en cause de tels mécanismes de transmission de la toxicité. Des travaux considérant l'impact du glyphosate seul et co-formulé sur des générations de poisson F2 (*a minima*) seraient intéressants à ce niveau.

1.15 Conclusions

Considérant la littérature scientifique portant sur la toxicité du glyphosate, il est possible de conclure que cette substance active a la capacité d'induire de nombreux changements observables à différents niveaux d'organisation biologique, du niveau moléculaire jusqu'à celui de l'organisme. Ces effets semblent dépendre de différents paramètres biotiques et abiotiques comme l'espèce considérée, le stade de vie ou les conditions expérimentales (p. ex. propriétés physico-chimiques de l'eau). La dose de glyphosate influence aussi les résultats obtenus, avec parfois de faibles doses qui engendrent de plus grands effets dans une configuration dose-réponse non monotone. Les mécanismes sous-jacents à la toxicité du glyphosate ne sont pas encore clairement identifiés, mais ces derniers sont probablement multiples et dépendent également des différents paramètres évoqués plus haut. Aussi, l'association du glyphosate à des co-formulants présents dans les formulations commerciales n'influe pas toujours de la même manière sur la toxicité de la substance active. Dans certains cas, aucune modification n'est observée; dans d'autres, la modulation engendrée augmente ou diminue les effets du glyphosate. Il est également probable que plusieurs des co-formulants présents dans les GBHs actuellement sur le marché possèdent leurs propres toxicités, comme cela a été démontré pour le

POE-talowamine, désormais interdit. Enfin, qu'il soit seul ou co-formulé, les principaux effets du glyphosate aux niveaux cellulaire et humoral sont une inhibition de certaines enzymes, principalement l'AChE, une génération de stress oxydant, une perturbation de la physiologie mitochondriale et une cytotoxicité. Ces effets induisent une toxicité à de plus hauts niveaux d'intégrations biologiques et différentes fonctions physiologiques peuvent être affectées, comme la réponse immunitaire, le métabolisme énergétique ou encore la reproduction. Le stade de vie le plus sensible à l'exposition au glyphosate seul ou associé à des co-formulants semble être le développement embryo-larvaire. Toutefois, la majorité des études ne considèrent pas des doses de glyphosate présentant une pertinence environnementale et rares sont celles qui comparent les effets de la substance active seule et co-formulée. Dans le but de mieux représenter la réalité de l'exposition des organismes aquatiques dans l'environnement, il apparaît donc nécessaire de mener des recherches sur les effets induits chez les poissons à de très faibles doses de glyphosate, de l'ordre du μgL^{-1} , en intégrant la substance active seule, mais également des GBHS. En complément, il serait intéressant que ces recherches examinent l'impact de modes de contamination générationnels, permettant de mieux comprendre les effets sur le long terme de la substance herbicide la plus utilisée dans le monde. C'est le travail que nous nous proposons de mener dans le cadre de cette thèse, intitulée GlyphoTAC.

Références

- ALDRIDGE, W. N. 1971, «The nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases.», *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 44, n° 1, p. 25–30, ISSN 0042-9686. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5315347><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2428026><https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5315347><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2428026/>. 50
- ALVAREZ-MOYA, C., M. R. SILVA, C. V. RAMÍREZ, D. G. GALLARDO, R. L. SÁNCHEZ, A. C. AGUIRRE et A. F. VELASCO. 2014, «Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms», *Genetics and Molecular Biology*, vol. 37, n° 1, doi: [10.1590/s1415-47572014000100016](https://doi.org/10.1590/s1415-47572014000100016), p. 105–110, ISSN 1415-4757. 55
- AMINOV, A. I., I. L. GOLOVANOVA et A. A. FILIPPOV. 2013, «Effect of the herbicide Roundup on the activity of Glycosidases of invertebrates and juvenile fish», *Inland Water Biology*, vol. 6, n° 4, doi: [10.1134/s1995082913040032](https://doi.org/10.1134/s1995082913040032), p. 351–356, ISSN 1995-0829. 45
- ANNETT, R., H. R. HABIBI et A. HONTELA. 2014, «Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment», *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, n° 5, doi: [10.1002/jat.2997](https://doi.org/10.1002/jat.2997), p. 458–479, ISSN 0260-437X. 29, 30, 31, 52
- ANSARIN, K., M. KHOUBNASABJAFARI et A. JOUYBAN. 2017, «Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders», *BioImpacts*, vol. 5, n° 3, doi: [10.15171/bi.2015.20](https://doi.org/10.15171/bi.2015.20), p. 123–127, ISSN 2228-5660. 49

- ANSES. 2019, «Synthèse des données de surveillance - Appui scientifique et technique N° 2017-04», cahier de recherche, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). URL https://www.anses.fr/fr/system/files/Fiche_PPV_Glyphosate.pdf. 32
- ANTIER, C., P. KUDSK, X. REBOUD, L. ULBER, P. V. BARET et A. MESSÉAN. 2020, «Glyphosate Use in the European Agricultural Sector and a Framework for Its Further Monitoring», *Sustainability*, vol. 12, n° 14, doi: [10.3390/su12145682](https://doi.org/10.3390/su12145682), p. 5682, ISSN 2071-1050. 29
- ARAL, F., E. SAHNOZ et Z. DOGU. 2011, «Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish», dans *Recent Advances in Fish Farms*, InTech, doi: [10.5772/17687](https://doi.org/10.5772/17687). 38
- ARGOU-CARDOZO, I. et F. ZEIDÁN-CHULIÁ. 2019, «Possible deleterious impact of glyphosate and its commercial formulation in reproductive health of fishes», *Medical University*, vol. 2, n° 4, doi: [10.2478/medu-2019-0017](https://doi.org/10.2478/medu-2019-0017), p. 125–133, ISSN 2544-9818. 36
- ARMILIATO, N., D. AMMAR, L. NEZZI, M. STRALIOTTO, Y. M. R. MULLER et E. M. NAZARI. 2014, «Changes in Ultrastructure and Expression of Steroidogenic Factor-1 in Ovaries of Zebrafish *Danio rerio* Exposed to Glyphosate», *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol. 77, n° 7, doi: [10.1080/15287394.2014.880393](https://doi.org/10.1080/15287394.2014.880393), p. 405–414, ISSN 1528-7394. 36
- ARTS, G., W. BELTMAN, H. HOLTERMAN, P. VAN VLIET, E. WIPFLER et J. V. D. ZANDE. 2017, «Including multistress in the risk assessment of plant protection products», cahier de recherche, Wageningen Environmental Research. URL <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/523425>. 30
- ASHAUER, R. et T. JAGER. 2018, «Physiological modes of action across species and toxicants : the key to predictive ecotoxicology», *Environmental Science : Processes & Impacts*, vol. 20, n° 1, doi: [10.1039/c7em00328e](https://doi.org/10.1039/c7em00328e), p. 48–57, ISSN 2050-7887. 45
- AYANDA, I. O. 2018, «Toxicity of Sublethal Concentrations of Glyphosate and Paraquat Herbicide in the African Catfish *Clarias gariepinus*», *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 20, doi: [10.17957/ijab/15.0642](https://doi.org/10.17957/ijab/15.0642), ISSN 1560-8530. 47, 48
- AYANDA, O., S. ONIYE, J. AUTA, V. AJIBOLA et O. BELLO. 2015, «Responses of the African catfish *Clarias gariepinus* to long-term exposure to glyphosate- and paraquat-based herbicides», *African Journal of Aquatic Science*, vol. 40, n° 3, doi: [10.2989/16085914.2015.1074882](https://doi.org/10.2989/16085914.2015.1074882), p. 261–267, ISSN 1608-5914. 45, 46
- BADO-NILLES, A., S. JOLLY, F. LAMAND, A. GEFFARD, B. GAGNAIRE, C. TURIES, J.-M. PORCHER, W. SANCHEZ et S. BETOULLE. 2015, «Involvement of fish immunomarkers in environmental biomonitoring approach : Urban and agri-viticultural context», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 120, doi: [10.1016/j.ecoenv.2015.05.021](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.021), p. 35–40, ISSN 0147-6513. 42

- BENBROOK, C. M. 2016, «Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally», *Environmental Sciences Europe*, vol. 28, n° 1, doi: [10.1186/s12302-016-0070-0](https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0), p. 3, ISSN 2190-4707. 29
- BEST, C., H. IKERT, D. J. KOSTYNIUK, P. M. CRAIG, L. NAVARRO-MARTIN, L. MARANDEL et J. A. MENNINGEN. 2018, «Epigenetics in teleost fish : From molecular mechanisms to physiological phenotypes», *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 224, n° September 2017, doi: [10.1016/j.cbpb.2018.01.006](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006), p. 210–244, ISSN 1096-4959. 54, 55
- BICKHAM, J. W., S. SANDHU, P. D. HEBERT, L. CHIKHI et R. ATHWAL. 2000, «Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations : implications for biomonitoring and ecotoxicology», *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 463, n° 1, doi: [10.1016/s1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00004-1), p. 33–51, ISSN 1383-5742. 55
- BLANC, M., B. CORMIER, T. HYÖTYLÄINEN, M. KRAUSS, N. SCHERBAK, X. COUSIN et S. H. KEITER. 2020, «Multi- and transgenerational effects following early-life exposure of zebrafish to permethrin and coumarin 47 : Impact on growth, fertility, behavior and lipid metabolism», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 205, doi: [10.1016/j.ecoenv.2020.111348](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111348), p. 111 348, ISSN 0147-6513. 54, 55
- BONNARD, N., D. JARGOT, M. FALCY, F. PILLIÈRE, S. ROBERT, A. FASTIER, S. OUDAR et M.-O. RAMBOURG. 2019, «Glyphosate», vol. 8, p. 1–9. URL <https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox.html>. 30
- BRAZ-MOTA, S., H. SADAUSKAS-HENRIQUE, R. M. DUARTE, A. L. VAL et V. M. ALMEIDA-VAL. 2015, «Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*», *Chemosphere*, vol. 135, doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.03.042](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.042), p. 53–60, ISSN 0045-6535. 47
- BRIDI, D., S. ALTENHOFEN, J. B. GONZALEZ, G. K. REOLON et C. D. BONAN. 2017, «Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish», *Toxicology*, vol. 392, doi: [10.1016/j.tox.2017.10.007](https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007), p. 32–39, ISSN 0300-483X. 39, 40, 41
- DE BRITO RODRIGUES, L., G. G. COSTA, E. L. THÁ, L. R. DA SILVA, R. DE OLIVEIRA, D. M. LEME, M. M. CESTARI, C. K. GRISOLIA, M. C. VALADARES et G. A. R. DE OLIVEIRA. 2019, «Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 842, n° April, doi: [10.1016/j.mrgentox.2019.05.002](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002), p. 94–101, ISSN 1383-5718. 39
- BRUGGEN, A. V., M. HE, K. SHIN, V. MAI, K. JEONG, M. FINCKH et J. MORRIS. 2018, «Environmental and health effects of the herbicide glyphosate», *Science of the Total Environment*, vol. 616-617, doi: [10.1016/j.scitotenv.2017.10.309](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309), p. 255–268, ISSN 0048-9697. 29, 33

- BURGOS-ACEVES, M. A., L. LIONETTI et C. FAGGIO. 2019, «Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish», *Science of the Total Environment*, vol. 670, doi: [10.1016/j.scitotenv.2019.03.275](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.275), p. 1170–1183, ISSN 1879-1026. 42
- CA, H., V. A. JR, M. AA, C. L. C, P. EG, B. A et C. CD. 2013, «Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water», *Aquatic Toxicology*, vol. 142-143, doi: [10.1016/j.aquatox.2013.08.006](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006), p. 176–184, ISSN 0166-445X. 37, 48
- DO CARMO LANGIANO, V. et C. B. MARTINEZ. 2008, «Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, vol. 147, n° 2, doi: [10.1016/j.cbpc.2007.09.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009), p. 222–231, ISSN 1532-0456. 45, 47
- CATTANEO, R., B. CLASEN, V. L. LORO, C. C. DE MENEZES, A. PRETTO, B. BALDISSEROTTO, A. SANTI et L. A. DE AVILA. 2011, «Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 87, n° 6, doi: [10.1007/s00128-011-0396-7](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0396-7), p. 597–602, ISSN 0007-4861. 50
- CAVALCANTE, D., C. MARTINEZ et S. SOFIA. 2008, «Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*», *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 655, n° 1-2, doi: [10.1016/j.mrgentox.2008.06.010](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010), p. 41–46, ISSN 1383-5718. 55
- CEYHUN, S. B., M. ŞENTÜRK, O. ERDOĞAN et Ö. İ. KÜFREVIÖĞLU. 2010, «*In vitro* and *in vivo* effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills», *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 97, n° 3, doi: [10.1016/j.pestbp.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.01.003), p. 177–181, ISSN 0048-3575. 51
- CHATTERJEE, N., J. GIM et J. CHOI. 2018, «Epigenetic profiling to environmental stressors in model and non-model organisms : Ecotoxicology perspective», *Environmental Health and Toxicology*, vol. 33, n° 3, doi: [10.5620/eh.t.2018015](https://doi.org/10.5620/eh.t.2018015), p. e2018 015, ISSN 2233-6567. 55
- DA COSTA CHAULET, F., H. H. DE ALCANTARA BARCELLOS, D. FIOR, A. POMPERMAIER, G. KOAKOSKI, J. G. S. DA ROSA, M. FAGUNDES et L. J. G. BARCELLOS. 2019, «Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 77, n° 3, doi: [10.1007/s00244-019-00644-7](https://doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7), p. 443–451, ISSN 0090-4341. 41
- COUPE, R. H., S. J. KALKHOFF, P. D. CAPEL et C. GREGOIRE. 2011, «Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins», *Pest Management Science*, vol. 68, n° 1, doi: [10.1002/ps.2212](https://doi.org/10.1002/ps.2212), p. 16–30, ISSN 1526-498X. 32
- DEY, S., P. SAMANTA, S. PAL, A. K. MUKHERJEE, D. KOLE et A. R. GHOSH. 2016, «Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71)», *Emerging Contaminants*, vol. 2, n° 4, doi: [10.1016/j.emcon.2016.12.002](https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002), p. 191–203, ISSN 2405-6650. 45, 47, 50

- DINÇER, B., A. P. EKINCI, G. AKYÜZ et İ. Z. KURTOĞLU. 2015, «Characterization and inhibition studies of carbonic anhydrase from gill of Russian Sturgeon Fish (*Acipenser gueldenstaedtii*)», *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 31, n° 6, doi: [10.3109/14756366.2015.1076810](https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1076810), p. 1662–1665, ISSN 1475-6366. 51
- DUKE, S. O. 2020, «Glyphosate : environmental fate and impact», *Weed Science*, vol. 68, n° 3, doi: [10.1017/wsc.2019.28](https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28), p. 201–207, ISSN 0043-1745. 37, 56
- DUKE, S. O. et S. B. POWLES. 2008, «Glyphosate : a once-in-a-century herbicide», *Pest Management Science*, vol. 64, n° 4, doi: [10.1002/ps.1518](https://doi.org/10.1002/ps.1518), p. 319–325, ISSN 2078-6913. 29
- EL-DEMERDASH, F. M., M. I. YOUSEF et E. I. ELAGAMY. 2001, «Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*)», *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 36, n° 1, doi: [10.1081/pfc-100000914](https://doi.org/10.1081/pfc-100000914), p. 29–42, ISSN 0360-1234. 50, 51
- EL-GENDY, K. S., N. M. ALY et A. H. EL-SEBAE. 1998, «Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of boliti fish (*Tilapia nilotica*)», *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 33, n° 2, doi: [10.1080/03601239809373135](https://doi.org/10.1080/03601239809373135), p. 135–149, ISSN 0360-1234. 42, 43, 44
- ERHUNMWUNSE, N. O. 2014, «Haematological Indices in Fish Plasma as Indicators of Exposure to a Commonly Used Herbicides», *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, , n° June. URL <http://www.ajbasweb.com/old/ajbas/2014/April/245-250-april14.pdf>. 43
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2015, «Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate», *EFSA Journal*, vol. 13, n° 11, doi: [10.2903/j.efsa.2015.4302](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302), p. 4302, ISSN 18314732, 18314732. 32, 33, 35, 57
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2017, «Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine disrupting properties of glyphosate», *EFSA Journal*, vol. 15, n° 9, doi: [10.2903/j.efsa.2017.4979](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4979), ISSN 18314732, 18314732. 37
- FARIA, M., X. WU, M. LUJA-MONDRAGÓN, E. PRATS, L. M. GÓMEZ-OLIVÁN, B. PIÑA et D. RALDÚA. 2020, «Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants», *Science of the Total Environment*, vol. 714, doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.136759](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759), p. 136 759, ISSN 0048-9697. 40, 41
- FÉLIX, F. J. et N. SARADHAMANI. 2015, «Impact of the Herbicide Glyphosate Roundup (41 %) On The Haematology of the Freshwater Fish, Catla Catla (Hamilton)», *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, vol. 9, n° 4, p. 56–60, ISSN 2319-2399. URL <https://iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/vol9-issue4/Version-3/H09435660.pdf>. 43

- FERREIRA, D., A. C. DA MOTTA, L. C. KREUTZ, C. TONI, V. L. LORO et L. J. G. BARCELLOS. 2010, «Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals», *Chemosphere*, vol. 79, n° 9, doi: [10.1016/j.chemosphere.2010.03.024](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.024), p. 914–921, ISSN 0045-6535. 47
- FIORINO, E., P. SEHONOVA, L. PLHALOVA, J. BLAHOVA, Z. SVOBODOVA et C. FAGGIO. 2018, «Effects of glyphosate on early life stages : comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio* », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, n° 9, doi: [10.1007/s11356-017-1141-5](https://doi.org/10.1007/s11356-017-1141-5), p. 8542–8549, ISSN 0944-1344. 34, 38
- FOLMAR, L. C., H. O. SANDERS et A. M. JULIN. 1979, «Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 8, n° 3, doi: [10.1007/BF01056243](https://doi.org/10.1007/BF01056243), p. 269–278, ISSN 0090-4341. 29, 31, 34, 56
- GANDAR, A., S. JEAN, J. CANAL, N. MARTY-GASSET, F. GILBERT et P. LAFFAILLE. 2015, «Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism», *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, n° 4, doi: [10.1007/s11356-015-5147-6](https://doi.org/10.1007/s11356-015-5147-6), p. 3184–3194, ISSN 0944-1344. 30
- GHOLAMI-SEYEDKOLAEI, S. J., A. MIRVAGHEFI, H. FARAHMAND et A. A. KOSARI. 2013, «Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 98, doi: [10.1016/j.ecoenv.2013.09.011](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.011), p. 135–141, ISSN 0147-6513. 43, 45
- GIAQUINTO, P. C., M. B. DE SÁ, V. S. SUGIHARA, B. B. GONÇALVES, H. C. DELÍCIO et A. BARKI. 2017, «Effects of Glyphosate-Based Herbicide Sub-Lethal Concentrations on Fish Feeding Behavior», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 98, n° 4, doi: [10.1007/s00128-017-2037-2](https://doi.org/10.1007/s00128-017-2037-2), p. 460–464, ISSN 0007-4861. 41
- GIESY, J. P., S. DOBSON et K. R. SOLOMON. 2000, «Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide», dans *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 167, Springer New York, p. 35–120, doi: [10.1007/978-1-4612-1156-3_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2). 29, 32, 33
- GLUSZAK, L., V. L. LORO, A. PRETTO, B. S. MORAES, A. RAABE, M. F. DUARTE, M. B. DA FONSECA, C. C. DE MENEZES et D. M. DE SOUSA VALLADÃO. 2011, «Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 61, n° 4, doi: [10.1007/s00244-011-9652-4](https://doi.org/10.1007/s00244-011-9652-4), p. 624–630, ISSN 0090-4341. 45, 47
- GLUSZAK, L., D. DOS SANTOS MIRON, M. CRESTANI, M. B. DA FONSECA, F. DE ARAÚJO PEDRON, M. F. DUARTE et V. L. P. VIEIRA. 2006, «Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 65, n° 2, doi: [10.1016/j.ecoenv.2005.07.017](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017), p. 237–241, ISSN 0147-6513. 43, 45, 50

- GLUSCZAK, L., D. DOS SANTOS MIRON, B. S. MORAES, R. R. SIMÕES, M. R. C. SCHETINGER, V. M. MORSCH et V. L. LORO. 2007, «Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, vol. 146, n° 4, doi: [10.1016/j.cbpc.2007.06.004](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004), p. 519–524, ISSN 1532-0456. 45, 46, 47, 48, 50
- GONÇALVES, B., P. GIAQUINTO, D. DOS SANTOS SILVA, C. DEMELO, S. NETO, A. DE LIMA, A. DAROSCI BRITO, J. PORTINHO, W. CARVALHO et T. ROCHA. 2019, «Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment», IntechOpen, doi: [10.5772/intechopen.85157](https://doi.org/10.5772/intechopen.85157). 33
- GONÇALVES, B. B., N. F. NASCIMENTO, M. P. SANTOS, R. M. BERTOLINI, G. S. YASUI et P. C. GIAQUINTO. 2018, «Low concentrations of glyphosate-based herbicide cause complete loss of sperm motility of yellowtail tetra fish *Astyanax lacustris*», *Journal of Fish Biology*, vol. 92, n° 4, doi: [10.1111/jfb.13571](https://doi.org/10.1111/jfb.13571), p. 1218–1224, ISSN 0022-1112. 37
- GRANDCOIN, A., S. PIEL et E. BAURÈS. 2017, «AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters : Its sources, behavior and environmental fate», *Water Research*, vol. 117, doi: [10.1016/j.watres.2017.03.055](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055), p. 187–197, ISSN 0043-1354. 31
- GUILHERME, S., I. GAIVÃO, M. SANTOS et M. PACHECO. 2012a, «DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress», *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 743, n° 1-2, doi: [10.1016/j.mrgentox.2011.10.017](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017), p. 1–9, ISSN 1383-5718. 47, 48, 55
- GUILHERME, S., I. GAIVAO, M. A. SANTOS et M. PACHECO. 2010, «European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup(R)–a glyphosate-based herbicide», *Mutagenesis*, vol. 25, n° 5, doi: [10.1093/mutage/geq038](https://doi.org/10.1093/mutage/geq038), p. 523–530, ISSN 0267-8357. 47
- GUILHERME, S., M. A. SANTOS, C. BARROSO, I. GAIVÃO et M. PACHECO. 2012b, «Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*) : considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms», *Ecotoxicology*, vol. 21, n° 5, doi: [10.1007/s10646-012-0892-5](https://doi.org/10.1007/s10646-012-0892-5), p. 1381–1390, ISSN 0963-9292. 55
- HALAPPA, R. et M. DAVID. 2009, «Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to chlorpyrifos», *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 9, n° 2, doi: [10.4194/trjfas.2009.0218](https://doi.org/10.4194/trjfas.2009.0218), p. 233–238, ISSN 1303-2712. 40
- HANSON, M. A. et M. K. SKINNER. 2016, «Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance», *Environmental Epigenetics*, vol. 2, n° 1, doi: [10.1093/eep/dvw002](https://doi.org/10.1093/eep/dvw002), p. dvw002, ISSN 2058-5888. 54

- HOLDWAY, D. A. et D. G. DIXON. 1988, «Acute toxicity of permethrin or glyphosate pulse exposure to larval white sucker (*catostomus commersoni*) and juvenile flagfish (*jordanella floridae*) as modified by age and ration level», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, n° 1, doi: [10.1002/etc.5620070109](https://doi.org/10.1002/etc.5620070109), p. 63–68, ISSN 0730-7268. 34
- HUED, A. C., S. OBERHOFER et M. DE LOS ÁNGELES BISTONI. 2011, «Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup®) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes)», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 62, n° 1, doi: [10.1007/s00244-011-9686-7](https://doi.org/10.1007/s00244-011-9686-7), p. 107–117, ISSN 0090-4341. 41
- INERIS. 2020, «GLYPHOSATE ET SES PRINCIPAUX COMPOSES», cahier de recherche, Verneuil-en-Halatte : Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris) - 181229 - v2.0, 27/03/2020. URL https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_273-1/FicheTox_273.pdf. 13, 31
- JIN, J., T. KUROBE, W. F. RAMÍREZ-DUARTE, M. B. BOLOTAOLO, C. H. LAM, P. K. PANDEY, T.-C. HUNG, M. E. STILLWAY, L. ZWEIG, J. CAUDILL, L. LIN et S. J. TEH. 2018, «Sub-lethal effects of herbicides pexoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*)», *Aquatic Toxicology*, vol. 197, n° October 2017, doi: [10.1016/j.aquatox.2018.01.019](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.019), p. 79–88, ISSN 0166-445X. 36, 47, 48, 50
- KAMSTRA, J. H., L. B. SALES, P. ALESTRÖM et J. LEGLER. 2017, «Differential DNA methylation at conserved non-genic elements and evidence for transgenerational inheritance following developmental exposure to mono(2-ethylhexyl) phthalate and 5-azacytidine in zebrafish», *Epigenetics & Chromatin*, vol. 10, n° 1, doi: [10.1186/s13072-017-0126-4](https://doi.org/10.1186/s13072-017-0126-4), p. 20, ISSN 1756-8935. 56
- KELLY, D. W., R. POULIN, D. M. TOMPKINS et C. R. TOWNSEND. 2010, «Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival», *Journal of Applied Ecology*, vol. 47, n° 2, doi: [10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x), p. 498–504, ISSN 0021-8901. 43, 44
- KENNEDY, C. 2017, «Glyphosate fate and toxicity to fish with special relevance to salmon and steelhead populations in the Skeena River watershed», cahier de recherche. URL <https://www.semanticscholar.org/paper/Acute-toxicity-of-copper-hydroxide-and-glyphosate-Kingsley/7b16dc888bec16c942acb536e69e58740c5815e2>. 33, 34, 45
- KONDERA, E., B. TEODORCZUK, K. ŁUGOWSKA et M. WITESKA. 2018, «Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp *Cyprinus carpio*», *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 44, n° 3, doi: [10.1007/s10695-018-0489-x](https://doi.org/10.1007/s10695-018-0489-x), p. 1011–1018, ISSN 1573-5168. 43, 45

- KREUTZ, L. C., L. J. G. BARCELLOS, S. DE FARIA VALLE, T. DE OLIVEIRA SILVA, D. ANZILIERO, E. D. DOS SANTOS, M. PIVATO et R. ZANATTA. 2011, «Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 30, n° 1, doi: [10.1016/j.fsi.2010.09.012](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.012), p. 51–57, ISSN 1050-4648. 43
- KREUTZ, L. C., L. J. G. BARCELLOS, A. MARTENINGHE, E. D. DOS SANTOS et R. ZANATTA. 2010, «Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 29, n° 4, doi: [10.1016/j.fsi.2010.06.003](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.003), p. 694–697, ISSN 1050-4648. 43, 44
- KUBSAD, D., E. E. NILSSON, S. E. KING, I. SADLER-RIGGLEMAN, D. BECK et M. K. SKINNER. 2019, «Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations : Generational Toxicology», *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, doi: [10.1038/s41598-019-42860-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0), p. 6372, ISSN 2045-2322. 56
- LANZARIN, G. A., L. M. FÉLIX, D. SANTOS, C. A. VENÂNCIO et S. M. MONTEIRO. 2019, «Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation - Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis», *Chemosphere*, vol. 223, doi: [10.1016/j.chemosphere.2019.02.071](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.071), p. 514–522, ISSN 0045-6535. 34, 39, 47, 57
- LANZARIN, G. A., C. A. VENÂNCIO, S. M. MONTEIRO et L. M. FÉLIX. 2020, «Behavioural toxicity of environmental relevant concentrations of a glyphosate commercial formulation - RoundUp® UltraMax - During zebrafish embryogenesis», *Chemosphere*, vol. 253, doi: [10.1016/j.chemosphere.2020.126636](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126636), p. 126 636, ISSN 0045-6535. 40
- LARSEN, K. E., A. L. LIFSCHITZ, C. E. LANUSSE et G. L. VIRKEL. 2016, «The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 45, doi: [10.1016/j.etap.2016.05.012](https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.012), p. 41–44, ISSN 1382-6689. 50
- LI, M.-H., L.-Y. RUAN, J.-W. ZHOU, Y.-H. FU, L. JIANG, H. ZHAO et J.-S. WANG. 2017, «Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure», *Aquatic Toxicology*, vol. 188, n° May, doi: [10.1016/j.aquatox.2017.05.004](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.004), p. 159–169, ISSN 0166-445X. 45
- LI, M.-H., H.-D. XU, Y. LIU, T. CHEN, L. JIANG, Y.-H. FU et J.-S. WANG. 2016, «Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide», *Toxicology Research*, vol. 5, n° 4, doi: [10.1039/c6tx00011h](https://doi.org/10.1039/c6tx00011h), p. 1039–1052, ISSN 2045-4538. 45
- LI, Y., W. DING et X. LI. 2019, «Acute exposure of glyphosate-based herbicide induced damages on common carp organs via heat shock proteins-related immune response and oxidative stress», *Toxin Reviews*, vol. 0, n° 0, doi: [10.1080/15569543.2019.1621903](https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1621903), p. 1–13, ISSN 1556-9543. 43, 47

- LIONETTO, M., R. CARICATO, M. GIORDANO, E. ERROI et T. SCETTINO. 2012, «Carbonic anhydrase as pollution biomarker : An ancient enzyme with a new use», *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 9, n° 11, doi: [10.3390/ijerph9113965](https://doi.org/10.3390/ijerph9113965), p. 3965–3977, ISSN 1661-7827. 51
- LOPES, F. M., A. S. V. JUNIOR, C. D. CORCINI, A. C. DA SILVA, V. G. GUAZZELLI, G. TAVARES et C. E. DA ROSA. 2014, «Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio* », *Aquatic Toxicology*, vol. 155, doi: [10.1016/j.aquatox.2014.07.006](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.006), p. 322–326, ISSN 0166-445X. 36, 55
- LORO, V. L., L. GLUSCZAK, B. S. MORAES, C. A. M. LEAL, C. MENEZES, C. R. MURUSSI, J. LEITEMPERGER, M. R. C. SCHETINGER et V. M. MORSCH. 2015, «Glyphosate-based herbicide affects biochemical parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837)», doi: [10.1590/1982-0224-20140082](https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140082). 44, 45
- LUIS, G., M. SOLANGE et L. MIR. 2011, «Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems», dans *Herbicides and Environment*, InTech, ISBN 978-953-307-476-4, p. 343–368, doi: [10.5772/12877](https://doi.org/10.5772/12877). 40
- LUO, L., F. WANG, Y. ZHANG, M. ZENG, C. ZHONG et F. XIAO. 2017, « *In vitro* cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes », *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 52, n° 6, doi: [10.1080/03601234.2017.1293449](https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1293449), p. 410–417, ISSN 1532-4109. 46
- LUSHCHAK, O. V., O. I. KUBRAK, J. M. STOREY, K. B. STOREY et V. I. LUSHCHAK. 2009, «Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues», *Chemosphere*, vol. 76, n° 7, doi: [10.1016/j.chemosphere.2009.04.045](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045), p. 932–937, ISSN 0045-6535. 45, 47
- LUSHCHAK, V. I. 2015, «Contaminant-induced oxidative stress in fish : a mechanistic approach», *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, n° 2, doi: [10.1007/s10695-015-0171-5](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5), p. 711–747, ISSN 1573-5168. 47
- LUSHCHAK, V. I., L. P. LUSHCHAK, A. A. MOTA et M. HERMES-LIMA. 2001, «Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation», *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 280, n° 1, doi: [10.1152/ajpregu.2001.280.1.r100](https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.1.r100), p. 100–107. 47
- MA, J., Y. BU et X. LI. 2015, «Immunological and histopathological responses of the kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sublethally exposed to glyphosate», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 39, n° 1, doi: [10.1016/j.etap.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.004), p. 1–8, ISSN 1872-7077. 43
- MA, J. et X. LI. 2015, «Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate», *Chemosphere*, vol. 128, doi: [10.1016/j.chemosphere.2015.02.017](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017), p. 293–298, ISSN 0045-6535. 43, 44

- MAJOR, K. M., B. M. DECOURTEN, J. LI, M. BRITTON, M. L. SETTLES, A. C. MEHINTO, R. E. CONNON et S. M. BRANDER. 2020, «Early Life Exposure to Environmentally Relevant Levels of Endocrine Disruptors Drive Multigenerational and Transgenerational Epigenetic Changes in a Fish Model», *Frontiers in Marine Science*, vol. 7, n° June, doi: [10.3389/fmars.2020.00471](https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00471), p. 1–17, ISSN 2296-7745. 56
- MARCHAND, J., A. TANGUY, G. CHARRIER, L. QUINIOU, E. PLEE-GAUTHIER et J. LAROCHE. 2006, «Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder, *Platichthys flesus*, Submitted to Pesticide Exposure», *Marine Biotechnology*, vol. 8, n° 3, doi: [10.1007/s10126-005-0099-3](https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3), p. 275–294, ISSN 1436-2228. 42, 45
- MARROCCO, I., F. ALTIERI et I. PELUSO. 2017, «Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, doi: [10.1155/2017/6501046](https://doi.org/10.1155/2017/6501046), p. 1–32, ISSN 1942-0900. 49
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M., A. E. MORALES et A. SANZ. 2005, «Antioxidant Defenses in Fish : Biotic and Abiotic Factors», *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, vol. 15, n° 1-2, doi: [10.1007/s11160-005-7846-4](https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4), p. 75–88, ISSN 0960-3166. 49
- MELA, M., I. GUILOSKI, H. DORIA, M. RANDI, C. DE OLIVEIRA RIBEIRO, L. PEREIRA, A. MARASCHI, V. PRODOCIMO, C. FREIRE et H. S. DE ASSIS. 2013, «Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 93, doi: [10.1016/j.ecoenv.2013.03.026](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026), p. 13–21, ISSN 0147-6513. 51
- MENÉNDEZ-HELMAN, R. J., G. V. FERREYROA, M. DOS SANTOS AFONSO et A. SALIBIÁN. 2011, «Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *cnesterodon decemmaculatus*», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 88, n° 1, doi: [10.1007/s00128-011-0423-8](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8), p. 6–9, ISSN 0007-4861. 50
- MENÉNDEZ-HELMAN, R. J., L. A. MIRANDA, M. DOS SANTOS AFONSO et A. SALIBIÁN. 2015, «Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a glyphosate-based herbicide», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 114, doi: [10.1016/j.ecoenv.2015.01.014](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.014), p. 157–163, ISSN 0147-6513. 45
- MENEZES, C. C., M. B. FONSECA, V. L. LORO, A. SANTI, R. CATTANEO, B. CLASEN, A. PRETTO et V. M. MORSCH. 2010, «Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 60, n° 4, doi: [10.1007/s00244-010-9574-6](https://doi.org/10.1007/s00244-010-9574-6), p. 665–671, ISSN 0090-4341. 47
- MER, C. L., R. L. ROY, J. PELLERIN, C. M. COUILLARD et D. MALTAIS. 2013, «Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 89, doi: [10.1016/j.ecoenv.2012.11.027](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.027), p. 174–181, ISSN 0147-6513. 35

- MESNAGE, R. et M. N. ANTONIOU. 2017, «Facts and Fallacies in the Debate on Glyphosate Toxicity», *Frontiers in Public Health*, vol. 5, n° November, doi: [10.3389/fpubh.2017.00316](https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00316), p. 1–7, ISSN 2296-2565. 32
- MESNAGE, R. et M. N. ANTONIOU. 2018, «Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides», *Frontiers in Public Health*, vol. 5, n° January, doi: [10.3389/fpubh.2017.00361](https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361), p. 1–8, ISSN 2296-2565. 32
- MESNAGE, R., C. BENBROOK et M. N. ANTONIOU. 2019, «Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 128, n° January, doi: [10.1016/j.fct.2019.03.053](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053), p. 137–145, ISSN 0278-6915. 31, 32, 34
- MESNAGE, R., N. DEFARGE, J. S. DE VENDÔMOIS et G. SÉRALINI. 2015, «Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 84, doi: [10.1016/j.fct.2015.08.012](https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012), p. 133–153, ISSN 0278-6915. 36, 37
- MICAH, A. D. 2016, «Acute effects of glyphosate on the behavioural and hematological characteristics of *Heteroclinus* (hybrid) fingerlings», *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, vol. 3, n° 1, doi: [10.3153/jaefr17003](https://doi.org/10.3153/jaefr17003), p. 13–18, ISSN 2149-0236. 42, 43
- MODESTO, K. A. et C. B. MARTINEZ. 2010a, «Effects of Roundup Transorb on fish : Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity», *Chemosphere*, vol. 81, n° 6, doi: [10.1016/j.chemosphere.2010.07.005](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005), p. 781–787, ISSN 0045-6535. 43, 47, 50
- MODESTO, K. A. et C. B. MARTINEZ. 2010b, «Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*», *Chemosphere*, vol. 78, n° 3, doi: [10.1016/j.chemosphere.2009.10.047](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047), p. 294–299, ISSN 0045-6535. 47
- MORENO, N. C., S. H. SOFIA et C. B. MARTINEZ. 2014, «Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 37, n° 1, doi: [10.1016/j.etap.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.012), p. 448–454, ISSN 1382-6689. 55
- MORGAN, M. et J. KICENIUK. 1992, «Response of rainbow trout to a two month exposure to Vision®, a glyphosate herbicide», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 48, n° 5, doi: [10.1007/bf00196001](https://doi.org/10.1007/bf00196001), p. 772–780, ISSN 0007-4861. 35
- DE MOURA, F. R., K. R. BRENTAGANI, A. GEMELLI, A. P. SINHORIN et V. D. G. SINHORIN. 2017, «Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®», *Chemosphere*, vol. 185, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.07.030](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030), p. 445–451, ISSN 0045-6535. 47
- MUNDAY, P. L. 2014, «Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification», *F1000Prime Reports*, vol. 6, n° November, doi: [10.12703/p6-99](https://doi.org/10.12703/p6-99), p. 1–7, ISSN 2051-7599. 54, 55

- MYERS, J. P., M. N. ANTONIOU, B. BLUMBERG, L. CARROLL, T. COLBORN, L. G. EVERETT, M. HANSEN, P. J. LANDRIGAN, B. P. LANPHEAR, R. MESNAGE, L. N. VANDENBERG, F. S. VOM SAAL, W. V. WELSHONS et C. M. BENBROOK. 2016, «Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures : a consensus statement», *Environmental Health*, vol. 15, n° 1, doi: [10.1186/s12940-016-0117-0](https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0), p. 19, ISSN 1476-069X. 32, 52
- LIN, N. K., M. M. ISGOR, B. SENGUL et S. BEYDEMIR. 2013, «Influence of pesticide exposure on carbonic anhydrase II from sheep stomach», *Toxicology and Industrial Health*, vol. 31, n° 9, doi: [10.1177/0748233713475508](https://doi.org/10.1177/0748233713475508), p. 823–830, ISSN 0748-2337. 50, 51
- NWANI, C., N. NAGPURE, R. KUMAR, B. KUSHWAHA et W. LAKRA. 2013, «DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 36, n° 2, doi: [10.1016/j.etap.2013.06.001](https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.001), p. 539–547, ISSN 1382-6689. 47
- ORUN, I., M. I. DOĞRU, K. ERDOĞAN, A. DOĞRU, A. ÖNGÜN, E. YÜKSEL et Z. S. TALAS. 2013, «Effects of acute and chronic exposure to glyphosate on common carp (*Cyprinus carpio* L.) hematological parameters : The beneficial effect of propolis», *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 22, n° 9, p. 2504–2509. 43
- VON OSTEN, J. R., A. ORTÍZ-ARANA, L. GUILHERMINO et A. SOARES. 2005, «*In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatanana*) exposed to pesticides», *Chemosphere*, vol. 58, n° 5, doi: [10.1016/j.chemosphere.2004.08.065](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.065), p. 627–636, ISSN 0045-6535. 46
- PALMA-BAUTISTA, C., J. VAZQUEZ-GARCIA, I. TRAVLOS, A. TATARIDAS, P. KANATAS, J. DOMÍNGUEZ-VALENZUELA et R. DE PRADO. 2020, «Effect of Adjuvant on Glyphosate Effectiveness, Retention, Absorption and Translocation in *Lolium rigidum* and *Coryza canadensis*», *Plants*, vol. 9, n° 3, doi: [10.3390/plants9030297](https://doi.org/10.3390/plants9030297), p. 297, ISSN 2223-7747. 29
- PAYNE, J., A. MATHIEU, W. MELVIN et L. FANCEY. 1996, «Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 32, n° 2, doi: [10.1016/0025-326X\(95\)00112-Z](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00112-Z), p. 225–231, ISSN 0025-326X. 50, 51
- PEILLEX, C. et M. PELLETIER. 2020, «The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity», *Journal of Immunotoxicology*, vol. 17, n° 1, doi: [10.1080/1547691x.2020.1804492](https://doi.org/10.1080/1547691x.2020.1804492), p. 163–174, ISSN 1547-691X. 42, 52, 53
- PEIXOTO, F. 2005, «Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation», *Chemosphere*, vol. 61, n° 8, doi: [10.1016/j.chemosphere.2005.03.044](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044), p. 1115–1122, ISSN 0045-6535. 46

- PEREIRA, A. G., M. L. JARAMILLO, A. P. REMOR, A. LATINI, C. E. DAVICO, M. L. DA SILVA, Y. M. MÜLLER, D. AMMAR et 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*, vol. 209, doi: [10.1016/j.chemosphere.2018.06.075](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075), p. 353–362, ISSN 0045-6535. 40, 46
- PERSCH, T. S. P., R. N. WEIMER, B. S. FREITAS et G. T. OLIVEIRA. 2017, «Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides : Roundup®, Primoleo®, and Facet®», *Chemosphere*, vol. 174, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.01.092](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.092), p. 98–109, ISSN 1879-1298. 47, 48
- REHBERGER, K., I. WERNER, B. HITZFELD, H. SEGNER et L. BAUMANN. 2017, «20 Years of fish immunotoxicology - what we know and where we are», *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 47, n° 6, doi: [10.1080/10408444.2017.1288024](https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024), p. 516–542, ISSN 1040-8444. 42
- RICHARD, S., N. PRÉVOT-D'ALVISE, R. BUNET, R. SIMIDE, S. COUVRAY, S. COUPÉ et J. P. GRILLASCA. 2014, «Effect of a glyphosate-based herbicide on gene expressions of the cytokines interleukin-1 β and interleukin-10 and of heme oxygenase-1 in european sea bass, *dicentrarchus labrax L.*», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 92, n° 3, doi: [10.1007/s00128-013-1180-7](https://doi.org/10.1007/s00128-013-1180-7), p. 294–299. 43
- ROCHA, T. L., A. P. SANTOS, Á. YAMADA, C. M. SOARES, C. L. BORGES, A. M. BAILÃO et S. M. SABÓIA-MORAIS. 2015, «Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 40, n° 1, doi: [10.1016/j.etap.2015.04.016](https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016), p. 175–186, ISSN 1382-6689. 45
- ROY, N. M., B. CARNEIRO et J. OCHS. 2016a, «Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 42, doi: [10.1016/j.etap.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.003), p. 45–54, ISSN 1382-6689. 39
- ROY, N. M., J. OCHS, E. ZAMBRZYCKA et A. ANDERSON. 2016b, «Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 46, doi: [10.1016/j.etap.2016.08.010](https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.08.010), p. 292–300, ISSN 1382-6689. 39
- RUBIN, J. L., C. G. GAINES et R. A. JENSEN. 1984, «Glyphosate Inhibition of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase from Suspension-Cultured Cells of *Nicotiana glauca*», *Plant Physiology*, vol. 75, n° 3, doi: [10.1104/pp.75.3.839](https://doi.org/10.1104/pp.75.3.839), p. 839–845, ISSN 00320889, 15322548. 49
- SALBEGO, J., A. PRETTO, C. R. GIODA, C. C. DE MENEZES, R. LAZZARI, J. R. NETO, B. BALDISSEROTTO et V. L. LORO. 2010, «Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*)», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 58, n° 3, doi: [10.1007/s00244-009-9464-y](https://doi.org/10.1007/s00244-009-9464-y), p. 740–745, ISSN 0090-4341. 35, 43, 45

- SAMANTA, P., S. PAL, A. K. MUKHERJEE, T. SENAPATI, J. JUNG et A. R. GHOSH. 2018, «Assessment of adverse impacts of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 by integrating multi-level biomarker responses in fishes», *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 16, n° 10, doi: [10.1007/s13762-018-2013-3](https://doi.org/10.1007/s13762-018-2013-3), p. 6291–6300, ISSN 1735-1472. 43, 45
- SÁNCHEZ, J. A. A., A. S. VARELA, C. D. CORCINI, J. C. DA SILVA, E. G. PRIMEL, S. CALDAS, R. D. KLEIN et C. D. M. G. MARTINS. 2017, «Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*», *Chemosphere*, vol. 177, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.02.147](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.147), p. 200–210, ISSN 0045-6535. 36, 37, 47
- SCHONBRUNN, E., S. ESCHENBURG, W. A. SHUTTLEWORTH, J. V. SCHLOSS, N. AMRHEIN, J. N. S. EVANS et W. KABSCH. 2001, «Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, n° 4, doi: [10.1073/pnas.98.4.1376](https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376), p. 1376–1380, ISSN 0027-8424. 49
- SEGNER, H. 2011, *Reproductive and developmental toxicity in fishes*, chap. 86, San Diego, ISBN 978-0-12-382032-7, p. 1145–1166, doi: [10.1016/b978-0-12-382032-7.10086-4](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382032-7.10086-4). 36
- SELVARANI, A. J., P. PADMAVATHY, A. SRINIVASAN, G. SUGUMAR, P. JAWAHAR et D. MANIMEKALAI. 2019, «Acute Toxicity of Glyphosate Herbicide on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)», *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 8, n° 10, doi: [10.20546/ijcmas.2019.810.007](https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.810.007), p. 61–68, ISSN 2319-7692. 34
- SINHORIN, V. D. G., A. P. SINHORIN, J. M. DOS SANTOS TEIXEIRA, K. M. L. MILÉSKI, P. C. HANSEN, P. S. A. MOREIRA, N. H. KAWASHITA, A. M. BAVIERA et V. L. LORO. 2014, «Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp.*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 106, doi: [10.1016/j.ecoenv.2014.04.040](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.040), p. 181–187, ISSN 0147-6513. 41, 47
- SKINNER, M. K. 2008, «What is an epigenetic transgenerational phenotype?», *Reproductive Toxicology*, vol. 25, n° 1, doi: [10.1016/j.reprotox.2007.09.001](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001), p. 2–6, ISSN 0890-6238. 54
- SLANINOVA, A., M. SMUTNA, H. MODRA et Z. SVOBODOVA. 2009, «A review: oxidative stress in fish induced by pesticides.», *Neuro endocrinology letters*, vol. 30 Suppl 1, p. 2–12, ISSN 0172-780X (Print). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20027135/>. 47
- SMITH, C. M., M. K. VERA et R. K. BHANDARI. 2019, «Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)», *Aquatic Toxicology*, vol. 210, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005), p. 215–226, ISSN 0166-445X. 36, 52, 56
- SOBJAK, T. M., S. ROMÃO, C. Z. DO NASCIMENTO, A. F. P. DOS SANTOS, L. VOGEL et A. T. B. GUIMARÃES. 2017, «Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish», *Chemosphere*, vol. 182, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.05.031](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.031), p. 267–275, ISSN 0045-6535. 47

- SOKOLOVA, I. M. 2013, «Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors», *Integrative and Comparative Biology*, vol. 53, n° 4, doi: [10.1093/icb/ict028](https://doi.org/10.1093/icb/ict028), p. 597–608, ISSN 1540-7063. 45
- SOSO, A. B., L. J. G. BARCELLOS, M. J. RANZANI-PAIVA, L. C. KREUTZ, R. M. QUEVEDO, D. ANZILIERO, M. LIMA, L. B. DA SILVA, F. RITTER, A. C. BEDIN et J. A. FINCO. 2007, «Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*)», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 23, n° 3, doi: [10.1016/j.etap.2006.11.008](https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.008), p. 308–313, ISSN 1382-6689. 36, 45
- STENZ, L., D. S. SCHECHTER, S. R. SERPA et A. PAOLONI-GIACOBINO. 2018, «Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress», *Current Genomics*, vol. 19, n° 8, doi: [10.2174/1389202919666171229145656](https://doi.org/10.2174/1389202919666171229145656), p. 665–675, ISSN 1389-2029. 54
- SULUKAN, E., M. KÖKTÜRK, H. CEYLAN, Ş. BEYDEMİR, M. IŞIK, M. ATAMANALP et S. B. CEYHUN. 2017, «An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)», *Chemosphere*, vol. 180, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.04.018](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018), p. 77–85, ISSN 0045-6535. 34, 38, 51
- SZÉKÁCS, A. et B. DARVAS. 2018, «Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union», *Frontiers in Environmental Science*, vol. 6, doi: [10.3389/fenvs.2018.00078](https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078), p. 78, ISSN 2296-665X. 29
- TOPAL, A., M. ATAMANALP, A. UÇAR, E. ORUÇ, E. M. KOCAMAN, E. SULUKAN, F. AKDEMİR, Ş. BEYDEMİR, N. KILINÇ, O. ERDOĞAN et S. B. CEYHUN. 2015, «Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) : transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 111, doi: [10.1016/j.ecoenv.2014.09.027](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027), p. 206–214, ISSN 0147-6513. 46, 47, 48
- TORRETTA, V., I. KATSOYIANNIS, P. VIOTTI et E. RADA. 2018, «Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain», *Sustainability*, vol. 10, n° 4, doi: [10.3390/su10040950](https://doi.org/10.3390/su10040950), p. 950, ISSN 2071-1050. 29
- TUSH, D., M. M. MAKSIMOWICZ et M. T. MEYER. 2018, «Dissipation of polyoxyethylene tallow amine (POEA) and glyphosate in an agricultural field and their co-occurrence on streambed sediments», *Science of the Total Environment*, vol. 636, doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.04.246](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.246), p. 212–219, ISSN 0048-9697. 33
- UJOWUNDU, C., D. KOLOSEKE, N. UBA, J. ACHILIKE, H. OGBUAGU et E. UBUOH. 2017, «Ecotoxicological Impact of Sub-lethal Concentrations of Glyphosate-based Herbicide on Juvenile *Clarias gariepinus*», *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, vol. 22, n° 11, doi: [10.9734/jammr/2017/34374](https://doi.org/10.9734/jammr/2017/34374), p. 1–14, ISSN 2456-8899. 47

- VANDENBERG, L. N., B. BLUMBERG, M. N. ANTONIOU, C. M. BENBROOK, L. CARROLL, T. COLBORN, L. G. EVERETT, M. HANSEN, P. J. LANDRIGAN, B. P. LANPHEAR, R. MESNAGE, F. S. VOM SAAL, W. V. WELSHONS et J. P. MYERS. 2017, «Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides?», *Journal of Epidemiology and Community Health*, vol. 71, n° 6, doi: [10.1136/jech-2016-208463](https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463), p. 613–618, ISSN 0143-005X. 52
- VITALE, A., J. MONSERRAT, P. CASTILHO et E. RODRIGUEZ. 1999, «Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 122, n° 1, doi: [10.1016/s0742-8413\(98\)10094-4](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(98)10094-4), p. 121–129, ISSN 0742-8413. 51
- WAN, M. T., R. G. WATTS et D. J. MOUL. 1989, «Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 43, n° 3, doi: [10.1007/bf01701872](https://doi.org/10.1007/bf01701872), p. 378–385, ISSN 0007-4861. 34
- WANG, N., J. M. BESSER, D. R. BUCKLER, J. L. HONEGGER, C. G. INGERSOLL, B. JOHNSON, M. L. KURTZWEIL, J. MACGREGOR et M. J. MCKEE. 2005, «Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms», *Chemosphere*, vol. 59, n° 4, doi: [10.1016/j.chemosphere.2004.12.009](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.009), p. 545–551, ISSN 0045-6535. 33
- WANG, W., Q. LIU, T. ZHANG, L. CHEN, S. LI et S. XU. 2020, «Glyphosate induces lymphocyte cell dysfunction and apoptosis via regulation of miR-203 targeting of PIK3R1 in common carp (*Cyprinus carpio* L.)», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 101, doi: [10.1016/j.fsi.2020.03.047](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.047), p. 51–57, ISSN 1050-4648. 42
- WEBSTER, T. M. U., L. V. LAING, H. FLORANCE et E. M. SANTOS. 2014, «Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*)», *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 2, doi: [10.1021/es404258h](https://doi.org/10.1021/es404258h), p. 1271–1279, ISSN 0013-936X. 56
- WEBSTER, T. M. U. et E. M. SANTOS. 2015, «Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup», *BMC Genomics*, vol. 16, n° 1, doi: [10.1186/s12864-015-1254-5](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5), p. 32, ISSN 1471-2164. 42, 43, 45
- WEEKS SANTOS, S., B. CORMIER, N. MAZZELLA, B. BONNAUD, S. MORIN, C. CLÉRANDEAU, B. MORIN et J. CACHOT. 2019, «A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*», *Aquatic Toxicology*, vol. 216, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.105291](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291), p. 105 291, ISSN 0166-445X. 39, 41

- WHEELER, J. R., S. K. MAYNARD et M. CRANE. 2014, «An evaluation of fish early life stage tests for predicting reproductive and longer-term toxicity from plant protection product active substances», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 33, n° 8, doi: [10.1002/etc.2630](https://doi.org/10.1002/etc.2630), p. 1874–1878, ISSN 0730-7268. 38
- ZEBRAL, Y. D., P. G. COSTA, B. DE CASTRO KNOPP, L. R. LANSINI, B. ZAFALON-SILVA, A. BIANCHINI et R. B. ROBALDO. 2017, «Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development», *Chemosphere*, vol. 185, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.07.069](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.069), p. 860–867, ISSN 0045-6535. 39
- ZEBRAL, Y. D., L. R. LANSINI, P. G. COSTA, M. ROZA, A. BIANCHINI et R. B. ROBALDO. 2018, «A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*», *Chemosphere*, vol. 196, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.12.196](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.196), p. 260–269, ISSN 0045-6535. 36, 38
- ZHANG, S., J. XU, X. KUANG, S. LI, X. LI, D. CHEN, X. ZHAO et X. FENG. 2017, «Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*)», *Chemosphere*, vol. 181, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.04.094](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.094), p. 270–280, ISSN 0045-6535. 34, 38, 39, 40

*CHAPITRE 1. EFFETS DU GLYPHOSATE ET DES HERBICIDES À BASE DE GLYPHOSATE (GBHS)
SUR LA SANTÉ DES POISSONS : UNE REVUE BIBLIOGRAPHIQUE AVEC UN FOCUS PARTICULIER
SUR L'IMPACT DE FAIBLES DOSES ENVIRONNEMENTALES*

Chapitre 2

Méthodologie générale de la thèse GlyphoTAC

*« Pour examiner la vérité, il est
besoin, une fois dans sa vie, de
mettre toutes choses en doute
autant qu'il se peut. »*

René Descartes

Sommaire

2.1 Objectifs du chapitre	79
2.2 Choix du modèle biologique	79
2.3 Choix des composés chimiques	80
2.3.1 Glyphosate	80
2.3.2 Herbicides à base de glyphosate (GBHs)	80
2.4 Expérimentations animales	82
2.4.1 Conditions d'hébergement des animaux	82
2.4.2 Protocoles de reproduction	82
2.4.3 Réglementation et aspects éthiques	82
2.4.4 Frise chronologique et description des différents lots de poissons étudiés	83
2.4.5 Contaminations chimiques	86
2.4.6 Épreuves virales expérimentales	93
2.4.7 Prélèvements réalisés sur les poissons	95
2.5 Paramètres biologiques analysés	95
2.5.1 Taux de fertilité, d'éclosion et survie des oeufs	97
2.5.2 Paramètres biométriques et étude des malformations	97
2.5.3 Analyse du comportement natatoire des larves	98
2.5.4 Analyse de l'immunité	98

2.5.5	Biomarqueurs, l'anhydrase carbonique (CA) et l'acétylcholinestérase (AChE)	100
2.5.6	Stress oxydant	102
2.5.7	Paramètres métaboliques	103
2.6	Développements méthodologiques de dosages enzymatiques	104
2.6.1	Méthodes de calcul	105
2.6.2	Validation des dosages spectrophotométriques	105

2.1 Objectifs du chapitre

Afin de répondre aux objectifs du projet GlyphoTAC, un design expérimental complexe a été mis au point intégrant plusieurs essais sur différentes générations F0 à F2 de truites arc-en-ciel. Les expositions chimiques *in vivo*, aiguës et chroniques, ainsi que les protocoles de reproduction des différentes générations constituent des éléments clés de la compréhension des études du projet et sont détaillés au début de ce chapitre. La temporalité des différents prélèvements non invasifs et invasifs réalisés sur les différentes générations de truites y est également précisée. Enfin, plusieurs épreuves d'infections virales expérimentales menées au cours du développement des différentes générations sont également présentées. En association à ce volet d'expérimentation animale, le projet GlyphoTAC comportait une importante partie analytique qui visait à mesurer de nombreux paramètres chimiques et biologiques. Les analyses chimiques ont validé le design expérimental de contamination *in vivo*. Les dosages biologiques, réalisés à différents niveaux d'organisation, ont permis de caractériser au mieux les effets toxiques potentiels de la contamination chimique sur la santé des truites. Les détails de ces techniques analytiques sont présentés dans une section ultérieure de ce chapitre méthodologique.

2.2 Choix du modèle biologique

La truite arc-en-ciel (Figure 2.1) est un poisson téléostéen appartenant à la famille des Salmonidés. Cette espèce est un standard mondial pour l'étude de la toxicologie aquatique, car ses conditions d'élevage sont parfaitement maîtrisées, une large base de données concernant la réponse des TACs à différentes substances chimiques est disponible et enfin les études de toxicité concernant cette espèce ont montré sa sensibilité face aux contaminants aquatiques [ENVIRONMENTAL PROTECTION SERIES, 1990]. Pour l'ensemble de ces raisons, cette espèce est recommandée pour réaliser les tests de toxicité *in vivo* [OECD, 2019]. La TAC représente un matériel biologique de qualité et permet une approche couvrant différents niveaux d'intégration biologique. L'unité Pathologie Virale des Poissons de l'Anses dispose au niveau de ses installations expérimentales d'un élevage de TACs exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS), dont elle assure la reproduction de manière annuelle.



FIGURE 2.1 – Photo d'une truite arc-en-ciel adulte (*Oncorhynchus mykiss*), ©Wilfried Kopetzky.

2.3 Choix des composés chimiques

2.3.1 Glyphosate

Le glyphosate (Figure 2.2a) est la molécule la plus utilisée comme pesticide dans le monde. Son usage a considérablement augmenté durant la dernière décennie (passant d'un usage global toute utilisation confondue de 56 296 tonnes en 1994 à 825 804 en 2014 [BROOKES et collab., 2017]). Ce principe actif est employé pour traiter des cultures, et notamment des cultures génétiquement modifiées résistantes à cette molécule, permettant ainsi de limiter l'implantation de mauvaises herbes et d'augmenter par voie de conséquence la productivité agricole [BENBROOK, 2016]. Une large polémique, à la fois scientifique et sociétale, existe concernant la toxicité du glyphosate [MESNAGE et ANTONIOU, 2017; VAN STRAALEN et LEGLER, 2018] pour l'homme et l'environnement et alimente des débats, à forts enjeux économiques et écologiques, sur son interdiction [BROOKES et collab., 2017].

Le glyphosate qui a été utilisé au cours de ce projet est le produit "PESTANAL[®]", analytical standard" du fournisseur Sigma-Aldrich (ref. 45,521, CAS Number 1071-83-6). Sa formule linéaire est $(\text{HO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Une prédilution de la poudre commerciale a été réalisée dans 10 ml de méthanol pour 1 L de solution (c.-à-d. une dilution au 4 000 000e au final dans le bac de contamination des poissons).

2.3.2 Herbicides à base de glyphosate (GBHs)

Le glyphosate, sous ses formulations commerciales, est associé à des substances qui permettent d'améliorer son pouvoir herbicide (p. ex. augmentation de l'absorption et de la translocation de la substance active dans la plante). Des co-formulants de type amine grasse éthoxylée (POEA) sont fréquemment présents dans les GBHs, mais d'autres composés chimiques sont aussi retrouvés comme l'alkylpolyglycoside et le nitroaryl [MESNAGE et collab., 2019]. [PALMA-BAUTISTA et collab., 2020]. Des études ont démontré que les substances adjuvantes présentes dans les GBHs ont parfois une toxicité

supérieure à celle de la SA seule. La DL_{50} du glyphosate sur *Oncorhynchus mykiss* a, par exemple, été évaluée à 140 mgL^{-1} alors que celle d'un surfactant de type amine grasse de suif éthoxylée contenu dans un GBH était de $2,1 \text{ mgL}^{-1}$ (voir un exemple avec le rapport de FOLMAR et collab. [1979]).

Afin de mieux caractériser les effets associés à une contamination simple (c.-à-d. la SA seule) versus une contamination complexe (c.-à-d. les GBHs), le projet GlyphoTAC a étudié l'écotoxicité de la substance active seule, mais également de deux GBHs. Ceux-ci sont formulés avec différentes concentrations de glyphosate, unique substance active présente, associée potentiellement à différents adjuvants dont la nature et les quantités sont confidentielles. Il s'agit du Roundup Innovert[®], formulé pour un usage dans le secteur agricole et du Viaglif Jardin[®], formulé pour un usage dans les jardins de particuliers (Figure 2.2b). Le Roundup Innovert, commercialisé par la société MONSANTO S.A.S. (numéro d'Autorisation de Mise sur le Marché - AMM - n° 2120036), contient 480 gL^{-1} de glyphosate. En traitements généraux de désherbage avant mise en culture, les doses recommandées varient de 3.75 à 6 L/ha en fonction du désherbage souhaité et du stade de la culture (<https://ephy.anses.fr/ppp/roundup-innovert> et <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/spe/2120035-10023565.htm>). Le Viaglif Jardin, produit par la société TRADI AGRI SA (n° d'AMM 2120008), est formulé à 360 gL^{-1} de glyphosate. Les doses d'utilisation varient de 3 à 8 L/ha en fonction du désherbage souhaité et du stade de la culture (<https://ephy.anses.fr/ppp/viaglif-jardin> et <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/spe/2120008-10024340.htm>). Ces deux produits ont été interdits d'usage en France le 29/11/2019 pour le Roundup Innovert et le 15/12/2018 pour le Viaglif Jardin.

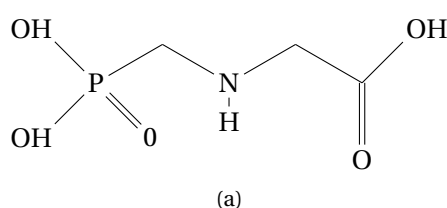


FIGURE 2.2 – Formule chimique du glyphosate (2.2a) et photo des deux GBHs retenus pour le projet GlyphoTAC (2.2b), ©Estelle Vigouroux.

2.4 Expérimentations animales

2.4.1 Conditions d'hébergement des animaux

Les truites ont été maintenues dans des bassins de différentes tailles (400, 50 ou 10 L), selon la nature des procédures réalisées, et en limitant la densité à un maximum de 20 kg/m³. Les bassins, positionnés dans des salles ventilées avec un rythme jour/nuit naturel, ont été alimentés en eau de rivière décantée puis filtrée (filtre à sable), avec ou sans régulation thermique, selon les procédures appliquées. Sauf pour certaines opérations, le circuit d'eau était ouvert, avec un débit d'eau continu. Un apport d'air comprimé a été assuré pour maintenir une saturation supérieure à 60%. Les animaux ont été nourris quotidiennement avec de l'aliment spécifique pour les truites (Le Gouessant), avec une granulométrie fonction de leurs tailles et une proportion variant entre 1 et 3% de leurs poids moyens. Durant toute la durée des essais, les poissons en expérimentation ont été surveillés quotidiennement. Alors que les effluents contaminés avec la SA ou les GBHs ont été traités sur charbon actif, les eaux infectées par du virus ont été traitées à l'ozone avant leur rejet.

2.4.2 Protocoles de reproduction

La période de ponte chez les géniteurs de truites élevés au sein du laboratoire se situe aux alentours de la mi-novembre. La maturité sexuelle des truites a été testée chaque semaine à partir de début novembre afin de déterminer le moment où le nombre d'individus prêts à se reproduire était le plus important. L'évaluation du niveau de maturité puis la reproduction ont été effectuées par "strippage" (c.-à-d. action consistant à exercer une pression sur l'abdomen des truites pour libérer les gamètes) après anesthésie avec une dose de 2% d'eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol). Après la récolte des gamètes mâles et femelles dans des contenants spécifiques à chaque individu, le sperme des mâles d'une même condition a été mélangé et utilisé pour fertiliser les ovules de chacune des femelles de la condition correspondante. Les oeufs ont ensuite été incubés dans des auges de ponte, alimentées à un courant ascendant d'eau de rivière. Au stade oeillé (c.-à-d. lorsque l'oeil est visible au travers du chorion), les oeufs ont été déplacés dans des bacs de 40 L et le nourrissage quotidien (1 à 3 repas) a débuté une fois le stade de larve nageante atteint. La température durant le développement embryonnaire a été maintenue entre 8 °C et 10 °C. Le développement embryonnaire a été réalisé dans des enceintes contenant environ 300 L d'eau, constamment renouvelée avec un flux d'eau de rivière filtrée (approximativement 300 Lh⁻¹). La saturation en oxygène a été maintenue à un niveau supérieur à 60% à l'aide de bulleurs alimentés par de l'air comprimé.

2.4.3 Réglementation et aspects éthiques

Pour assurer la conception et la réalisation des expérimentations animales dans le respect de la réglementation en vigueur et du bien-être des animaux (Directive européenne 2010/63), l'ensemble du personnel impliqué dans les essais menés dans le cadre de ce travail de thèse a reçu une formation initiale à l'expérimentation animale (niveau 1 - conception ou niveau 2 - réalisation), enrichie par une formation continue régulière. Les infrastructures du laboratoire sont agréées par la Préfecture du

Finistère pour l'expérimentation animale sur poissons sous le numéro E-29-212-03. L'ensemble des procédures correspondant aux expérimentations réalisées au cours du projet ont été soumises pour avis au comité d'éthique n° 16 associant des experts de l'Anses, de l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort et de l'Université Pierre et Marie Curie, au travers de 4 saisines : 1. 17-063, 2. 18-009, 3. 19-003, et 4. 20-001, avant d'être autorisées par le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Deux classes de sévérité pour les animaux étaient intégrées dans ces différentes saisines :

1. Contamination chimique chronique des géniteurs et des générations F1 et F2 ainsi que contamination chimique aiguë de la génération F0 : en classe modérée.
2. Épreuves virales sur les générations F1 et F2 : en classe sévère.

À noter que chaque essai a donné lieu à une analyse rétrospective.

2.4.4 Frise chronologique et description des différents lots de poissons étudiés

La figure 2.3 présente la chronologie des essais expérimentaux du projet GlyphoTAC— c.-à-d. les contaminations chimiques aiguës et chroniques, les épreuves infectieuses et les dates de prélèvements associées.

F0_2014

Deux lots de TACs nées en 2014 ont été soumis à des expérimentations distinctes. Un premier lot de poisson, composé de 48 individus (8 femelles et 4 mâles pour chaque condition testée) âgés de 3 ans, a été contaminé chimiquement pendant 9 jours durant la phase de reproduction à l'hiver 2017 et a permis d'obtenir la génération F1_2017. En mars 2018, un deuxième lot composé à nouveau de 48 individus (8 femelles et 4 mâles pour chaque condition testée) de TACs F0_2014 a été exposé aux contaminants chimiques durant 8 mois avant d'engendrer la génération F1_2018. Sur ce deuxième lot, 4 prélèvements ont été réalisés. Les prélèvements S1, S2 et S3 (représentés sur la Figure 2.3) étaient des prélèvements non invasifs de sang effectués pendant la période de maturation des gonades et pendant la reproduction. Le prélèvement S4 était un prélèvement invasif d'organes cibles réalisé après la reproduction des TACs.

F0_2018

Un lot de 420 TACs, issues de l'élevage sain de l'Anses et nées en novembre 2018, a été exposé à une contamination chimique aiguë, suivie d'une épreuve infectieuse au *vNHI*. Des prélèvements invasifs ont été réalisés après la contamination chimique et l'infection virale.

F1_2017

La génération F1_2017, engendrée en novembre 2017 par le premier lot de la génération F0_2014, a été maintenue pendant deux ans. En novembre 2019, 46 individus sexuellement matures (26 femelles et 40 mâles) de cette génération ont été strippés pour créer la génération F2_2019. Aucune analyse n'a été réalisée sur ce lot de poisson au cours de ce projet.

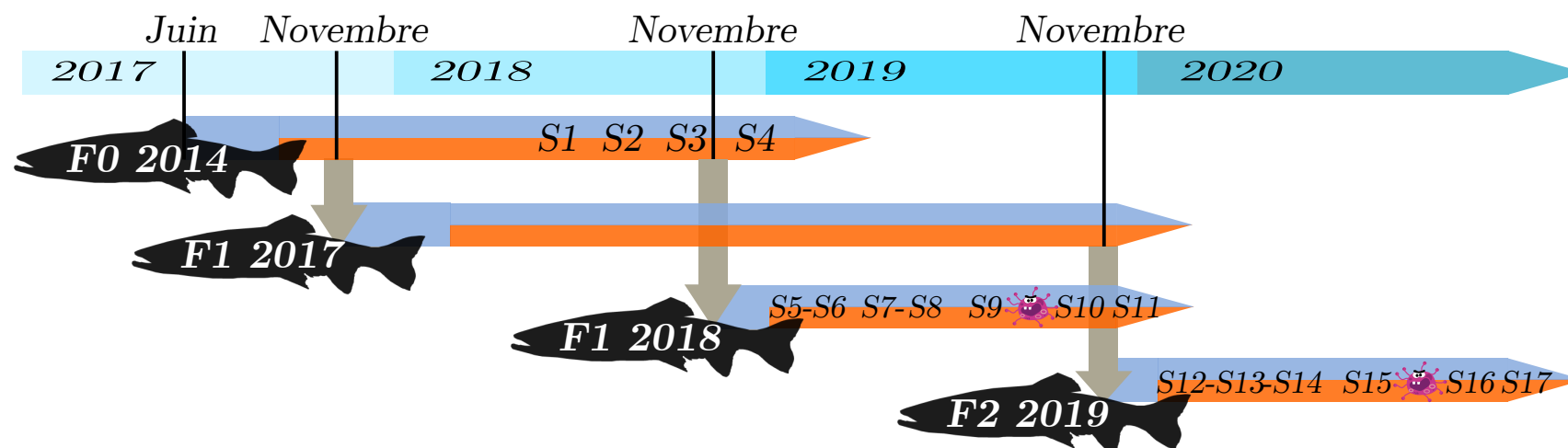
F1_2018

La génération F1_2018, engendrée en novembre 2018 par le deuxième lot de la génération F0_2014, a été maintenue et analysée courant 2019. Des prélèvements invasifs ont été effectués aux stades larvaires afin de réaliser les analyses biométriques (prélèvements S5 et S6) ainsi que pour effectuer l'analyse des paramètres biochimiques (prélèvement S7) et celle du comportement (prélèvement S8). D'autres prélèvements invasifs ont été effectués chez les truites juvéniles pour permettre l'analyse des paramètres hématologiques et biochimiques avant l'infection virale (prélèvement S9) ainsi que les analyses hématoimmunologiques à 96 hpi (prélèvement S10) et à 6 spi (prélèvement S11). L'épreuve d'infection virale réalisée avec le virus *vNHI* est indiquée sur la Figure 2.3 à l'aide d'un symbole de virus. Au total 5 946 poissons de la génération F1_2018 ont été utilisés pour les différentes expérimentations. Cette génération n'a pas été reproduite dans ce projet et a été mise à mort à la fin de l'infection expérimentale.

F2_2019

La génération F2_2019, issue de la F1_2017, a été obtenue en novembre 2019 et analysée courant 2020. Des prélèvements invasifs ont été effectués aux stades larvaires afin de réaliser les mesures biométriques (prélèvement S12) ainsi que l'analyse des paramètres biochimiques (prélèvement S3) et celle du comportement (prélèvement S14). Les juvéniles ont été prélevées de manière invasive afin de permettre l'analyse de séquençage *ARN (RNAseq)* ainsi que celle des paramètres hématologiques et biochimiques avant l'infection virale (prélèvement S15). D'autres prélèvements du même type ont été réalisés après l'infection virale (réalisée avec le virus *vNHI* est indiquée sur la Figure 2.3 à l'aide d'un symbole de virus) afin de permettre l'analyse *RNAseq* et celle des paramètres hématologiques à 96 hpi (prélèvement S16). Un dernier prélèvement invasif des truites juvénile a été effectué à 6 spi pour permettre les analyses immunologiques (prélèvement S17). Au total 6 853 poissons auront permis l'étude de la génération F2. Cette génération n'a pas été reproduite dans ce projet et a été mise à mort à la fin de l'infection expérimentale.

FIGURE 2.3 – Frise chronologique représentant le détail des expérimentations effectuées sur les différentes générations du projet GlyphoTAC. Les périodes de contaminations chroniques au glyphosate seul ou co-formulé sont indiquées par des flèches horizontales de couleurs (le rouge et le bleu correspondent, respectivement, à des périodes avec et sans contamination chimique). Les pontes sont indiquées par une flèche verticale grise, tandis que les dates de prélèvements sont marquées par la lettre "S" suivie du numéro de prélèvement. Enfin, les épreuves infectieuses expérimentales sont repérées à l'aide d'un symbole représentant un virus.



2.4.5 Contaminations chimiques

Le choix du mode de contamination a été fait en intégrant à la fois la pertinence écologique de l'étude et la faisabilité pratique. Dans le milieu aquatique, les poissons sont contaminés de façon chronique avec, éventuellement, une intensité qui peut varier en fonction des conditions météorologiques (p. ex. lessivage des sols) et saisonnières (p. ex. activité agricole). Un autre paramètre à prendre en considération dans le milieu naturel est le caractère multigénérationnel de la contamination chimique. En effet, le glyphosate est répandu massivement depuis plusieurs décennies et les nouvelles générations de poissons sont issues de géniteurs qui ont eux-mêmes été soumis à une contamination chronique. Pour intégrer ces éléments, la contamination a été réalisée de manière chronique et multigénérationnelle (c.-à-d. sur deux générations) par l'intermédiaire de l'eau. Pour des raisons pratiques, compte tenu de la longueur de la période de contamination (c.-à-d. trois ans environ) et de la quantité d'eau à contaminer (c.-à-d. environ 500 Lh^{-1}), une contamination par pics a été privilégiée. Chaque jour ouvré, les bacs ont été contaminés à $1 \mu\text{gL}^{-1}$ pendant 1 h en milieu fermé (sans circulation d'eau), puis le circuit a été réouvert, avec un débit calibré en fonction du volume du bac. Une dilution progressive des composés chimiques dans les bacs en circuit ouvert a ainsi pu être obtenue sur la journée. Le modèle mathématique, dont l'équation 2.1, a permis de tracer la courbe de dilution présentée dans la Figure 2.4 et de calculer la concentration moyenne journalière (intégrée sur 24 h, zone correspondant à l'aire en bleu sous la courbe de la Figure 2.4) qui est de 123 ngL^{-1} . Le choix de la dose d'exposition en glyphosate a été dicté par les concentrations retrouvées dans les cours d'eau bretons, qui se situent globalement entre 0.1 et $1 \mu\text{gL}^{-1}$ (données du réseau OSUR entre 2009 et 2017). La concentration au moment du pic de contamination (c.-à-d. $1 \mu\text{gL}^{-1}$), comme celle intégrée sur la journée (c.-à-d. 123 ngL^{-1}), est considérée comme sublétales puisqu'elles sont environ 10 000 à 100 000 fois inférieures, respectivement, à la valeur de la plus forte concentration n'induisant aucun effet observable (NOEC liée à la croissance de $9,6 \text{ mgL}^{-1}$) pour la truite arc-en-ciel adulte, en exposition chronique [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015]. Enfin, un lot de truites de génération F0 à subir une exposition aiguë à une dose de glyphosate de $500 \mu\text{gL}^{-1}$.

$$C(t) = C_{initiale} \times e^{\frac{-\text{débit}}{V_{bac} \times \text{temps}}} \quad (2.1)$$

Description de la procédure de contamination chimique

Cas de l'exposition chronique Dans un premier temps, plusieurs solutions contaminées ont été réalisées pour chacun des contaminants, selon le tableau 2.1. Puis 100 mL de solution à $0,04 \text{ gL}^{-1}$ de substance active ont été déversés dans les bacs de 400 L (soit 10 mL pour les bacs de 40 L) en circuit fermé pour débiter la première phase de contact journalier durant 1 h à la concentration de $1 \mu\text{gL}^{-1}$.

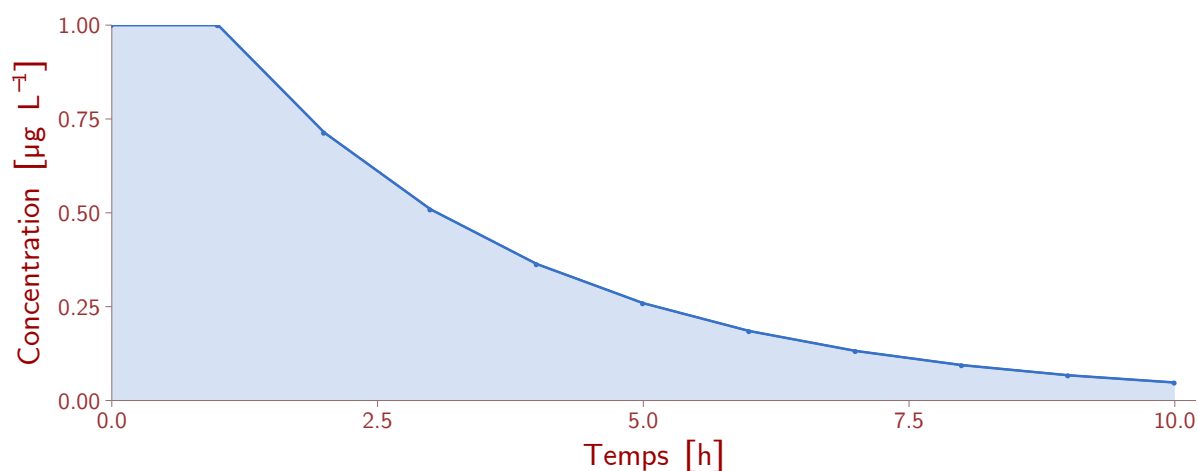


FIGURE 2.4 – Cinétique de dilution théorique de la concentration en glyphosate dans les bacs contaminés.

TABLEAU 2.1 – Présentation des différentes solutions mère et filles pour réaliser la contamination chronique.

	Substance active	Roundup	Viaglif
$C_{m\grave{e}re}$ (g L^{-1})	-	480	360
$C_{fille:1}$ (g L^{-1})	0,4	0,432	0,396
$C_{fille:2}$ (g L^{-1})	0,04	0,04	0,04

N. B. toutes les dilutions ont été réalisées en fiole jaugée de 1 L à l'exception de la dissolution du glyphosate en poudre qui a été réalisé dans un volume de 0,5 L.

Cas de l'exposition aiguë L'exposition chimique a été réalisée selon un mode dit "semi-statique". L'ajout d'un volume de 100 mL de solution de contamination à $0,2 \text{ g L}^{-1}$ (préparée avec les mêmes solutions intermédiaires, $C_{fille:1}$, que celles décrites dans le tableau 2.1) permettait un équilibrage de la concentration dans le bac à $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Aucune arrivée d'eau n'était réalisée pendant 24 h. L'eau des bacs et la contamination chimique étaient renouvelées une fois toutes les 24 h.

Exposition chimique directe des truites F0

Les truites de génération F0 ont été contaminées chimiquement selon deux modes d'exposition : aiguë ou chronique. Lors de ces expositions, 4 conditions de contamination chimique ont été créées (2.5) :

- une condition contrôle (C), exposée à aucun contaminant;
- une condition glyphosate (G), exposée à la substance active pure;
- deux conditions exposées aux GBHs, le Roundup InnovertTM (R) et le Viaglif jardinTM (V) respectivement.

Exposition chimique des truites F1

La génération F1 a été à son tour exposée aux mêmes conditions que les individus parents, générant ainsi 10 nouvelles conditions. Ces 10 conditions d'exposition ont été identifiées comme suit :

- à gauche du signe "/", l'exposition intergénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F0) ;
- à droite du signe "/", l'exposition directe (c.-à-d. celle de la génération F1).

Une condition identifiée "G/G" correspondra, par exemple, à des poissons contaminés par le glyphosate à la fois au travers de leurs parents, mais également directement (voir la figure 2.6 pour une explication graphique).

Exposition chimique des truites F2

Pour la génération F2, seules les conditions d'exposition multigénérationnelle de la génération F1 ont été exposées aux mêmes conditions que les individus parents. Ainsi, 10 conditions d'exposition ont été créées et ont été identifiées comme suit :

- à gauche du premier signe "/" : l'exposition transgénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F0) ;
- entre les deux signes "/" : l'exposition intergénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F1) ;
- à droite du deuxième signe "/" : l'exposition directe (c.-à-d. celle de la génération F2).

Une condition identifiée "G/C/C" correspond, par exemple, à des poissons non exposés directement issus de poissons d'une génération F1 n'ayant également pas été exposés directement, issus eux-mêmes d'une génération F0 contaminée par le glyphosate (voir la figure 2.7 pour une explication graphique).

Contaminant/ Mode de contamination	Directe
Glyphosate	G
Roundup	R
Viaglif	V
Condition contrôle	C

FIGURE 2.5 – Schéma décrivant les 4 conditions de contamination des géniteurs F0 ("C" = Contrôle, "G" = Glyphosate, "R" = Roundup et "V" = Viaglif).

Contaminant/ Mode de contamination	Inter.	Directe	Mixte
Glyphosate	G/C	C/G	G/G
Roundup	R/C	C/R	R/R
Viaglif	V/C	C/V	V/V
Condition contrôle	C/C		

FIGURE 2.6 – Schéma décrivant les 10 combinaisons de contamination réalisées avec la génération F1. La lettre à gauche du signe "/" indique l'exposition intergénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F0) et celle à droite du signe "/" indique l'exposition directe (c.-à-d. celle de la génération F1) où "C" = Contrôle, "G" = Glyphosate, "R" = Roundup et "V" = Viaglif.

Contaminant/ Mode de contamination	Trans.	Inter.	Mixte
Glyphosate	G/C/C	C/G/C	G/G/G
Roundup	R/C/C	C/R/C	R/R/R
Viaglif	V/C/C	C/V/C	V/V/V
Condition contrôle		C/C/C	

FIGURE 2.7 – Schéma décrivant les 10 combinaisons d'expositions analysées sur la génération F2. La lettre à gauche du premier signe "/" informe sur l'exposition transgénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F0), celle entre les deux signes "/" indique l'exposition intergénérationnelle (c.-à-d. celle de la génération F1), et celle à droite du deuxième signe "/" indique l'exposition directe (c.-à-d. celle de la génération F2) où "C"= Contrôle, "G"= Glyphosate, "R"= Roundup et "V" = Viaglif.

Création des conditions de contamination en fonction des différentes générations de truites

La logique associée à la création des différentes conditions de contamination chimique en fonction des différentes générations de truites (c.-à-d. F0, F1 et F2) est représentée dans la figure 2.8. Les truites de la génération F1, issues du lot contrôle de la génération F0_2014, ont été divisées en 4 sous-lots exposés chacun selon les mêmes modalités que la génération F0, soit une exposition directe aux trois contaminants et une condition contrôle (C/G, C/R, C/V et C/C). Ces quatre lots ont engendré des truites de génération F2 qui n'ont pas été recontaminées, ce qui correspond à une exposition intergénérationnelle (C/G/C, C/R/C, C/V/C et C/C/C). Les truites de la génération F1 issues des conditions G, R et V (F0 2014) ont été séparées en deux lots, le premier étant recontaminé avec la substance chimique parentale (c.-à-d. mode d'exposition multigénérationnel; p. ex. G/G) et le deuxième n'étant pas recontaminé (c.-à-d. mode d'exposition intergénérationnel, p. ex. G/C). Le premier lot a engendré des truites de la génération F2 qui ont été contaminées avec la substance chimique parentale (c.-à-d. mode d'exposition multigénérationnel; p. ex. G/G/G). Le deuxième lot a engendré des truites de la génération F2 qui n'ont pas été contaminées avec la substance parentale (c.-à-d. mode d'exposition transgénérationnel, p. ex. G/C/C).

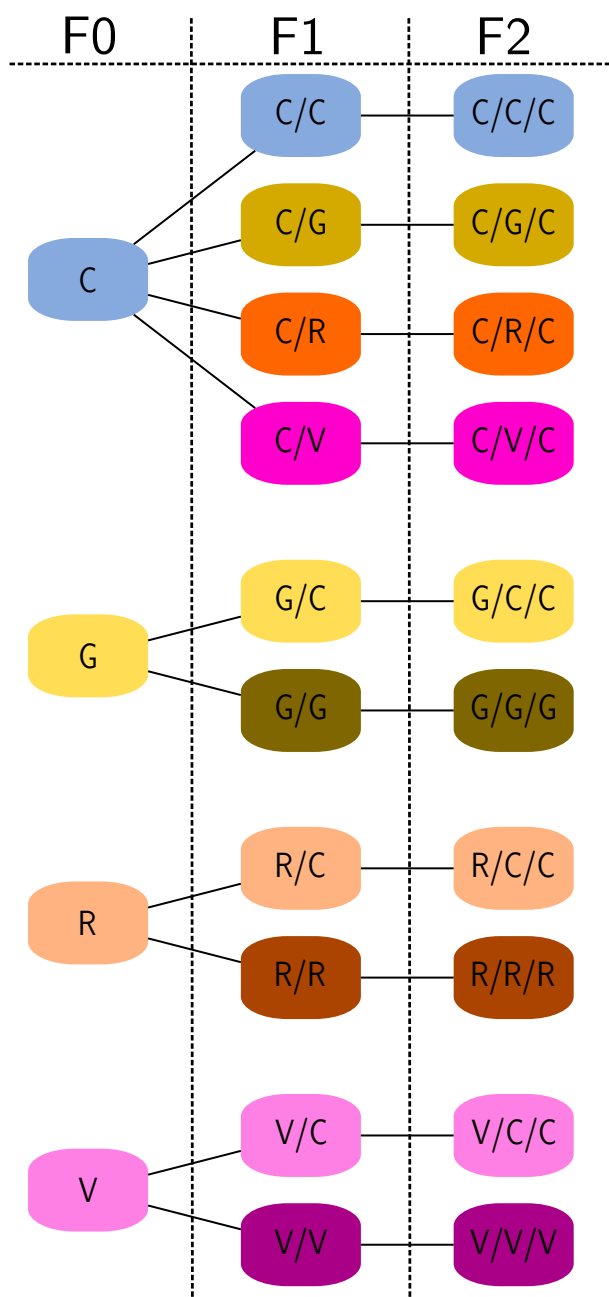


FIGURE 2.8 – Schéma résumant les 4 conditions de contamination des géniteurs F0 et les 10 combinaisons analysées sur les générations F1 et F2 ("C"= Contrôle, "G"= Glyphosate, "R"= Roundup et "V" = Viaglif).

Validation du protocole d'exposition par des analyses chimiques de l'eau

La concentration dissoute en glyphosate et AMPA dans l'eau des bassins contenant les poissons contaminés à la SA a été quantifiée à différents temps de la cinétique de dilution journalière (c.-à-d. avant la réouverture du circuit d'eau et 1, 2, et 3 h après la réouverture) par un prestataire externe, en utilisant une méthode de dosage HPLC/fluorimétrie (Labocea, France; Méthode réf. ANA-I10.MOA.69.B). Le glyphosate a aussi été dosé dans des bacs contenant les poissons exposés aux contaminants en utilisant une méthode de dosage ELISA, aux mêmes points de la cinétique de dilution que ceux cités précédemment. Le dosage ELISA a été réalisé à température ambiante (entre 20 et 25°C) via un kit commercial fourni par Novakits (ref. 1500086), en suivant le protocole détaillé par le fournisseur. Ce kit est basé sur une réaction de compétition pour l'accès aux sites de reconnaissance d'anticorps polyclonaux spécifiques entre le glyphosate potentiellement présent dans les échantillons et une solution calibrée conjuguée à une enzyme de révélation. L'eau de rivière à analyser a été filtrée à 0,2 µm, prétraitée grâce au réactif fourni dans le kit commercial puis les échantillons ont été transférés dans les puits coâtés avec des anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin d'une microplaque 96 puits. Une solution contenant des anticorps de lapin anti-glyphosate a alors été ajoutée durant 30 minutes. La réaction compétitive, qui a duré 1 heure, a été initiée par addition d'une solution de glyphosate conjugué avec l'enzyme de révélation. Après lavage, le substrat de l'enzyme a été ajouté et a généré une réaction colorée dont l'absorbance a pu être lue à 450 nm sur un spectrophotomètre TECAN Spark 10M. L'intensité de cette réaction est inversement proportionnelle à la concentration de glyphosate initialement présente dans l'échantillon. La quantification, par comparaison à une gamme étalon analysée en parallèle dans la même plaque que les échantillons, a permis de quantifier la concentration en glyphosate dans ces derniers.

2.4.6 Épreuves virales expérimentales

Les épreuves infectieuses expérimentales ont été réalisées sur des TACs juvéniles exposées en mode aigu ou chronique avec les différents contaminants étudiés, après une période plus ou moins longue d'exposition chimique et éventuellement de récupération (cf. la frise générale du projet où des symboles de virus indiquent les moments où les épreuves ont été effectuées; figure 2.3).

Pathogène utilisé

Les différentes épreuves virales ont été faites avec le rhabdovirus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI; Figure 2.9).

La nécrose hématopoïétique infectieuse est une maladie virale qui touche principalement les Salmonidés, induisant de la mortalité dans les élevages intensifs, mais également ponctuellement chez les poissons sauvages. Elle se propage de poisson à poisson par transfert horizontal [OIE], et ne présente aucun risque zoonotique pour l'homme. La mortalité est fonction de l'espèce de poisson, des conditions d'élevage, de la température et, dans une certaine mesure, de la souche virale [OIE]. Le



FIGURE 2.9 – Photo d'un Rhabdovirus (Source : L. Louboutin, Anses, France).

stade juvénile des poissons est le plus sensible à cette maladie qui s'exprime cliniquement à des températures égales ou inférieures à 14 °C. A ces températures et ce stade de vie, une mortalité comprise entre 25 et 75% est généralement attendue. Chez les poissons infectés, la maladie se caractérise par des signes macroscopiques qui incluent une léthargie entrecoupée d'épisodes d'activité anormale et frénétique, un assombrissement de la peau, des branchies pâles, une ascite (présence d'un liquide non sanglant dans la cavité abdominale), un abdomen distendu, une exophtalmie et des hémorragies pétéchiales internes et externes.

Production et titrage du virus

La souche de référence française du virus *vNHI*, N61 (genotype E), a été utilisée pour l'ensemble des infections virales du projet. Cette souche a été produite dans le laboratoire sur une monocouche de cellules *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) selon le protocole décrit par LOUBOUTIN et collab. [2021]. Le titre infectieux de la production virale, déterminé par la méthode en point final décrite par KÄRBER [1931], était de 4×10^7 DCIT₅₀ mL⁻¹ (DCIT₅₀ = Nombre de virus infectant 50% des cellules de la culture). La même méthode de titration virale a été utilisée pour quantifier la présence de virus dans les poissons morts au pic de mortalité durant les épreuves d'infections virales.

Protocole d'infection

L'infection consiste en une baignade des poissons de 3 h dans un volume minimum d'eau hyperoxygénée contenant entre 1×10^4 DCIT₅₀ mL⁻¹ et 1×10^5 DCIT₅₀ mL⁻¹. Au terme des 3 heures de contact, les poissons ont été placés dans un bac de 10 L en circuit ouvert à une température de 11 °C ± 2 °C et suivis quotidiennement durant 6 semaines.

Pour chacune des conditions de contamination étudiées, 4 lots ont été créés :

- 1 lot sans virus, dit témoin (baignade avec du milieu de culture stérile, [LOUBOUTIN et collab., 2021]);
- 3 lots infectés par le virus.

2.4.7 Prélèvements réalisés sur les poissons

Prélèvements non invasifs

Les prélèvements de sang ont été réalisés sur des individus adultes au niveau de la veine caudale. Un volume d'environ 2 mL de sang a été prélevé à l'aide d'un vacutainaire hépariné (Greiner réf. KG454244). Pour les analyses en cytométrie de flux, 300 μL de sang frais ont été dilués avec 10 mL de milieu Leibovitz 15 (L15, Eurobio) contenant 8 mgL^{-1} d'héparine de lithium (Sigma-Aldrich réf. H0878). Un volume de 5 μL de sang total a été utilisé pour les analyses hématologiques. Le volume résiduel a été centrifugé (1 200 x g, 10 min, 4 °C) et le plasma collecté stocké à -80 °C pour les analyses spectrophotométriques.

Prélèvements invasifs

Les organes (foie, branchie, rate et cerveau) ont été prélevés sur poissons adultes après la mise à mort, plongés dans de l'azote liquide, puis stockés à -80 °C dans l'attente des analyses.

Pour les truites juvéniles, le sang a été prélevé soit en suivant la technique décrite pour les poissons adultes (si le poids était supérieur à environ 5 g), soit à l'aide d'un capillaire hépariné après section de la nageoire caudale. Après mise à mort des poissons, les organes (foie, branchie, rate et cerveau) ont été prélevés, plongés dans de l'azote liquide, puis stockés à -80 °C pour les futures analyses.

Les prélèvements des larves entières ont été réalisés sur des larves vésiculées et des larves nageantes (après résorption du sac vitellin). Pour les analyses biométriques et des malformations, les larves ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde 3% selon le protocole décrit par [NIKOLAKAKIS et collab. \[2014\]](#). Pour les analyses spectrophotométriques et de biologie moléculaire, les larves entières ont été prélevées, directement trempées dans l'azote liquide, puis stockées à -80 °C.

2.5 Paramètres biologiques analysés

Afin de caractériser l'impact de la contamination chimique sur l'état de santé de la truite arc-en-ciel, trois grandes fonctions ont été ciblées : 1. la reproduction, 2. l'immunité et 3. les défenses antioxydantes. Ces différentes fonctions ont été étudiées au travers de différents biomarqueurs dont la pertinence écologique et la dynamique temporelle sont variables (voir la Figure 2.10) [[VAN DER OOST et collab., 2003](#)]. Ces biomarqueurs ont été utilisés afin d'explorer les modes d'action toxiques des composés chimiques testés et d'en prédire les effets à long terme sur des niveaux d'intégration allant de la population jusqu'aux communautés.

L'étude de la reproduction, fonction biologique primordiale pour la valeur sélective des individus (c.-à-d. leur capacité à survivre et à se reproduire dans leur environnement, elle est influencée par des composantes telles que la viabilité, le succès reproducteur et la fécondité [[ORR, 2009](#)]), est indispensable pour caractériser les éventuels effets reprotoxiques de la contamination chimique sur les **TACs**.

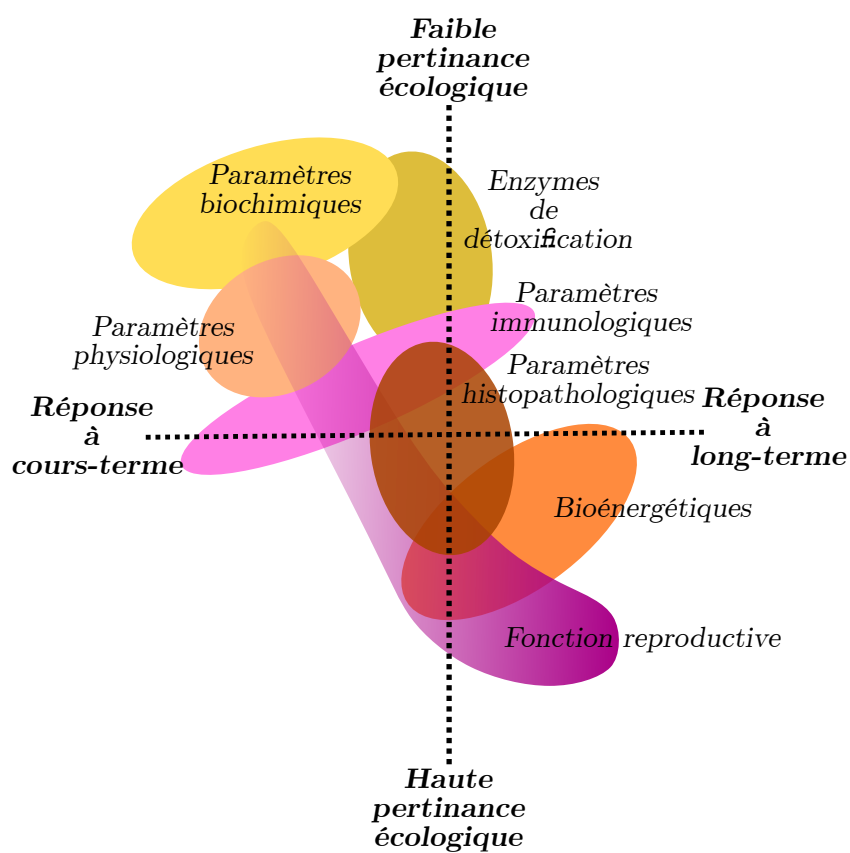


FIGURE 2.10 – Schéma conceptuel décrivant les différents niveaux d'intégration biologique (source : modifié d'après VAN DER OOST et collab. [2003]).

L'immunité est également une fonction impactant la valeur sélective des individus puisqu'elle est directement reliée à la survie. Ainsi, l'évaluation de l'immunotoxicité des composés chimiques présente une grande pertinence écologique et de plus en plus d'études se tournent vers cette fonction physiologique [REHBERGER et collab., 2017].

Le système antioxydant est régulièrement la cible de composés toxiques, qui peuvent modifier l'équilibre pro/anti-oxydants (p. ex. augmentation de la production de ROS, interaction avec les enzymes antioxydantes) [LUSHCHAK, 2015].

En plus de ces trois fonctions, ciblées spécifiquement pour évaluer l'état de santé des truites exposées, d'autres marqueurs ont été suivis. Les activités enzymatiques de deux cibles supposées du glyphosate, l'acétylcholinestérase (AChE) et l'anhydrase carbonique (CA), ont été mesurées afin de relier les effets toxiques observés sur des paramètres de plus hauts niveaux d'organisation biologique avec des perturbations potentielles de ces enzymes. D'autres enzymes possédant des fonctions importantes dans des voies métaboliques clefs et utilisées comme des indicateurs de l'effet de la contamination chimique sur le métabolisme énergétique ont été analysées en complément. Le coût métabolique associé à la contamination chimique engendre en effet des compromis dans l'allocation de l'énergie chez les poissons qui peuvent affecter d'autres fonctions physiologiques [SOKOLOVA, 2013].

2.5.1 Taux de fertilité, d'éclosion et survie des oeufs

Une fraction des œufs de chaque femelle a été pesée puis conservée dans une solution de Gilson (comme décrit par FRIEDLAND et collab. [2005]) pour permettre l'estimation du poids individuel d'un œuf et du nombre total d'œufs par femelle. La fécondité relative est décrite comme la quantité d'œufs produite par une femelle divisée par son poids. La fertilité est considérée comme la proportion d'embryons ayant survécu à cinq jours post-fertilisation [CONTRERAS-SÁNCHEZ et collab., 1998]. La survie d'environ 200 embryons par femelle mature de la ponte a été suivie quotidiennement dans des boîtes de ponte en plastique permettant d'isoler chaque lot d'œufs.

2.5.2 Paramètres biométriques et étude des malformations

La mesure des paramètres biométriques et l'étude des malformations ont nécessité une acquisition d'images des larves avec une loupe binoculaire couplée à une caméra. Ces images ont ensuite été analysées informatiquement à l'aide du logiciel ToupView 3.7 afin de déterminer différents paramètres : longueur de l'œil (mm), de la tête (mm), du corps (mm) ainsi que surface de l'œil (mm²), de la tête (mm²) et du sac vitellin (mm²).

L'étude des malformations larvaires a été faite par analyse visuelle des images collectées. Quatre types de malformations ont été considérés : 1. courbure vertébrale, 2. mâchoire, 3. tête, et 4. œdèmes au niveau du sac vitellin. Un ensemble de larves de la condition contrôle de chaque essai, ne pré-

sentant pas de malformations apparentes, a permis de constituer un lot de larves de référence. L'ensemble des larves a ensuite été comparé à ce lot de référence, permettant ainsi de considérer comme malformées les larves ayant une morphologie s'écartant de ce standard.

2.5.3 Analyse du comportement natatoire des larves

L'analyse du comportement natatoire des larves de truites a été menée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe UMR CNRS 5805 EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) de l'Université de Bordeaux. Le protocole d'analyse a été établi grâce à l'adaptation des travaux de [WEEKS SANTOS et collab. \[2019\]](#). Le suivi du comportement natatoire a été réalisé sur des larves de truites nageantes (juste après la résorption du sac vitellin). Les poissons ont été maintenus à une température de 11 °C sur une plage horaire n'excédant pas 4 h afin d'éviter d'observer une variation trop importante liée au cycle nyctéméral. Le comportement a été suivi dans un appareil DanioVision (Noldus) dans lequel les larves ont été positionnées dans des plaques de cultures 6 puits à fond plat (Nunc, réf. 140685) contenant 2 mL d'eau par puits (1 larve/puits). Les larves ont été acclimatées 10 min à l'obscurité dans la machine avant le début de l'acquisition des données du suivi du comportement. Une caméra infrarouge a ensuite permis de suivre, pendant une phase de 30 min, le déplacement des larves dans leurs puits grâce au couplage de la prise de vidéos avec un système d'analyse d'images DanioVision (Noldus, version 12.1). Cette phase de 30 min a été découpée en 3 phases d'intensité lumineuse différentes : une première phase de 10 min d'obscurité, puis une phase de 10 min de lumière intense suivie d'une troisième phase d'obscurité. Ce protocole opératoire, visant à stimuler le comportement natatoire des larves, a permis le suivi en simultané de la vitesse et de la distance de 6 larves placées respectivement dans chacun des 6 puits de la plaque de culture.

2.5.4 Analyse de l'immunité

Paramètres cellulaires et humoraux mesurés

L'indice hématocrite (rapport du volume des cellules au volume sanguin) des truites a été mesuré en utilisant des capillaires "hématocrite" remplis de sang total et centrifugés 5 minutes à 12 000 g. La numération des globules blancs et rouges a été réalisée à l'aide d'un hématimètre de Thoma à partir de sang total dilué au 200e dans une solution de Giemsa [[KEKIC et IVANC, 1982](#)]. Le volume corpusculaire moyen (ou volume globulaire moyen - VGM) a été exprimé comme le ratio de l'indice hématocrite sur le nombre d'érythrocytes par unité de volume.

Une étude des populations leucocytaires par cytométrie de flux a été conduite sur le FACSCalibur (Becton Dickinson). Les leucocytes ont été extraits sur un gradient de Ficoll (Histopaque® 1077, Eurobio) après plusieurs étapes de lavage par centrifugation selon le protocole décrit par [DANION et collab. \[2011\]](#). Pour chaque paramètre, 15 000 événements ont été analysés par échantillon. Deux populations leucocytaires, les lymphocytes et les macrophages, ont été différenciées selon la taille et la complexité des événements. Aussi, l'activité de phagocytose a été mesurée sur des leucocytes incubés pendant 1 h à température ambiante dans une solution de $2,7 \times 10^9$ billes ; fluorescentes/mL

(FluoroSphères® particules de carboxylate modifié, diamètre 1 µm, ThermoFisher Scientific). La capacité de phagocytose a été définie par la proportion de leucocytes présentant une intensité de fluorescence égale ou supérieure à celle de deux billes (modifié de BROUSSEAU [1999]). La concentration en lysozyme plasmatique a été mesurée selon le protocole décrit par DANION et collab. [2012]. Le dosage de l'activité de la voie alternative du complément a été effectué selon le protocole décrit par DANION et collab. [2012]. Les résultats ont été exprimés selon la formule décrite par COSTABILE [2010].

Expression relative de gènes de l'immunité

L'expression de gènes du complément (*C3-1* et *C3-4*), de l'interleukin-1β (*IL-1β*) et du facteur de nécrose tumoral -α (*TNF-α*) a été évaluée à partir d'ARN extraits d'échantillons de rates. La méthode d'extraction et de quantification des ARNs, la reverse transcription (RT) et les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) quantitatives en temps réel (SyberGreen) ont été mises au point dans le laboratoire par DUPUY et collab. [2019]. Les séquences des amorces de ces différents gènes ont été obtenues dans la littérature et sont basées sur des séquences disponibles sur GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Tableau 2.2). Le gène du facteur d'élongation (*EF*) a été inclus dans l'analyse en tant que gène de référence (e. i. "housekeeping reference gene"). De très faibles variations dans le niveau d'expression du gène *EF* (c.-à-d. des valeurs similaires de cycle seuil, ou Ct pour cycle threshold) ont été observées entre les individus contrôles et les poissons exposés chimiquement. L'expression relative des gènes cibles a été calculée selon la formule de Pfaffl [PFAFFL, 2001].

TABLEAU 2.2 – Gènes de l'immunité ciblés et amorces associées.

Gène	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	Références Genbank	Source
<i>EF</i>	Sens : GATCCAGAAGGAGGTCACCA Anti-sens : TTACGTTTCGACCTCCATCC	AF498320.1	BALLESTEROS et collab. [2015]
<i>C3-1</i>	Sens : GAGATGGCCTCCAAGAAGATAGAA Anti-sens : ACCGCATGTACGCATCATCA	L24433.1	CORTÉS et collab. [2013]
<i>C3-4</i>	Sens : TGCTCTAGTCACATCTACCACTCT Anti-sens : CAGGCACATGGGTATAACAGTAGAA	AF271080	LØVOLL et collab. [2007]
<i>Il-1</i>	Sens : ACCGAGTTCAAGGACAAGGA Anti-sens : CATTTCATCAGGACCCAGCAC	DQ778946	BJORK et collab. [2014]
<i>TNF-α</i>	Sens : GGGGACAACTGTGGACTGA Anti-sens : GAAGTCTTGCCCTGCTCTG	AJ277604	PÉREZ-SÁNCHEZ et collab. [2011]

Potentiel global de défense des TACs exposées au glyphosate et soumises à une épreuve infectieuse expérimentale

L'objectif de ce type d'expérimentation est de définir l'immunotoxicité des composés chimiques étudiés. En plus des biomarqueurs suivis ponctuellement, une voie originale consiste à soumettre les poissons, préalablement contaminés chimiquement, à une épreuve infectieuse expérimentale. Le potentiel global de défense des poissons est appréhendé par l'exposition à un pathogène dont la pénétration dans l'organisme induit un ensemble de mécanismes immunitaires visant à assurer

l'intégrité de l'hôte infecté. Ce type d'expérience a été appelé "test de mortalité induite par épreuve infectieuse" par l'équipe de REHBERGER et collab. [2017] dans leur revue de la littérature sur l'immunotoxicologie des poissons. L'analyse de la survie lors de ce type de test constitue un paramètre intégratif reflétant aussi bien les impacts directs des contaminants (p. ex. interaction des composés chimiques avec des éléments du système immunitaire) que leurs effets indirects (p. ex. modification du statut métabolique des poissons). En complément de l'étude de la survie, des prélèvements réalisés au cours de l'épreuve infectieuse peuvent permettre une analyse des paramètres de l'immunité. Sans une sollicitation du système immunitaire, certains changements induits par les contaminants sur ces paramètres ne sont pas détectés. Ainsi, l'analyse des prélèvements issus des expérimentations de ce type permet de maximiser les chances de détecter un effet immunotoxique des composés chimiques étudiés.

Après l'infection virale par balnéation, la mortalité est suivie quotidiennement pendant 6 semaines. Les poissons morts ont été prélevés afin de réaliser le titrage du virus en culture cellulaire au moment du pic de mortalité. Deux prélèvements invasifs ont systématiquement été effectués au cours des épreuves infectieuses virales— c.-à-d. 96 heures post-infection (hpi) pour détecter les effets des contaminants sur la réponse immunitaire précoce, et à la fin de l'épreuve, soit environ 6 semaines post-infection (spi) pour le dosage des anticorps spécifiques du virus de la *NHI* chez les poissons survivants, à l'aide d'une technique de séroneutralisation LOUBOUTIN et collab. [2021].

2.5.5 Biomarqueurs, l'anhydrase carbonique (CA) et l'acétylcholinestérase (AChE)

Des équipes de recherche ont montré que le glyphosate possède la capacité d'inhiber *in vitro* l'anhydrase carbonique (CA) et l'acétylcholinestérase (AChE) [EL-DEMERDASH et collab., 2001; L NC et collab., 2013]. L'inhibition de ces deux enzymes, jouant un rôle crucial dans des processus physiologiques clés, a également été observée *in vivo* [CATTANEO et collab., 2011; GLUSCZAK et collab., 2006, 2007; MENÉNDEZ-HELMAN et collab., 2011; MODESTO et MARTINEZ, 2010; SULUKAN et collab., 2017]. Cette capacité d'inhibition pourrait être directement impliquée dans le mode d'action toxique du glyphosate, car il engendrerait ainsi indirectement du stress oxydatif, lui-même impliqué dans la perturbation de processus physiologiques dans les cellules et les organismes [CATTANEO et collab., 2011; MODESTO et MARTINEZ, 2010; SULUKAN et collab., 2017]. Ces deux enzymes ont donc été sélectionnées comme biomarqueurs d'intérêt de la contamination au glyphosate.

Anhydrase carbonique, CA

L'anhydrase carbonique (EC 4.2.1.1) est une enzyme qui catalyse une réaction physiologique fondamentale et qui est identifiée comme biomarqueur dans plusieurs études écotoxicologiques [CEYHUN et collab., 2010; DINÇER et collab., 2015; MELA et collab., 2013; L NC et collab., 2013; SULUKAN et collab., 2017; VITALE et collab., 1999]. LIONETTO et collab. [2012] l'ont qualifié de biomarqueur quantitatif, facile et peu cher à doser en présentant une réponse dose dépendante face à différents

polluants. De plus, il est reconnu qu'elle pourrait directement être impactée par la contamination au glyphosate et engendrer des effets toxiques au niveau de la physiologie globale des poissons [SULUKAN et collab., 2017].

Le dosage de la CA a été effectué à partir de branchies homogénéisées dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,8) contenant 20% de glycérol et 0.2 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (inhibiteur protéique) en utilisant l'homogénéiseur de tissus Precellys 24 (Bertin Technologies, France). Les lectures spectrophotométriques ont été réalisées en microplaques, avec le spectrophotomètre TECAN Spark 10M (Spark) à 405 nm, en suivant une adaptation du protocole décrit par VERPOORTE et collab. [1967].

Les conditions de réaction dans les puits de la microplaque ont été les suivantes :

- CA (EC 4.2.1.1) : 20 µL de l'extrait, 190 µL de solution de réaction (4-nitrophenyl acetate, Sigma-Aldrich réf. N8130, 10mM; dissout dans du tampon phosphate, 100 mM, pH 7.1) et 10 µL d'acétazolamide (AZM) ou de diméthyle sulfoxyde (DMSO) (activité estérase totale sans ou avec l'activité de la CA, respectivement; AZM Sigma-Aldrich réf. A6011, 1 mM in DMSO 50%).

Choline estérases, ChE

Le groupe des cholines estérases regroupe deux enzymes : l'AcetylCholine Estérase (EC 3.1.1.7) et la Choline Estérase non spécifique (EC 3.1.1.8). Les composés chimiques organophosphorés sont couramment utilisés comme pesticides pour leur capacité à inhiber irréversiblement les cholines estérases [ALDRIDGE, 1971]. Cette enzyme est donc fréquemment employée comme biomarqueur de la contamination aux organophosphates. Cependant, le glyphosate, malgré la confusion de certains auteurs, est un composé organophosphoré et pas un organophosphate. Il se différencie de ces derniers par une liaison directe de son atome de carbone avec son atome de phosphore. Les organophosphates possèdent une liaison C-O-P tandis que le glyphosate présente une liaison C-P. Certains auteurs ont néanmoins montré que le glyphosate, associé ou non avec des adjuvants, pouvait inhiber l'acétylcholinestérase [CATTANEO et collab., 2011; GLUSZAK et collab., 2006; MENÉNDEZ-HELMAN et collab., 2011; MODESTO et MARTINEZ, 2010].

L'activité des ChE a été mesurée sur des cerveaux et des larves entières, broyés suivant le même protocole d'homogénéisation que les branchies, selon la méthode décrite part ELLMAN et collab. [1961], adaptée pour le dosage en microplaques et une lecture spectrophotométrique au TECAN Spark 10M.

Les conditions de réaction dans les puits de la microplaque ont été les suivantes :

- ChE (EC 3.1.1.8) : 20 µL de l'extrait, 140 µL de solution de réaction (acetylthiocholine iodide, Sigma-Aldrich réf. A5751, 1,9 mM; 5,5,-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB) Sigma-Aldrich réf. D8130, 0.33mM; dissout dans du tampon phosphate, 0.1 M, pH 7.8).

2.5.6 Stress oxydant

Le stress oxydant est largement reconnu pour être activé par des contaminants environnementaux comme les pesticides [LUSHCHAK, 2015]. La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), par des mécanismes directs et indirects, pourrait être associée aux effets toxiques du glyphosate ou de ses co-formulants [CATTANEO et collab., 2011; LUSHCHAK et collab., 2009; VAN DER OOST et collab., 2003; SULUKAN et collab., 2017].

Enzymes antioxydantes

Les activités de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT), formant la première ligne de défense face aux ROS [LUSHCHAK, 2015], ont été mesurées. Sachant que le glyphosate peut affecter les mitochondries, la fraction mitochondriale de la SOD (c.-à-d. la SOD manganèse dépendante ou MnSOD) a été spécifiquement recherchée (via son inhibition spécifique par le cyanure de sodium).

Les activités de la superoxyde dismutase totale (SODtotal), de la superoxyde dismutase manganèse-dépendante (MnSOD), de la GPx et de la CAT ont été dosées dans les échantillons de foie et de branchies, broyés au Precellys et lus au Spark 10M Tecan® à 420 nm, 420 nm, 340 nm et 240 nm, respectivement, en suivant une adaptation des protocoles décrits par MESA-HERRERA et collab. [2019]; PAGLIA et VALENTINE [1967] et AEBI [1984].

Les conditions de réaction dans les puits de la microplaque ont été les suivantes :

- SODtotal (EC 1.15.1.1) : 20 µL de l'extrait, 5 µL de la solution de substrat (Pyrogallol 24mM, Sigma-Aldrich réf. P0381; dissous dans du 0.5N HCL), 170 µL du tampon de réaction (cacodylic acid 50mM, Sigma-Aldrich réf. C0125; acide diéthylentriaminopentaacetic (DTPA) 1mM, Sigma-Aldrich réf. D1133);
- MnSOD (EC 1.15.1.1) : 20 µL de l'extrait, 5 µL de la solution de substrat (Pyrogallol 24mM, Sigma-Aldrich réf. P0381; dissous dans du 0.5N HCL), 170 µL du tampon de réaction (acide cacodylique 50mM, Sigma-Aldrich réf. C0125; DTPA 1mM, Sigma-Aldrich réf. D1133) et 5 µL de la solution de cyanure (pour mesurer la fraction de la SOD totale sans la fraction de la MnSOD; cyanure de sodium (NACN) 30mM, Sigma-Aldrich/Empura réf. 1064371000) or 5 µL tampon de réaction (pour mesurer l'activité de la fraction de la SOD totale);
- GPx (EC 1.11.1.9) : 15 µL de l'extrait, 35 µL du tampon de réaction (EDTA 10mM, Sigma-Aldrich réf. E5134; PO4 0.1M pH 7.8), 50 µL de solution de réaction (nicotinamide adenine dinucléotide phosphate, NADPH, 0.75mM, CAS 2646-71-1; GSH 6.30mM Sigma-Aldrich réf. PHR1359; glutathion réductase 1,8 U mL⁻¹, CAS · 9001 -48-3; dissous dans du tampon de réaction), 50 µL de la solution d'hydroxyde de cumène (0.552mM; Sigma-Aldrich réf. 247502);
- CAT (EC 1.11.1.6) : 50 µL de l'extrait, 200 µL de solution de réaction (H₂O₂ 28mM, Sigma-Aldrich réf. H1009; dissout dans du tampon phosphate, 0.1 M, pH 7.8).

Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique, TBARS

Le malondialdéhyde (MDA), résultant de la peroxydation des lipides notamment par les ROS, est un indicateur des dommages causés par le stress oxydant. Une augmentation des dommages oxydatifs, parfois associée à une augmentation de la peroxydation des lipides, a été observée lors de l'exposition de poissons au glyphosate et aux GBHs [CATTANEO et collab., 2011; GLUSCZAK et collab., 2011; LUSHCHAK et collab., 2009; DE MOURA et collab., 2017; VAN DER OOST et collab., 2003; SULUKAN et collab., 2017].

L'activité des TBARS a été mesurée sur des échantillons de truites (foie, larve ou poisson entier), broyés au Precellys et lus au Spark 10M Tecan®, à 532 nm en suivant le protocole adapté de ESPIN et collab. [2017].

Les conditions de réaction dans les puits de la microplaque ont été les suivantes :

- TBARS : 50 µL de l'extrait, 100 µL de solution de réaction (15% acide trichloroacetic, Sigma-Aldrich réf. T6399; 0.25N acide hydrochlorique (HCL), Sigma-Aldrich réf. 71763; 0.375% acide 2-thiobarbiturique, Sigma-Aldrich réf. T5500).

2.5.7 Paramètres métaboliques

Métabolisme aérobie

Les activités de deux enzymes mitochondriales, la cytochrome c oxydase (CCO) et la citrate synthase (CS), intervenant dans le contrôle des flux de leurs voies métaboliques respectives, sont reconnues pour être de bons indicateurs du métabolisme [NORIN et MALTE, 2012]. D'autres études montrent que le métabolisme aérobie est corrélé à l'activité de la CCO, mais parfois moins à celui de la CS. Ce phénomène résulte du lien entre l'activité de la CS et le volume du contenu mitochondrial [BRIJS et collab., 2017]. Ainsi, une réduction de ce contenu entraîne une diminution de l'activité de la CS, avec un ratio CS : CCO qui est donc un bon révélateur d'un dysfonctionnement mitochondrial [IBARZ et collab., 2010], mais qui peut aussi révéler une modulation de l'activité anabolique de la mitochondrie avec un changement dans la biosynthèse des lipides en comparaison de l'activité oxydative [CHANG et collab., 2019; WINDISCH et collab., 2011].

Métabolisme anaérobie

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme clef du métabolisme anaérobie qui permet la réduction du NAD⁺ vers le NADH en l'absence d'oxygène [FARHANA et LAPPIN, 2020]. L'activité de la LDH semble être un marqueur pertinent du métabolisme anaérobie [COUTURE et KUMAR, 2003]. L'augmentation de l'activité de cette enzyme a été associée à une plus forte dépendance des poissons faisant face à une contamination chimique vis-à-vis du métabolisme anaérobie des carbohydrates [TEODORESCU et collab., 2012].

Anabolisme

La glucose-6-phosphatase deshydrogénase (**G6PDH**) est une enzyme catalysant la première réaction de la voie des pentoses phosphates. Elle joue un rôle important dans la production du NADPH, nécessaire pour la biosynthèse (p. ex. des acides nucléiques et des acides gras). La **G6PDH** est donc reconnue comme étant un bon marqueur de l'anabolisme [PÉDRON et collab., 2017]. Le NADPH joue également un rôle dans la défense contre le stress oxydant (c.-à-d. pour permettre le fonctionnement de la glutathion reductase-peroxidase). Une augmentation de la **G6PDH** peut indiquer une augmentation de l'utilisation du NADPH, nécessaire au maintien de l'équilibre redox [WU et collab., 2018].

Conditions de dosage

Les activités de la **CS**, de la **CCO**, de la **LDH** et de la **G6PDH** ont été mesurées dans des échantillons de foie isolés et de larves entières, broyés au Precellys et lus au Spark 10M Tecan[®], à 412 nm, 550 nm, 340 nm et 340 nm en suivant une modification des protocoles décrits par GAUTHIER et collab. [2008]; PÉDRON et collab. [2017].

Les conditions de réaction dans les puits de la microplaque ont été les suivantes :

- **CS** (EC 2.3.3.1) : 20 µL de l'extrait, 180 µL de solution de réaction (oxaloacétate 0.56mM, Sigma-Aldrich réf. O4126; acetyl-CoA 0.33mM, Sigma-Aldrich réf. 10 101 907 001; Triton X100 0,28%, CAS 9002-93-1; DTNB 0.11mM, Sigma-Aldrich réf. D8130; dissous dans du tampon phosphate, 0,1 M, pH 7.1);
- **CCO** (EC 1.9.3.1) : 20 µL de l'extrait, 180 µL de solution de réaction (cytochrome c réduit 24.44mM, Sigma-Aldrich réf. C7752; dissout dans du tampon phosphate, 0,1 M, pH 7.1);
- **LDH** (EC 1.1.1.27) : 20 µL de l'extrait, 180 µL de solution de réaction (pyruvate 7.96mM, Sigma-Aldrich réf. P2256; NADH 0.26mM, Sigma-Aldrich réf. N8129; dissout dans du tampon phosphate, 0,1 M, pH 7.1);
- **G6PDH** (EC 1.1.1.49) : 20 µL de l'extrait, 180 µL de solution de réaction (NADP 0.78mM, Sigma-Aldrich réf. N0505; G6P 2.22mM, Sigma-Aldrich réf. G7879; dissout dans du tampon imidazole, imidazole 50mM, MgCl₂ 20mM, KCl 70mM, pH 7.5).

2.6 Développements méthodologiques de dosages enzymatiques

Certains paramètres enzymatiques possédaient un protocole déjà en place au sein du laboratoire (p. ex. **GPx** et **CAT**). D'autres (p. ex. **ChE**, **CA**, **totalSOD**, **MnSOD**, **TBARS**, **CS**, **CCO**, **LDH** et **G6PDH**) ont été mis au point spécifiquement pour ce projet. Ces développements méthodologiques ont été menés en suivant des critères de qualité permettant de valider une méthode de dosage.

2.6.1 Méthodes de calcul

Articles sur les générations F0_2014 et F0_2018 Les activités enzymatiques ont été calculées en utilisant la pente de la droite "densité *optique* = $f(\text{temps})$ " et la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon l c$) pour les enzymes ChE, CA, CS, CCO, LDH et G6PDH (avec pour coefficient d'extinction molaire, ϵ , 13,6, 18,5, 13,6, 21,84, 6,22 et 6,22 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ respectivement); et avec une courbe d'étalonnage pour les enzymes SOD, CAT, GPx et le dosage des TBARS. Les courbes d'étalonnage ont été réalisées en passant sur chaque plaque de dosage une gamme étalon faite avec les enzymes pures : CAT (Sigma-Aldrich réf. SRE1010), GPx (Sigma-Aldrich réf. G6137), SOD (Sigma-Aldrich réf. 55395) et avec le tetrahydroxypropane (Sigma-Aldrich réf. T9889) pour le dosage des TBARS. La concentration des protéines a été mesurée dans tous les organes avec le kit de dosage "Pierce BCA protein assay kit" (ThermoFisher Scientific). Cette concentration protéique a été utilisée pour calibrer les activités enzymatiques et les exprimer ainsi sous la forme d'activités spécifiques (UI mg^{-1}).

Articles sur les générations F1_2018 et F2_2019 La même méthode de calcul que décrite dans le paragraphe ci-dessus a été employée. Cependant, afin de faciliter la mise au point des dosages, une droite étalon réalisée avec des enzymes pures a été utilisée pour chacune des enzymes suivies (c.-à-d. la méthode des coefficients d'extinction molaire n'a pas été employée). Les enzymes pures utilisées, en plus de celles du paragraphe au-dessus, étaient les suivantes : AChE (réf. SIGMA C3389), CA (réf. SIGMA C2624), CS (réf. SIGMA C3260), CCO (solution de foie de truites de référence fabriquée au laboratoire dont l'activité est déterminée selon la méthode décrite au paragraphe précédent), LDH (réf. SIGMA 427217) et G6PDH (réf. SIGMA G5885)

2.6.2 Validation des dosages spectrophotométriques

Validation du dosage par contrôle du coefficient de corrélation (R^2) de la droite $V_i = F(\text{Temps})$. La linéarité de la réaction enzymatique a été contrôlée grâce à la mesure du coefficient de corrélation qui doit être supérieur, dans la mesure du possible, à 0,97. Cette limite peut être étendue à 0,95 dans le cas où, visuellement, la droite $V_i = f(t)$ est bien linéaire et non pas asymptotique; ce qui pourrait indiquer que l'un des composants du mélange réactionnel est limitant (p. ex. épuisement du substrat, chromogène transformé en excès).

Validation du dosage par contrôle de la variabilité intrarun La variabilité intraplaque se mesure par le calcul du coefficient de variation (CV) entre chacun des échantillons passés a minima en duplicata sur une même plaque (c.-à-d. issus d'un même run d'analyse spectrophotométrique). Le CV intraplaque doit être, dans la mesure du possible, inférieur à 10%. Dans les cas où le dosage ne peut pas être ajusté, pour réduire la variabilité intrinsèque à celui-ci, le CV limite peut être augmenté jusqu'à 15%.

Validation de la gamme étalon Dans le cas où une gamme étalon est utilisée pour le dosage, les différents points de cette dernière sont validés de la même façon que les échantillons par les étapes de validation du coefficient de corrélation et de variabilité intraplaque décrites précédemment. Après obtention, pour les points de la gamme, de la Vitesse initiale (V_i) ou de l'absorbance dans le cas de mesures en point final, la courbe « V_i ; (ou ; A) = $a \times$ activité ; (ou ; $concentration$) + b » est tracée et le coefficient de corrélation de cette droite calculé. Il doit être supérieur, dans la mesure du possible, à 0,97. Cette limite peut être étendue à 0,95 dans le cas où, visuellement, la droite étalon est bien linéaire et non pas asymptotique; ce qui pourrait indiquer que l'un des composants du mix de réaction est limitant (p. ex. épuisement du substrat, chromogène transformé en excès).

Validation du dosage par contrôle de la variabilité inter-RUN La variabilité inter-RUN (encore appelée interplaque) se mesure par calcul du coefficient de variation (**CV**) d'une des trois entités suivantes : 1. au moins un même échantillon passé a minima en duplicata sur chacune des plaques de l'essai; 2. la valeur de la pente de la gamme; 3. la valeur de l'activité moyenne de l'ensemble des échantillons d'une même plaque (même quand des échantillons différents sont passés sur chacune des plaques), à condition que les échantillons passés sur une même plaque soient sélectionnés de manière aléatoire (sans tenir compte du traitement qu'ont subi les individus). Le **CV** inter-RUN doit être, dans la mesure du possible, inférieur à 10%. Dans les cas où le dosage ne peut pas être ajusté, pour réduire la variabilité intrinsèque à celui-ci, le **CV** limite peut être augmenté jusqu'à 15%.

Validation d'une méthode de dosage par contrôle de la variabilité interdilution et sélection de la dilution adaptée à la matrice considérée Lors des prétests réalisés pour ajuster le dosage pour une matrice donnée, les étapes suivantes ont été suivies :

- Passage d'une large gamme de dilution d'un mélange ou de plusieurs échantillons de la matrice considérée. Cela permet de sélectionner la plage de dilution adaptée au dosage.— p. ex. passage de 10 dilutions, de la dilution 1e jusqu'à la dilution 1000e, avec un pas de 10. La plage de dilution est sélectionnée grâce au coefficient de corrélation (et au contrôle visuel de la linéarité) et à la vérification de la variabilité intraplaque.
- Après avoir sélectionné une plage de dilution adaptée, l'échantillon est dilué plus finement entre les dilutions extrêmes de la plage sélectionnée (p. ex. un pas de dilution compris entre 1,1 et 2 au lieu de 10). Par exemple si la plage 10-50e est sélectionnée, de nouvelles dilutions seront réalisées aux 10, 20, 30, 40 et 50e. À nouveau le coefficient de corrélation (et le contrôle visuel de la linéarité) ainsi que la variabilité intraplaque pour chaque dilution sont vérifiés.
- Le contrôle de la variabilité interdilution est réalisé sur les dilutions de l'étape précédente après avoir multiplié l'absorbance ou la V_i par le facteur de dilution. Le coefficient de variation est calculé entre les différentes paires de dilutions consécutives (valeurs moyennes) et celui-ci doit être dans la mesure du possible inférieur à 10%. Dans les cas où le dosage ne peut pas être ajusté, pour réduire la variabilité intrinsèque à celui-ci, le **CV** limite peut être augmenté jusqu'à

15%. NB : cette étape ne peut pas toujours être validée en fonction du dosage considéré (dosage de la SOD par exemple) et n'apparaît pas indispensable dans le cas où une gamme étalon est utilisée.

Références

- «Access online : OIE - World Organisation for Animal Health», URL <https://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=chapitre{ }ihh.htm>. 93
- AEBI, H. 1984, «Catalase in vitro», dans *Methods in Enzymology*, vol. 105, Elsevier, ISBN 9780121820053, p. 121–126, doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3. 102
- ALDRIDGE, W. N. 1971, «The nature of the reaction of organophosphorus compounds and carbamates with esterases.», *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 44, n° 1, p. 25–30, ISSN 0042-9686. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5315347><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2428026><https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5315347><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2428026/>. 101
- BALLESTEROS, N. A., S. R. SAINT-JEAN et S. I. PEREZ-PRIETO. 2015, «Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 165, n° 3-4, doi: 10.1016/j.vetimm.2015.04.001, p. 127–137, ISSN 0165-2427. 99
- BENBROOK, C. M. 2016, «Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally», *Environmental Sciences Europe*, vol. 28, n° 1, doi: 10.1186/s12302-016-0070-0, p. 3, ISSN 2190-4707. 80
- BJORK, S. J., Y.-A. ZHANG, C. N. HURST, M. E. ALONSO-NAVEIRO, J. D. ALEXANDER, J. O. SUNYER et J. L. BARTHOLOMEW. 2014, «Defenses of susceptible and resistant Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) against the myxozoan parasite *Ceratomyxa shasta*», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 37, n° 1, doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.024, p. 87–95, ISSN 1050-4648. 99
- BRIJS, J., E. SANDBLOM, H. SUNDH, A. GRÄNS, J. HINCHCLIFFE, A. EKSTRÖM, K. SUNDELL, C. OLSSON, M. AXELSSON et N. PICHAUD. 2017, «Increased mitochondrial coupling and anaerobic capacity minimizes aerobic costs of trout in the sea», *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, doi: 10.1038/srep45778, p. 45 778, ISSN 2045-2322. 103
- BROOKES, G., F. TAHERIPOUR et W. E. TYNER. 2017, «The contribution of glyphosate to agriculture and potential impact of restrictions on use at the global level», *GM Crops & Food*, vol. 8, n° 4, doi: 10.1080/21645698.2017.1390637, p. 216–228, ISSN 2164-5698. 80
- BROUSSEAU, P. P. 1999, «Manual of immunological methods», . 99

- CATTANEO, R., B. CLASEN, V. L. LORO, C. C. DE MENEZES, A. PRETTO, B. BALDISSEROTTO, A. SANTI et L. A. DE AVILA. 2011, «Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 87, n° 6, doi: [10.1007/s00128-011-0396-7](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0396-7), p. 597–602, ISSN 0007-4861. 100, 101, 102, 103
- CEYHUN, S. B., M. ŞENTÜRK, O. ERDOĞAN et Ö. İ. KÜFREVIÖĞLU. 2010, « *In vitro* and *in vivo* effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills», *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 97, n° 3, doi: [10.1016/j.pestbp.2010.01.003](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.01.003), p. 177–181, ISSN 0048-3575. 100
- CHANG, C.-H., Z.-Z. LIU et T.-H. LEE. 2019, «Changes in hypothermal stress-induced hepatic mitochondrial metabolic patterns between fresh water- and seawater-acclimated milkfish, *Chanos chanos*», *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, doi: [10.1038/s41598-019-55055-4](https://doi.org/10.1038/s41598-019-55055-4), p. 18 502, ISSN 2045-2322. 103
- CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M., C. B. SCHRECK, M. S. FITZPATRICK et C. B. PEREIRA. 1998, «Effects of Stress on the Reproductive Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *Biology of Reproduction*, vol. 58, n° 2, doi: [10.1095/biolreprod58.2.439](https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.439), p. 439–447, ISSN 0006-3363. 97
- CORTÉS, R., M. TELES, R. TRÍDICO, L. ACERETE et L. TORT. 2013, «Effects of cortisol administered through slow-release implants on innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *International Journal of Genomics*, vol. 2013, doi: [10.1155/2013/619714](https://doi.org/10.1155/2013/619714), p. 1–7, ISSN 2314-436X. 99
- COSTABILE, M. 2010, «Measuring the 50% Haemolytic Complement (CH₅₀) Activity of Serum», *JoVE*, , n° 37, doi: [10.3791/1923](https://doi.org/10.3791/1923), p. e1923, ISSN 1940-087X. 99
- COUTURE, P. et P. R. KUMAR. 2003, «Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*)», *Aquatic Toxicology*, vol. 64, n° 1, doi: [10.1016/s0166-445x\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00028-6), p. 107–120, ISSN 0166-445X. 103
- DANION, M., S. L. FLOCH, J. CASTRIC, F. LAMOUR, J. CABON et C. QUENTEL. 2012, «Effect of chronic exposure to pendimethalin on the susceptibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* L., to viral hemorrhagic septicemia virus (VSHv)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 79, doi: [10.1016/j.ecoenv.2012.01.018](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.018), p. 28–34, ISSN 0147-6513. 99
- DANION, M., S. L. FLOCH, R. KANAN, F. LAMOUR et C. QUENTEL. 2011, «Effects of *in vivo* chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)», *Aquatic Toxicology*, vol. 105, n° 3-4, doi: [10.1016/j.aquatox.2011.06.022](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.022), p. 300–311, ISSN 0166-445X. 98
- DİNÇER, B., A. P. EKINCI, G. AKYÜZ et İ. Z. KURTOĞLU. 2015, «Characterization and inhibition studies of carbonic anhydrase from gill of Russian Sturgeon Fish (*Acipenser gueldenstaedtii*)», *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 31, n° 6, doi: [10.3109/14756366.2015.1076810](https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1076810), p. 1662–1665, ISSN 1475-6366. 100

- DUPUY, C., J. CABON, L. LOUBOUTIN, S. L. FLOCH, T. MORIN et M. DANION. 2019, «Cellular, humoral and molecular responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a herbicide and subsequently infected with infectious hematopoietic necrosis virus», *Aquatic Toxicology*, vol. 215, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.105282](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105282), p. 105 282, ISSN 0166-445X. 99
- EL-DEMERDASH, F. M., M. I. YOUSEF et E. I. ELAGAMY. 2001, «Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (*in vitro*)», *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 36, n° 1, doi: [10.1081/pfc-100000914](https://doi.org/10.1081/pfc-100000914), p. 29–42, ISSN 0360-1234. 100
- ELLMAN, G. L., K. COURTNEY, V. ANDRES et R. M. FEATHERSTONE. 1961, «A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity», *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, n° 2, doi: [10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9), p. 88–95, ISSN 0006-2952. 101
- ENVIRONMENTAL PROTECTION SERIES. 1990, «Biological Test Method : Acute Lethality Test Using Rainbow Trout, Report EPS 1/RM/9», cahier de recherche. URL <https://www.canada.ca/content/dam/eccc/migration/main/faunescience-wildlifescience/334bfc88-6f93-4175-a185-bd49fcd5604f/en49-24-1-9-eng.pdf>. 79
- ESPIN, S., P. SANCHEZ VIROSTA, A. GARCÍA-FERNÁNDEZ et T. EEVA. 2017, «A microplate adaptation of the thiobarbituric acid reactive substances assay to determine lipid peroxidation fluorometrically in small sample volumes», *Revista de Toxicologia*, vol. 34, n° 2, p. 94–98, ISSN 1697-0748. URL <https://rev.aetox.es/wp/index.php/a-microplate-adaptation/>. 103
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2015, «Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate», *EFSA Journal*, vol. 13, n° 11, doi: [10.2903/j.efsa.2015.4302](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302), p. 4302, ISSN 18314732, 18314732. 86
- FARHANA, A. et S. L. LAPPIN. 2020, *Biochemistry, Lactate Dehydrogenase (LDH)*, StatPearls Publishing. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>. 103
- FOLMAR, L. C., H. O. SANDERS et A. M. JULIN. 1979, «Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 8, n° 3, doi: [10.1007/BF01056243](https://doi.org/10.1007/BF01056243), p. 269–278, ISSN 0090-4341. 81
- FRIEDLAND, K., D. AMA-ABASI, M. MANNING, L. CLARKE, G. KLIGYS et R. CHAMBERS. 2005, «Automated egg counting and sizing from scanned images : Rapid sample processing and large data volumes for fecundity estimates», *Journal of Sea Research*, vol. 54, n° 4, doi: [10.1016/j.seares.2005.06.002](https://doi.org/10.1016/j.seares.2005.06.002), p. 307–316, ISSN 1385-1101. 97
- GAUTHIER, C., P. G. CAMPBELL et P. COUTURE. 2008, «Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, vol. 151, n° 4, doi: [10.1016/j.cbpa.2008.07.010](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.010), p. 526–532, ISSN 1095-6433. 104

- GLUSCZAK, L., V. L. LORO, A. PRETTO, B. S. MORAES, A. RAABE, M. F. DUARTE, M. B. DA FONSECA, C. C. DE MENEZES et D. M. DE SOUSA VALLADÃO. 2011, «Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 61, n° 4, doi: [10.1007/s00244-011-9652-4](https://doi.org/10.1007/s00244-011-9652-4), p. 624–630, ISSN 0090-4341. 103
- GLUSCZAK, L., D. DOS SANTOS MIRON, M. CRESTANI, M. B. DA FONSECA, F. DE ARAÚJO PEDRON, M. F. DUARTE et V. L. P. VIEIRA. 2006, «Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 65, n° 2, doi: [10.1016/j.ecoenv.2005.07.017](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017), p. 237–241, ISSN 0147-6513. 100, 101
- GLUSCZAK, L., D. DOS SANTOS MIRON, B. S. MORAES, R. R. SIMÕES, M. R. C. SCHETINGER, V. M. MORSCH et V. L. LORO. 2007, «Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, vol. 146, n° 4, doi: [10.1016/j.cbpc.2007.06.004](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004), p. 519–524, ISSN 1532-0456. 100
- IBARZ, A., J. BLASCO, M. GALLARDO et J. FERNÁNDEZ-BORRÀS. 2010, «Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold», *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, vol. 155, n° 3, doi: [10.1016/j.cbpa.2009.11.012](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.012), p. 319–326, ISSN 1095-6433. 103
- KÄRBER, G. 1931, «Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche», *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, vol. 162, n° 4, doi: [10.1007/bf01863914](https://doi.org/10.1007/bf01863914), p. 480–483, ISSN 1432-1912. 94
- KEKIC, H. et A. IVANC. 1982, «A new direct method for counting fish blood cells», *Ichthyologia*, vol. 14, p. 55–58. 98
- LIONETTO, M., R. CARICATO, M. GIORDANO, E. ERROI et T. SCHETTINO. 2012, «Carbonic anhydrase as pollution biomarker : An ancient enzyme with a new use», *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 9, n° 11, doi: [10.3390/ijerph9113965](https://doi.org/10.3390/ijerph9113965), p. 3965–3977, ISSN 1661-7827. 100
- LOUBOUTIN, L., J. CABON, E. VIGOUROUX, T. MORIN et M. DANION. 2021, «Comparative analysis of the course of infection and the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the 5 genotypes of infectious hematopoietic necrosis virus», *Virology*, vol. 552, doi: [10.1016/j.virol.2020.09.003](https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.09.003), p. 20–31, ISSN 0042-6822. 94, 100
- LØVOLL, M., R. A. DALMO et J. BØGWALD. 2007, «Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 23, n° 4, doi: [10.1016/j.fsi.2007.01.019](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.019), p. 721–731, ISSN 1095-9947. 99

- LUSHCHAK, O. V., O. I. KUBRAK, J. M. STOREY, K. B. STOREY et V. I. LUSHCHAK. 2009, «Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues», *Chemosphere*, vol. 76, n° 7, doi: [10.1016/j.chemosphere.2009.04.045](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045), p. 932–937, ISSN 0045-6535. 102, 103
- LUSHCHAK, V. I. 2015, «Contaminant-induced oxidative stress in fish : a mechanistic approach», *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, n° 2, doi: [10.1007/s10695-015-0171-5](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5), p. 711–747, ISSN 1573-5168. 97, 102
- MELA, M., I. GUILOSKI, H. DORIA, M. RANDI, C. DE OLIVEIRA RIBEIRO, L. PEREIRA, A. MARASCHI, V. PRODOCIMO, C. FREIRE et H. S. DE ASSIS. 2013, «Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 93, doi: [10.1016/j.ecoenv.2013.03.026](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026), p. 13–21, ISSN 0147-6513. 100
- MENÉNDEZ-HELMAN, R. J., G. V. FERREYROA, M. DOS SANTOS AFONSO et A. SALIBIÁN. 2011, «Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 88, n° 1, doi: [10.1007/s00128-011-0423-8](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8), p. 6–9, ISSN 0007-4861. 100, 101
- MESA-HERRERA, F., D. QUINTO-ALEMANY et M. DÍAZ. 2019, «A Sensitive, Accurate, and Versatile Method for the Quantification of Superoxide Dismutase Activities in Biological Preparations», *Reactive Oxygen Species*, , n° December 2018, doi: [10.20455/ros.2019.809](https://doi.org/10.20455/ros.2019.809). 102
- MESNAGE, R. et M. N. ANTONIOU. 2017, «Facts and Fallacies in the Debate on Glyphosate Toxicity», *Frontiers in Public Health*, vol. 5, n° November, doi: [10.3389/fpubh.2017.00316](https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00316), p. 1–7, ISSN 2296-2565. 80
- MESNAGE, R., C. BENBROOK et M. N. ANTONIOU. 2019, «Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 128, n° January, doi: [10.1016/j.fct.2019.03.053](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053), p. 137–145, ISSN 0278-6915. 80
- MODESTO, K. A. et C. B. MARTINEZ. 2010, «Effects of Roundup Transorb on fish : Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity», *Chemosphere*, vol. 81, n° 6, doi: [10.1016/j.chemosphere.2010.07.005](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005), p. 781–787, ISSN 0045-6535. 100, 101
- DE MOURA, F. R., K. R. BRENTGANI, A. GEMELLI, A. P. SINHORIN et V. D. G. SINHORIN. 2017, «Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®», *Chemosphere*, vol. 185, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.07.030](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030), p. 445–451, ISSN 0045-6535. 103
- L NC, N. K., M. M. ISGOR, B. SENGUL et S. BEYDEMIR. 2013, «Influence of pesticide exposure on carbonic anhydrase II from sheep stomach», *Toxicology and Industrial Health*, vol. 31, n° 9, doi: [10.1177/0748233713475508](https://doi.org/10.1177/0748233713475508), p. 823–830, ISSN 0748-2337. 100

- NIKOLAKAKIS, S., P. BOSSIER, G. KANLIS, K. DIERCKENS et D. ADRIAENS. 2014, «Protocol for quantitative shape analysis of deformities in early larval European seabass *Dicentrarchus labrax*», *Journal of Fish Biology*, vol. 84, n° 1, doi: [10.1111/jfb.12284](https://doi.org/10.1111/jfb.12284), p. 206–224, ISSN 0022-1112. 95
- NORIN, T. et H. MALTE. 2012, «Intraspecific Variation in Aerobic Metabolic Rate of Fish : Relations with Organ Size and Enzyme Activity in Brown Trout», *Physiological and Biochemical Zoology*, vol. 85, n° 6, doi: [10.1086/665982](https://doi.org/10.1086/665982), p. 645–656, ISSN 1522-2152. 103
- OECD. 2019, *Test No. 203 : Fish, Acute Toxicity Test*, n° July dans OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD, ISBN 9789264069961, 1–9 p., doi: [10.1787/9789264069961-en](https://doi.org/10.1787/9789264069961-en). 79
- VAN DER OOST, R., J. BEYER et N. P. VERMEULEN. 2003, «Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, n° 2, doi: [10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6), p. 57–149, ISSN 1382-6689. 12, 95, 96, 102, 103
- ORR, H. A. 2009, «Fitness and its role in evolutionary genetics», *Nature Reviews. Genetics*, vol. 10, n° 8, doi: [10.1038/nrg2603](https://doi.org/10.1038/nrg2603), p. 531–539, ISSN 1471-0056. 95
- PAGLIA, D. E. et W. N. VALENTINE. 1967, «Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase», *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 70, n° 1, doi: [10.5555/uri:pii:0022214367900765](https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765), p. 158–169, ISSN 0022-2143. 102
- PALMA-BAUTISTA, C., J. VAZQUEZ-GARCIA, I. TRAVLOS, A. TATARIDAS, P. KANATAS, J. DOMÍNGUEZ-VALENZUELA et R. DE PRADO. 2020, «Effect of Adjuvant on Glyphosate Effectiveness, Retention, Absorption and Translocation in *Lolium rigidum* and *Coryza canadensis*», *Plants*, vol. 9, n° 3, doi: [10.3390/plants9030297](https://doi.org/10.3390/plants9030297), p. 297, ISSN 2223-7747. 80
- PÉDRON, N., J. L. DU, G. CHARRIER, J.-L. ZAMBONINO-INFANTE, N. L. BAYON, R. P. VASCONCELOS, V. F. FONSECA, F. L. GRAND et J. LAROCHE. 2017, «Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia», *Marine Environment Research*, vol. 129, doi: [10.1016/j.marenvres.2017.06.010](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010), p. 258–267, ISSN 1879-0291. 104
- PÉREZ-SÁNCHEZ, T., J. L. BALCÁZAR, D. L. MERRIFIELD, O. CARNEVALI, G. GIOACCHINI, I. DE BLAS et I. RUIZ-ZARZUELA. 2011, «Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 31, n° 2, doi: [10.1016/j.fsi.2011.05.005](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.005), p. 196–201, ISSN 1095-9947. 99
- PFÄFFL, M. W. 2001, «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR», *Nucleic Acids Research*, vol. 29, n° 9, doi: [10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45), p. 45e–45, ISSN 0305-1048. 99
- REHBERGER, K., I. WERNER, B. HITZFELD, H. SEGNER et L. BAUMANN. 2017, «20 Years of fish immunotoxicology - what we know and where we are», *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 47, n° 6, doi: [10.1080/10408444.2017.1288024](https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024), p. 516–542, ISSN 1040-8444. 97, 100

- SOKOLOVA, I. M. 2013, «Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors», *Integrative and Comparative Biology*, vol. 53, n° 4, doi: [10.1093/icb/ict028](https://doi.org/10.1093/icb/ict028), p. 597–608, ISSN 1540-7063. 97
- VAN STRAALLEN, N. M. et J. LEGLER. 2018, «Decision-making in a storm of discontent», *Science*, vol. 360, n° 6392, doi: [10.1126/science.aat0567](https://doi.org/10.1126/science.aat0567), p. 958–960, ISSN 0036-8075. 80
- SULUKAN, E., M. KÖKTÜRK, H. CEYLAN, Ş. BEYDEMİR, M. IŞIK, M. ATAMANALP et S. B. CEYHUN. 2017, «An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)», *Chemosphere*, vol. 180, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.04.018](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018), p. 77–85, ISSN 0045-6535. 100, 101, 102, 103
- TEODORESCU, D., M. C. MUNTEANU, A. C. STAIICU et A. DINISCHIOTU. 2012, «Changes in lactate dehydrogenase activity in *carassius auratus gibelio* (L. Pysces) kidney, gills and intestine induced by acute exposure to copper», *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 17, n° 6, p. 7873–7880, ISSN 1224-5984. URL <https://e-repository.org/rbl/vol.17/iss.6/18.pdf>. 103
- VERPOORTE, J. A., S. MEHTA et J. T. EDSALL. 1967, «Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 242, n° 18, doi: [10.1016/S0021-9258\(18\)95800-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95800-X), p. 4221–4229. 101
- VITALE, A., J. MONSERRAT, P. CASTILHO et E. RODRIGUEZ. 1999, «Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae)», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 122, n° 1, doi: [10.1016/s0742-8413\(98\)10094-4](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(98)10094-4), p. 121–129, ISSN 0742-8413. 100
- WEEKS SANTOS, S., B. CORMIER, N. MAZZELLA, B. BONNAUD, S. MORIN, C. CLÉRANDEAU, B. MORIN et J. CACHOT. 2019, «A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*», *Aquatic Toxicology*, vol. 216, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.105291](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291), p. 105 291, ISSN 0166-445X. 98
- WINDISCH, H. S., R. KATHÖVER, H.-O. PÖRTNER, S. FRICKENHAUS et M. LUCASSEN. 2011, «Thermal acclimation in Antarctic fish : transcriptomic profiling of metabolic pathways», *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 301, n° 5, doi: [10.1152/ajpregu.00158.2011](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00158.2011), p. R1453–R1466, ISSN 0363-6119. 103
- WU, Y.-H., Y.-H. LEE, H.-Y. SHIH, S.-H. CHEN, Y.-C. CHENG et D. T.-Y. CHIU. 2018, «Glucose-6-phosphate dehydrogenase is indispensable in embryonic development by modulation of epithelial-mesenchymal transition via the NOX/Snad3/miR-200b axis», *Cell Death & Disease*, vol. 9, n° 1, doi: [10.1038/s41419-017-0005-8](https://doi.org/10.1038/s41419-017-0005-8), p. 10, ISSN 2041-4889. 104

Chapitre 3

Impact du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel de génération F0

« La connaissance est pour l'humanité un magnifique moyen de s'anéantir elle-même. »

Friedrich Nietzsche

Sommaire

3.1	Introduction	116
3.2	Effet d'une exposition aiguë à une dose sublétales de glyphosate, seul ou co-formulé dans deux GBHs sur la santé de juvéniles de truite arc-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	116
3.2.1	Contexte	116
3.2.2	Objectifs / approche	116
3.2.3	Principaux résultats	117
3.2.4	Article	117
3.3	Impact d'une exposition prolongée de plus de 10 mois à une dose environnementale de glyphosate, seul ou co-formulé dans deux GBHs, sur les capacités de reproduction et la santé de la truite arc-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	128
3.3.1	Contexte	128
3.3.2	Objectifs / approche	128
3.3.3	Principaux résultats	128
3.3.4	Article	129

3.1 Introduction

Les études écotoxicologiques se concentrent très majoritairement sur des modes d'expositions chimiques directs, c'est-à-dire où les organismes testés sont mis en contact direct avec le contaminant étudié. Cette exposition directe peut se faire au travers des milieux où évoluent naturellement les organismes, tels que l'air ambiant ou l'eau (comme dans le cas de cette thèse), mais cette exposition peut aussi se faire, par exemple, via la nourriture ou par injection (p. ex. intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire). Le contact direct avec le contaminant est le mode d'exposition le plus fréquent, car il est, d'une part, le plus commun et le plus évident dans l'environnement, c.-à-d. les organismes au cours de leur vie sont exposés à une multitude de composés chimiques qui peuvent pénétrer des compartiments biologiques où leurs propriétés physico-chimiques font qu'ils vont induire ou non un ou des effet(s) biologique(s). D'autre part, ce mode d'exposition est le plus facile à étudier, notamment chez des organismes dont le temps de génération est long (p. ex. plusieurs mois à plusieurs années entre deux générations), puisqu'il ne nécessite pas l'exposition au préalable d'une ou plusieurs générations antérieures.

La première phase de cette thèse a consisté à s'intéresser aux impacts directs du glyphosate et des 2 GBHs sélectionnés sur la génération F0 au travers de 2 modes d'expositions : aiguë et chronique.

3.2 Effet d'une exposition aiguë à une dose sublétalement de glyphosate, seul ou co-formulé dans deux GBHs sur la santé de juvéniles de truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*

3.2.1 Contexte

De nombreuses études portant sur l'évaluation du risque environnemental associé au glyphosate ont eu recours à une évaluation de la toxicité aiguë sur des espèces modèles. Si les études de toxicité aiguë sont beaucoup utilisées pour leur facilité de mise en place et leur rapidité, elles nécessitent en revanche d'être complétées par une évaluation de la toxicité chronique, généralement plus représentative de la réalité environnementale. L'évaluation de l'impact d'une exposition aiguë chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, à une dose non létale de glyphosate ou d'herbicides à base de glyphosate constituait donc une première étape du projet GlyphoTAC avant les études portant sur la toxicité chronique.

3.2.2 Objectifs / approche

L'étude d'une exposition directe aiguë et sublétalement sur des truites juvéniles avait pour avantage de nous permettre de tester les différents paramètres biologiques mesurés avec une dose d'exposition chimique 500 fois supérieure à la dose utilisée dans les études d'exposition chronique du projet. Tout en restant non létale, une potentialisation des effets était supposée, permettant a priori de valider une

partie des outils expérimentaux (p. ex. paramètres biochimiques, challenge viral) qui allait être utilisée dans la thèse. Nous souhaitons également pouvoir proposer une comparaison entre les modes d'expositions aiguë et chronique, comparaison particulièrement pertinente pour les études d'évaluation du risque où une extrapolation des paramètres mesurés lors d'expositions aiguës est effectuée pour estimer les effets de la substance dans un contexte d'exposition chronique.

3.2.3 Principaux résultats

Les points clefs

- Une exposition aiguë sublétales suivie d'une épreuve d'infection virale a été étudiée chez des truites arc-en-ciel juvéniles.
- Aucune mortalité ni changement physiologique profond n'ont été observés à l'issue de la période d'exposition chimique.
- L'exposition chimique n'a pas altéré la capacité des truites à survivre face à une infection virale au virus *vNHI*.
- Des stress environnementaux, comme une infection virale, peuvent déclencher des perturbations physiologiques liées à une exposition au glyphosate.

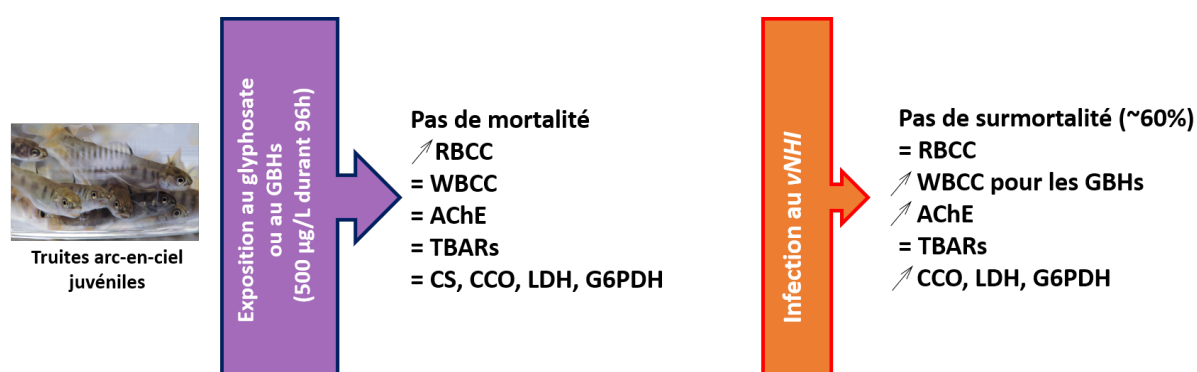


FIGURE 3.1 – Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de la génération F0 de truites adultes soumises à une exposition aiguë au glyphosate.

3.2.4 Article

Voir l'article publié dans le journal *Science of the Total Environment* pages 118-127 (10 pages).



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Immunological and metabolic effects of acute sublethal exposure to glyphosate or glyphosate-based herbicides on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*



Jessy Le Du-Carrée^{a,b,*}, Joëlle Cabon^a, Thierry Morin^a, Morgane Danion^a

^a French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Viral Fish Diseases Unit, 29280 Plouzané, France

^b UBO University of Western Brittany, Brest, France

HIGHLIGHTS

- Study of acute immunotoxicity of glyphosate and co-formulated glyphosate
- Rainbow trout was acutely exposed and then infected with a virus.
- Acute sublethal glyphosate exposure did not induce profound physiological changes.
- Chemical exposure does not alter the ability of rainbow trout to survive viral infection.
- Environmental stresses could trigger the effects of chemical exposure.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2020

Received in revised form 8 April 2021

Accepted 11 April 2021

Available online 20 April 2021

Editor: Yucheng Feng

Keywords:

Glyphosate
Rainbow trout
Energy metabolism
Immune function
Viral challenge

ABSTRACT

Glyphosate is a commonly used agrochemical active substance co-formulated in glyphosate-based herbicides (GBHs) whose environmental safety is still a subject of debate in the European Union. We evaluated the effects of acute sublethal exposure to glyphosate on rainbow trout by measuring changes in their metabolic and hemato-immunologic functions and their ability to survive a viral challenge. Juvenile fish were exposed for 96 h to 500 µg L⁻¹ of glyphosate through the active substance alone or two GBHs, Roundup Innovert® and Viaglif Jardin®, and fish were then infected with the infectious hematopoietic necrosis virus. Red and white blood cell counts (RBCC and WBCC), as well as several enzymatic activities (citrate synthase, CS; cytochrome-c oxidase, CCO; lactate dehydrogenase, LDH; glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH; acetylcholinesterase, AChE), were measured 96 h after chemical contamination (S1), and 96 h post-viral infection (S2). Mortality rates were monitored, and virus titers at the mortality peaks and seropositivity of the survivors were analyzed at 60 days post-viral infection (S3). Cumulative mortalities, viral titers, and seropositivity induced by virus infection were similar among conditions. Hematological analysis revealed significant increases of 30% for RBCC for Roundup at S1, and of 22% for WBCC at S2. No changes were observed in metabolic enzyme activities at S1. At S2, CCO and G6PDH activities were significantly higher than controls in all the chemically contaminated groups (+61 to 62% and +65 to 138%, respectively). LDH and AChE activities were increased for the Viaglif (p = 0.07; +55%) and for glyphosate and Roundup conditions (p < 0.05, +62 to 79%), respectively. Rainbow trout acutely exposed to glyphosate or GBHs presented no major physiological changes. Viral infection revealed disruptions, potentially modulated by co-formulants, of hematological and metabolic parameters, showing that it is essential to consider the stressful natural environment of fish in the chemical assessment.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Viral Fish Diseases Unit, 29280 Plouzané, France. E-mail address: jessy.ledu@anses.fr (J. Le Du-Carrée).

1. Introduction

Freshwater ecosystems play a critical role in maintaining both human and environmental health. They have important ecological functions, maintain high biodiversity and provide goods and services to human societies as a source of both food and water (Aylward et al., 2005). Water quality is impacted by chemical substances originating from human activities such as industry or agriculture (Martin-Ortega et al., 2015). Among them, agrochemicals, such as the widely used herbicide glyphosate, are a particular threat to their integrity and this trend could be increased in a context of global climate change, where different biotic and abiotic stressors might interact (Woodward and Perkins, 2015). Ecotoxicology aims to evaluate the impact of these chemical contaminants on ecosystems and to define regulatory limits that maintain the use of these compounds under sustainable levels (Bjørn et al., 2014). Glyphosate is the active substance (AS) of glyphosate-based herbicides (GBHs), which are the most commonly used pesticides worldwide. Concerns have been raised about its environmental safety (Vainio, 2020; Torretta et al., 2018) and re-registration of this compound and its associated commercial products is still the subject of debate at the level of the European Union (Székács and Darvas, 2018). While glyphosate shows low potential for bioaccumulation in animal tissues (European Food Safety Authority, 2015), low levels of this chemical are ubiquitously encountered in the environment and aquatic organisms are therefore continuously exposed. In France, from 2007 to 2017, glyphosate detection in surface water increased from 22.2 to 49.7% of sampling points analyzed, and the mean maximum annual concentrations quantified during this interval among all the sampling points ranged from 2.4 to 70.2 $\mu\text{g L}^{-1}$. However, the same report revealed that only one analysis among all sampling points in 10 years was higher than the reported value of Predicted No Effect Concentration (PNEC of 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, determined using both acute and chronic toxicity values) (Anses, 2019). These results for measured glyphosate concentrations are consistent with the Predicted Environmental Concentration (PEC) of 104.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ reported by the European Food Safety Authority (EFSA) when 'realistic worst-case' exposure scenarios are considered (European Food Safety Authority, 2015).

Toxic effects of acute glyphosate exposure have already been observed at several levels of biological organization. Acute exposure is defined as contact between the organisms (fish) used as indicators and the chemical to be tested, less than or equal to 96 h (OECD, 2019). This approach is rapid and convenient to define the dose inducing 50% mortality (LC50) in a specific species (OECD, 2012). LC50_{96 h} values comprised between 22 and >1000 mg L^{-1} for the AS and comprised between 4.2 and 52 mg L^{-1} for a GBH were determined for several fish species, including several Salmonidae (Giesy et al., 2000). In rainbow trout (RT), one of the most important farmed fish species in Europe and a relevant model in ecotoxicology, EFSA (European Food Safety Authority, 2015) recently reported an LC50 value of 38 mg L^{-1} . This LC50 value is at least about 362 times higher than the PEC calculated by EFSA, and acute exposure to glyphosate is therefore unlikely to have a significant environmental impact. For the present study, we chose a concentration of AS 76 times lower than the LC50 reported by (European Food Safety Authority, 2015) that would make it possible to detect changes specific to the glyphosate mode of action (MoA), rather than non-specific disruptions induced by high toxic stress. However, several studies have suggested that sublethal doses of glyphosate, administered as the AS or GBH, could induce biological or physiological alterations which might affect wild fish living in a complex and stressful environment (Kreutz et al., 2011; Loro et al., 2015; Modesto and Martinez, 2010; Félix and Saradhamani, 2015; Glusczak et al., 2006; Orun et al., 2013), impacting their thermal tolerance (Zebreal et al., 2018) or pathogen susceptibility (Kreutz et al., 2010). Immune toxicity of glyphosate has been demonstrated in certain *in vitro* assays (El-Gendy et al., 1998; Wang et al., 2020). Moreover, the fish immune system seems to be particularly influenced by exposure to pure glyphosate AS (Marchand et al., 2006;

Webster and Santos, 2015; Micah, 2016) or to GBHs (Kondera et al., 2018; Félix and Saradhamani, 2015; Kreutz et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010). However, studies linking disruptions of hemato-immunological parameters to pathogen susceptibility of exposed fish are still lacking. Energy metabolism is another critical function involved in the adaptation of an organism facing multiple stressors, e.g. by compensating for the increase in energy demand due to higher maintenance costs (Sokolova, 2013). Acute exposure of fish to GBHs shows direct or indirect effects of glyphosate and its co-formulants on energy metabolism (Erhunmwunse et al., 2014; Glusczak et al., 2006; Glusczak et al., 2007; Glusczak et al., 2011; Topal et al., 2015; Li et al., 2016) that could reveal a lower ability to adapt to and therefore face a pathogenic infection. The MoA of glyphosate and GBHs in non-target species is not yet well understood (Annett et al., 2014; Myers et al., 2016).

In this study, we evaluated the effects of acute sublethal exposure to glyphosate administered alone or through two GBHs on rainbow trout. Several physiological functions were investigated at different levels of biological organization. Moreover, a viral challenge was used to investigate the ability of glyphosate-contaminated trout to implement appropriate metabolic and immune responses to survive this infection.

2. Materials and methods

2.1. Fish maintenance

A total of 420 specific pathogen-free (SPF) juvenile rainbow trout (RT) four months old (Mean \pm standard deviation = 2.8 $\text{g} \pm 0.8 \text{g}$) from the protected and monitored fish facilities of the ANSES Plouzané Laboratory site (France) were used. The fish growth period was conducted in 12 tanks (30 L) positioned in a confined room, supplied with an open circuit with filtered river water and equipped with adapted aeration to maintain oxygen levels between 6 and 8 mg L^{-1} . Every morning, after fish care and tank maintenance, trout were fed with trout-specific food (Neo supra AL4, Le Gouessant®), at 1.5% of biomass. The same photoperiod (12 h of daylight) was maintained throughout the experiment. Water temperature during the chemical exposure was maintained at 15 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, while during the viral challenge water temperature was set to 11 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ to ensure a range within the thermal optimum of the virus.

2.2. Contaminants

Glyphosate (G; Sigma-Aldrich, ref. 45521, CAS Number 1071-83-6), Roundup Innovert® (R; Agrilisa) and Viaglif Jardin® (V; Agrilisa) were tested. G had a purity of 98%, while the concentration of R and V were 360 and 420 g L^{-1} of glyphosate, respectively. The nature and concentrations of the co-formulants of the two commercial products (R and V) are unknown, but they were formulated for two different uses. R was formulated for professional use, while V was formulated for home gardens. Concentrated solutions for each product (200 mg L^{-1}) were prepared and stored at room temperature and in dark conditions to perform the whole 96 h experiment.

2.3. Virus production and titration

The virus used for viral challenge was the N61 strain (genotype E) of the infectious hematopoietic necrosis virus, i.e. *IHNv*, isolated from diseased rainbow trout fry displaying typical signs of the disease. A 100 mL stock of virus was produced at 14 $^{\circ}\text{C}$ on an *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) cell line (Fijan et al., 1983) in Tris-buffered Stoker's medium (pH 7.6), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), as described by Dupuy et al. (2019). Once the cytopathic effect was complete, cell culture supernatant was centrifuged for 15 min at 2000 $\times g$ and stored at -80°C . The infectious titer of the viral production, determined using the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) end-point method in 96-microplate wells (Kärber, 1931), was 4×10^7 TCID₅₀ mL^{-1} .

2.4. Experimental design

2.4.1. Ethics statement

All animal studies were carried out in the approved infrastructure of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) at Plouzané (France; approval number D29-212-03), in strict accordance with the European guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare (European Union Directive 2010/63). All animal experimental procedures were analyzed by the ethics committee on animal experimentation ANSES/ENVA/UPC No. 16 and were authorized by the French Ministry of Research, under the number APAFIS#2018020115216522. Euthanasia involved the addition of a lethal dose of 100 ppm of Eugenol into the tank water.

2.4.2. Chemical exposure system

Four conditions of chemical contamination were tested in triplicate (i.e. a total of 12 tanks of 30 L; Fig. 1b). Each replicate included 150 rainbow trout as the chemically unexposed control (C), the group exposed to glyphosate AS (G), or exposed to GBHs, Roundup Innovert® (R) and Viaglif Jardin® (V). Chemical treatments were carried out for 96 h in semi-static river water, injecting a volume of 75 mL of each concentrated solution to obtain a final theoretical exposure concentration of 500 µg L⁻¹ of glyphosate (1b). Every 24 h, contaminated water was entirely renewed and chemical contamination was reproduced.

2.4.3. Viral challenge

After 96 h of chemical exposure, 99 fish for each chemical treatment (i.e. 33 fish per replicate of a condition) were randomly distributed in four 10 tanks with constant water renewal (i.e. three tanks were infected with the *IHNv* and one was used as the uninfected viral control; Fig. 1b). Infection was done by challenging fish for 3 h in a reduced volume of 1 highly oxygenated water with an infectious dose of 10⁴ TCID₅₀ mL⁻¹. Fish in viral uninfected control tanks were challenged in the same conditions with non-infected EPC cell supernatant.

During the viral challenge, general behavior, possible specific clinical signs of rhabdovirus, and mortality were recorded twice a day. Dead individuals were weighed and stored at -20 °C for viral examination.

2.5. Samples and sampling date

After the first exposure day, 150 mL of water were sampled in one replicated tank, before and after water renewal to quantify the glyphosate concentration in water and to ensure that chemical exposure was stable over 96 h. Samples of water were stored at -20 °C before the chemical analysis.

Three invasive sampling dates were performed in the four conditions, i.e. 96 h after the chemical exposure (S1; 15 fish per replicate of chemical treatment; n = 45), 96 h post-infection (S2; 15 fish per replicate of chemical treatment infected by *IHNv*; n = 45) and 60 days post-infection (dpi; S3; 5 survivors by replicate of chemical treatment; n = 15). For each fish, a blood sample was taken by withdrawing blood

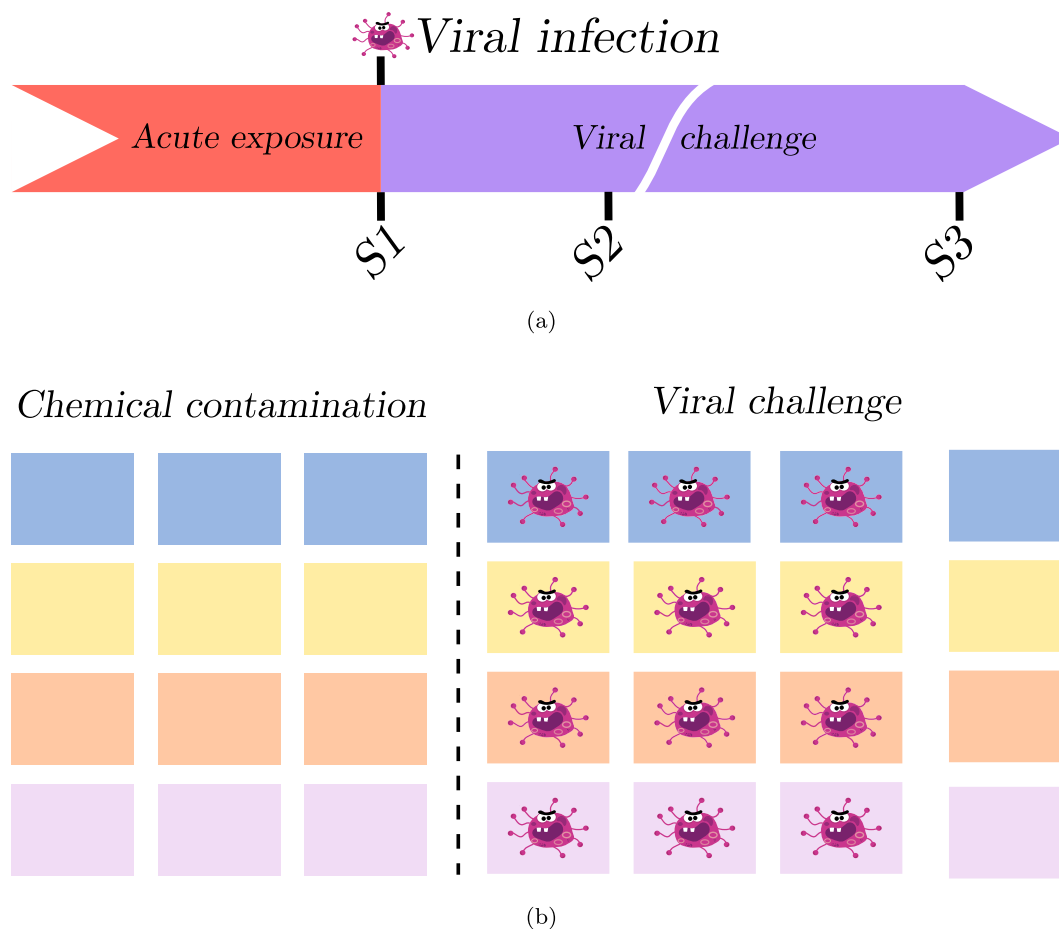


Fig. 1. Timeline (a) and experimental design (b). Fish were exposed for 96 h to clear water (in blue) or to 500 µg L⁻¹ of glyphosate through the AS (in yellow) or the two GBHs (R in orange and V in purple) (3 tanks of 30 L per condition, n = 150 by tanks). After acute exposure, 45 fish (15 fish per tank and condition) were sampled for analyses (S1). Residual fish were then distributed to 4 tanks of 10 per condition (n = 99 by tanks) for the viral challenge. Three tanks were infected with *IHNv* (virus symbol) and the last one was used as a non-infected control. 15 fish per tank (45/condition) were sampled at 96 h post-infection (S2). Survivors were sampled at 60 dpi (S3) and then euthanized. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

from the caudal vein with a lithium heparin hematocrit tube (Greiner ref. KG454244). At S1 and S2, 5 μL of whole blood was used for hematological analyses. At S3, 50 μL of whole blood was sampled and then centrifuged (1200 $\times g$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) and only plasma was stored at -80°C for serological analysis. At S1 and S2, whole fish bodies were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for future analyses.

2.6. Chemical and biological parameters

2.6.1. Chemical parameters

Quantification of glyphosate using direct competitive ELISA assay (Novakits, ref. 1500086) was done before and after the water renewal, following the supplier's instructions. Briefly, the river water was first filtered at 0.2 μm (Clearline ref. 146560), 250 μL of the filtrate was derivatized with 100 μL of the derivation solution provided in the kit. Then, 50 μL was transferred to wells in a microplate coated with goat anti-rabbit antibodies and 50 μL of the reagent containing rabbit anti-glyphosate antibody was added. A competitive reaction for binding sites (between glyphosate and glyphosate enzyme conjugate) was started by the addition of 50 μL of enzyme conjugate solution for 1 h. After a washing step using $3 \times 250 \mu\text{L}$, 150 μL of the substrate solution was added into the wells and the colored reaction was stopped after 25 min by adding 100 of the stop solution. Plates were read at 450 nm on a TECAN Spark 10M microplate spectrophotometer. The development of color is inversely proportional to the concentration of glyphosate in the sample. Standard curves were generated using the four-parameter log-logistic function, LL4, of the R package "drc" (Seber and Wild, 1989). Quantification was done by reporting the OD value obtained for the sample to the quantification standard curve obtained for each assay.

Quantification of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) by HPLC/fluorometric methods (Method ref. ANA-I10.MOA.69. B) was done by an external provider (Laboceca, France) only after the first water renewal and recontamination, in one tank per condition.

2.6.2. Viral examination in fish

The presence and concentration of virus were checked individually from 3 dead fish collected at the peak of mortality, by replicate of chemical conditions. Extracted and pooled organs (kidneys, spleen, heart, and brain) were crushed using a mortar and pestle, diluted to 10^{-1} with Stoker's medium, and centrifuged for 15 at 1500 $\times g$ at 4 $^{\circ}\text{C}$. The supernatant was then diluted to 10^{-11} , and the virus concentration was determined for each fish, as described in Section 2.3.

2.6.3. Immune parameters

At S1 and S2, counting of red and white blood cells was performed on a Thoma cell hemocytometer using whole blood diluted to 1/200 in Giemsa solution (Kecic and Ivanc, 1982). The alternative pathway of plasma complement activity was measured according to Danion et al. (2012). Results were expressed using the formula described by Costabile (2010). At S3, the detection and semi-quantification of anti-IHNv antibodies in the plasma of surviving fish were performed using a modification of the procedure of Jorgensen et al. (1991) described by Dupuy et al. (2019).

2.6.4. Bio-marker, oxidative stress, and metabolic parameters

Each assay measurement was performed in triplicate. Whole fish were dry-homogenized using the tissue homogenizer Precellys 24 (Bertin Technologies, France) and homogenates were then diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8). Colorimetric analysis was carried out on a TECAN Spark 10M microplate spectrophotometer. Choline esterases (ChE), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), citrate synthase (CS), cytochrome-c oxidase (CCO), lactate dehydrogenase (LDH), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were measured following procedures described by Pédrón et al. (2017) and Gauthier et al. (2008).

Enzymatic activities were calculated using the slope of the optical curve density = $f(\text{time})$ and the Beer-Lambert law ($A = \epsilon lc$) for ChE, CS, CCO, LDH and G6PDH (with molar extinction coefficient, ϵ , of 13.6, 13.6, 21.84, 6.22 and 6.22 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ respectively); and with a calibration curve for TBARS. Calibration curves were generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich ref. T9889) for the TBARS assay. Protein concentrations were measured in all organs using the Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific), and results are expressed in specific activities (IU mg^{-1}).

2.7. Data processing and statistical analyses

Data processing and statistical analyses were conducted with R software (R Core Team, 2018). Figures were produced using the ggplot2 package (Wickham, 2016). All the data were tested for normality and homoscedasticity. In the case of normal and homoscedastic data, one-way Anova tests were used to compare means, followed by a post-hoc test of Dunnett (1955). In the case of normal and heteroscedastic data, modified one-way Anova tests were used to compare means (Welch, 2012), followed by a post-hoc test of Tamhane-Dunnett (OECD, 2006). In the case of non-normal data, a Kruskal-Wallis test was used to compare means, followed by a post-hoc test of Dunn (1964). Differences between proportions of seropositive individuals between chemical treatments were compared using a Chi-squared test. A p -value of 0.05 was used as the threshold for statistical significance. A test of correlations between variables was carried out using the correlation of Pearson. Mortality rates for the different chemical treatments were compared using the "survival" package (Therneau, 2015) by following the procedure described by Doumayrou et al. (2019). Restricted mean survival time, an integrated parameter representing both the dynamics and the intensity of mortality (Therneau, 2015), was calculated using the "survival" package.

3. Results

3.1. Determination of glyphosate concentrations during acute contamination

Glyphosate and AMPA were not detected in control tanks, and AMPA was not detected in any of the contaminated samples analyzed. Concentrations of glyphosate were between 427.82 and 497.77 $\mu\text{g L}^{-1}$ for all conditions in the contaminated tanks at the end of the first 24 h of contamination, but also after water renewal and re-contamination using an ELISA assay, except for the Roundup condition where a higher concentration (728.35 $\mu\text{g L}^{-1}$) was detected after re-contamination. Quantifications done by HPLC yielded similar concentrations, between 428.80 and 477.00 $\mu\text{g L}^{-1}$. Regardless of the method considered and excluding the value of 728.35 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtained using ELISA for the Roundup condition, glyphosate concentrations obtained in contaminated tanks did not show a difference greater than 15% from the expected values (i.e. 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). (Table 1).

Table 1

Concentrations of glyphosate ($\mu\text{g L}^{-1}$) measured in water tanks using ELISA ($n = 2$) and HPLC ($n = 1$) methods. ELISA values are expressed as mean \pm standard error. nd = non-detected; nm = non-measured.

Sampling	Condition	Glyphosate concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
		ELISA	HPLC
After 24 h of exposure	C	nd	nd
	G	460.48 \pm 77.92	nm
	R	497.77 \pm 11.55	nm
	V	427.82 \pm 4.45	nm
After water renewal and recontamination	G	464.48 \pm 53.15	477
	R	728.35 \pm 12.15	466
	V	442.70 \pm 26.30	428.8

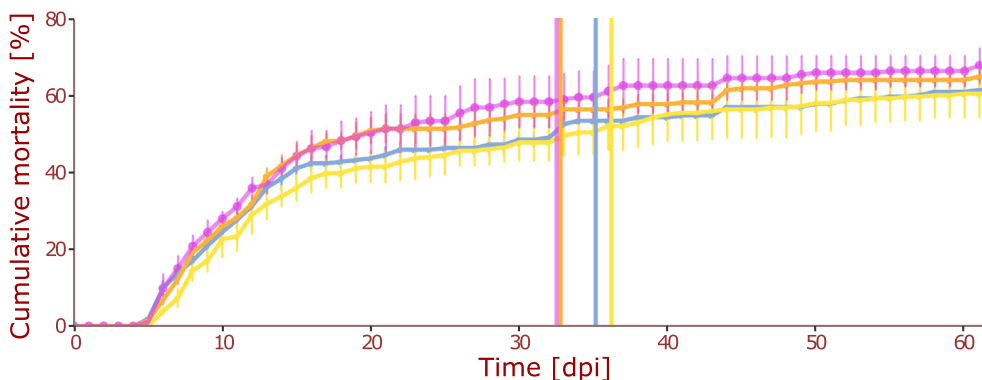


Fig. 2. Kinetics of cumulative mortality in fish exposed to chemical contamination and infected with *IHNv*. Data are expressed as a function of time in days post-infection (dpi) for the glyphosate (G, in yellow), Roundup (R, in orange), Viaglif (V, in purple) and control (C, in blue) groups. Error bars represent standard errors, vertical bars the restricted mean survival time (RMST). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. Survival rates during chemical exposure and viral challenge

No mortality was recorded during the 96 h exposure period to glyphosate and GBHs. During the viral challenge, while no mortality occurred in the non-infected control fish, mortality in infected tanks began overall at 4 or 5 dpi. At 60 dpi, cumulative mortality (mean ± se, n = 3) reached 61.8 ± 0.9% for the control, 60.4 ± 6.2% for glyphosate, 64.9 ± 2.2% for Roundup, and 67.8 ± 4.5% for Viaglif (Fig. 2), without significant differences in mortality between groups. Slightly faster and higher mortality was observed in fish exposed to Roundup and Viaglif, with shorter restricted mean survival times (RMST) of (mean ± se, n = 3) 33 ± 1.0 and 31 ± 2.6 dpi respectively, compared to 35 ± 0.7 and 36 ± 3.0 dpi for the control and glyphosate conditions.

Maximum daily mortality (i.e. peak mortality) was observed at 6 dpi for the control and Viaglif, and at 8 dpi for glyphosate and Roundup. A second mortality peak was observed between 12 and 13 dpi particularly for Roundup and to a lesser extent for the control and glyphosate. Pools of infected fish that had died at the first mortality peak were all positive to *IHNv* for the control and Roundup conditions, 2/3 and 1/3 of fish were positive for the glyphosate and Viaglif conditions, respectively (Table 2). The viral titers were not drastically different among conditions of chemical contamination but presented a high variance among analyzed pools.

3.3. Immune parameters

After 96 h of acute exposure to glyphosate (S1), RBCs were increased with the AS and the two GBHs compared to the control, particularly for fish exposed to Roundup with a significant rise of 35% (p < 0.05; Fig. 3a). WBCCs did not vary significantly, regardless of the chemical contamination (Fig. 3b).

After 96 h of viral infection (S2), no significant differences were measured in the RBCs between controls and exposed fish. WBCCs in fish exposed to Viaglif were significantly higher than controls (22%; p < 0.05).

At 60 dpi (S3), similar proportions from 67 to 80% of the survivor fish analyzed by condition were seropositive for *IHNv* (Table 2). The control

Table 2
Proportion of *IHNv*-positive pools of fish exposed to glyphosate (G, in yellow), Roundup (R, in orange), Viaglif (V, in purple) and control (C, in blue), and mean viral titers measured at the mortality peak (mean ± standard-error, n = 3).

Parameter	Condition			
	C	G	R	V
Proportion of <i>IHNv</i> -positive fish	3/3	2/3	3/3	1/3
<i>IHNv</i> titer	4.86 × 10 ⁴ (4.37 × 10 ⁴)	7.12 × 10 ⁴ (6.48 × 10 ⁴)	4.58 × 10 ⁵ (4.51 × 10 ⁵)	6.32 × 10 ⁵

and glyphosate conditions were characterized by percentages of highly *IHNv* seropositive fish (i.e. presenting an antibody titer greater than 640), which was higher than but not significantly different from the GBHs, with 70 and 64% versus 50 to 55%, respectively (Table 3). Antibody titers of highly *IHNv* seropositive fish presented a high variance for each condition, without any differences between their means (Table 3).

3.4. Oxidative stress and metabolic parameters in whole fish

No significant differences were observed in CS, CCO, LDH, and G6PDH activities after the 96 acute exposure period to glyphosate and GBHs. After the viral infection, CCO activities were significantly higher in all the chemically contaminated groups (p < 0.05), with differences of 61, 62, and 61% with the control group for glyphosate, Roundup, and Viaglif, respectively (Table 4). LDH activities showed a tendency to increase in fish exposed to contaminants compared to the control, but this increase was only significant for Viaglif (+55%; p < 0.05; Table 4). Interestingly, the Viaglif tank associated with lower LDH activity also presented low mortality, and when all replicates were put together (i.e. infected fish in all chemical exposure conditions taken together), a moderate correlation was observed between LDH activity and mortality (Pearson's correlation = 0.55, p = 0.07). The ratio between LDH and CS activities presented high variability, regardless of the chemical condition and the sampling time considered. No significant differences were observed between the treatments before and after the viral challenge. Ratios were comprised between 471 and 528% after the chemical contamination, and between 611 and 777% 96 h after the viral infection. The ratio between CS and CCO activities was significantly higher in fish contaminated by Roundup after 96 h of chemical exposure (p < 0.05) compared to the other conditions (128% for the control compared to 150% for the Roundup condition, a difference of 17%). After the viral infection, this parameter presented differences of 26, 27, and 32% for glyphosate, Roundup and Viaglif compared to the control (p < 0.05), respectively. Ratios were comprised between 121 and 136% for chemically contaminated fish and equal to 190% for the controls. G6PDH activities in infected fish exposed to glyphosate and GBHs were increased compared to the controls. This tendency was particularly marked in GBH conditions, with observed differences of 126 and 138% for Roundup and Viaglif (p < 0.05), respectively (Table 4). TBARS concentration was not significantly different among conditions either after the acute chemical exposure or the viral infection.

No significant differences were observed in AChE activities between fish after the 96 h of acute chemical contamination. The enzymatic activity was increased in glyphosate and Roundup conditions after the viral challenge, by 62 and 79%, respectively, compared to the control (p < 0.05) (Fig. 4).

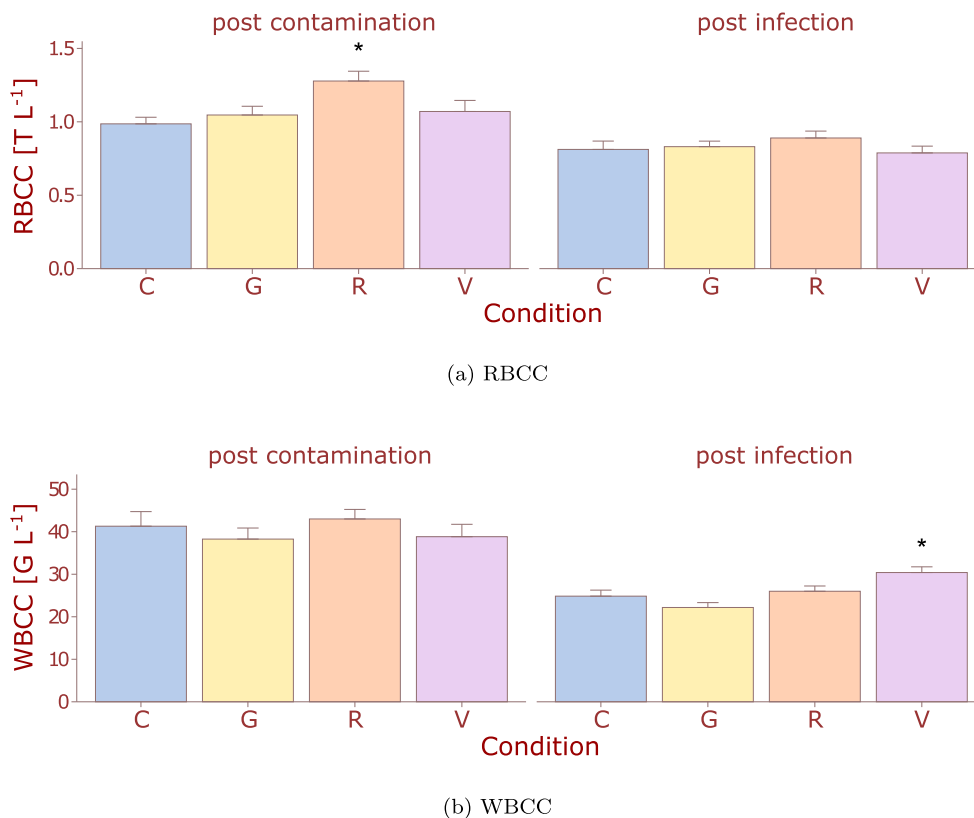


Fig. 3. Barplot representing mean red blood cell count (RBCC) and mean white blood cell count (WBCC) in fish exposed to glyphosate (G, in yellow), Roundup (R, in orange), Viaglif (V, in purple) and control (C, in blue) at S1 (post contamination) and S2 (post infection). Standard errors are represented at the top of each bar ($20 \leq n \leq 33$). Statistically significant differences from the control mean are indicated with “*” ($p < 0.05$); comparisons were made between groups at the respective sampling times. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

This study was designed to evaluate the impact of acute exposure to a sublethal concentration of glyphosate on RT, integrating a comparison of the effect of the AS alone or associated with co-formulants in two GBHs.

Glyphosate concentrations during chemical exposure were close to $500 \mu\text{g L}^{-1}$, regardless of the contaminants used, except in the Roundup tank where the concentration was 46% higher than the expected value. This might be explained by early sampling of water, before complete homogenization of the concentrated solution in the tank volume. The ELISA method, which is practical and not expensive, appears to yield results similar to the HPLC method in most cases, except one probable overestimation potentially due to interference between water components and chemicals used in the assay. In this project, water used to supply the fish tanks did not contain glyphosate or AMPA at detectable levels and AMPA was not detected in contaminated tanks. The dose

Table 3

Proportions of seropositive and highly seropositive fish and mean anti-*IHNv* antibody titers (mean \pm standard-error, $n = 15$) at 60 dpi (S3) in fish previously exposed to glyphosate (G), Roundup (R), Viaglif (V) and control (C). The proportion of highly seropositive fish corresponds to the ratio between the number of fish with a titer ≥ 640 and the total number of seropositive fish. Mean antibody titers were calculated for highly seropositive fish only.

Parameter	Condition			
	C	G	R	V
Proportion of seropositive fish	10/15	11/15	11/15	12/15
Proportion of highly seropositive fish (%)	70	64	55	50
Anti- <i>IHNv</i> antibody titer	1189 (259)	914 (129)	2240 (656)	1280 (405)

selected for acute testing, i.e. $500 \mu\text{g L}^{-1}$, is unlikely to be encountered in Europe since the estimated global maximum PEC for surface water reported by EFSA is $104.81 \mu\text{g L}^{-1}$ (European Food Safety Authority, 2015). However, this concentration might be environmentally relevant in countries where the cultivation of genetically modified glyphosate-resistant crops is authorized (Bruggen et al., 2018). Also, the scenario of acute exposure to glyphosate or GBHs is more likely when glyphosate

Table 4

Mean specific activities and TBARS levels measured in fish exposed to glyphosate (G), Roundup (R), Viaglif (V) and control (C) at S1 (post contamination) and S2 (post infection). Standard errors are represented in parentheses under each respective mean ($9 \leq n \leq 15$ at S1 and $7 \leq n \leq 15$ at S2). Specific activities are expressed in of protein and TBARS levels in of protein. The numbers in bold with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$) from the values obtained for the control condition at the same sampling time.

Sampling	Condition	Enzymatic parameters				
		CS	CCO	LDH	G6PDH	TBARS
post conta.	C	0.39 (0.024)	0.31 (0.024)	2 (0.14)	0.0121 (0.0013)	0.43 (0.097)
	G	0.42 (0.034)	0.31 (0.0167)	1.95 (0.2)	0.0156 (0.0017)	1.72 (0.65)
	R	0.41 (0.021)	0.27 (0.011)	2.25 (0.43)	0.016 (0.0016)	0.88 (0.36)
	V	0.33 (0.021)	0.28 (0.015)	1.57 (0.083)	0.014 (0.00099)	0.71 (0.31)
post inf.	C	0.26 (0.021)	0.15 (0.014)	1.5 (0.1)	0.0046 (0.0016)	0.86 (0.31)
	G	0.33 (0.023)	0.24* (0.0065)	1.8 (0.17)	0.0076 (0.002)	0.59 (0.16)
	R	0.32 (0.023)	0.24* (0.017)	2.03 (0.2)	0.01* (0.0013)	0.84 (0.45)
	V	0.29 (0.016)	0.24* (0.013)	2.33* (0.204)	0.011* (0.00132)	0.38 (0.043)

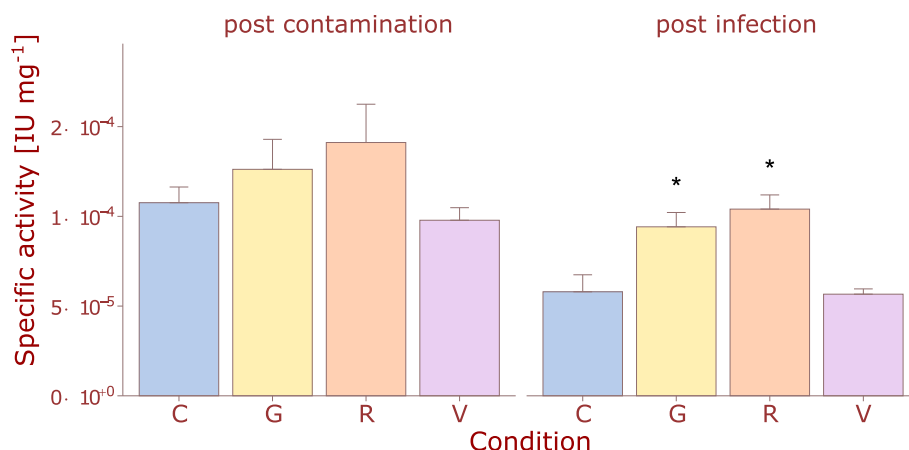


Fig. 4. Mean specific enzymatic activities of AChE in fish exposed to glyphosate (G, in yellow), Roundup (R, in orange), Viaglif (V, in purple) and control (C, in blue) at S1 (post contamination) and S2 (post infection). Enzymatic activity is expressed in of protein. Standard errors are represented at the top of each bar ($n = 15$ for sample post contamination and $8 \leq n \leq 15$ post infection). Significant differences from control means are indicated with “*” ($p < 0.05$); comparisons were made between groups at the respective sampling times. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

is directly sprayed into the aquatic environment (e.g. algae control (Gonçalves et al., 2019; Giesy et al., 2000)).

At this concentration, the AS associated or not with co-formulants did not induce mortality after 96 h of acute exposure. The exposure dose is relatively low compared to the resistance of rainbow trout to acute contamination by glyphosate or GBHs (European Food Safety Authority, 2015; Giesy et al., 2000). Effects observed in this configuration probably result from specific effects, directly related to the MoA of glyphosate and its co-formulants, rather than general cell or organism dysfunction typically induced by an excessively high test dose. Thus, our experimental design was able to reveal the sublethal effects of glyphosate exposure in rainbow trout.

The innate and specific immune systems play a fundamental role in intensive aquaculture and the natural environment where fish are threatened by a large diversity of pathogens (Collet, 2014). Several studies have reported the effects of pollutants on fish immune functions (reviewed by Rehberger et al. (2017)). Nevertheless, except for findings at low levels of biological organization, such as the molecular (Marchand et al., 2006; Webster and Santos, 2015) or cellular levels (Micah, 2016; Kondera et al., 2018; Félix and Saradhamani, 2015; Kreutz et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010), only few data are available on the effects of glyphosate on overall immune system functioning. Nonetheless, studies using pathogens with direct fish infections after a period of chemical exposure are particularly useful to detect the immunotoxic effects of chemical contaminants (Rehberger et al., 2017). To our knowledge, no studies using viral challenge after exposure to glyphosate or GBHs are available in the literature. (Kreutz et al., 2010) have already shown that acute exposure of silver catfish fingerlings, *Rhamdia quelen*, to $730 \mu\text{g L}^{-1}$ of a GBH induced changes in immune cells and consequently higher susceptibility to the bacterium *Aeromonas hydrophila*.

In our study, detection of the virus in fish that died during the challenge confirms the efficiency of the infection process, even though differences in the number of *IHNv* positive individuals were observed depending on the conditions. These differences are probably associated with infectivity loss of some samples induced by poor conservation of fish upstream of the cell culture. This hypothesis is supported by the high seropositivity rates for *IHNv* measured in the survivors, evidence of efficient entry of the virus. The frequency of seropositivity observed in trout was not impacted by chemical exposure. Despite this, the proportion of highly seropositive fish tended to be lower in conditions with GBH exposure (no statistical significance). Consequently, further studies could provide evidence that GBHs reduce the specific immune response of fish. On the other hand, the dynamics and intensity of mortality were very similar between control fish and those contaminated with the AS. However, slight differences in the dynamics of mortalities

(i.e. faster mortalities) and survival rates (i.e. higher mortalities) were observed for fish exposed to GBHs, particularly to Viaglif, but without statistical significance. These results are, therefore, different from those reported by Kelly et al. (2010) and Kreutz et al. (2010) who found increased pathogen susceptibility of fish due to co-formulated glyphosate exposure at concentrations of AS close to ours. Also, it is important to note that in our experiment, fish were not chemically exposed during the viral challenge (only before), and survival following the viral infection might be more strongly affected when fish are both exposed to the virus and chemical contaminants. The slight tendencies we observed will have to be confirmed to determine whether, when using higher concentrations (particularly with exposure during the viral challenge) or longer exposure times and testing other viral species, some co-formulants may influence the survival of fish facing viral infection.

Another study, where fish were not exposed to a pathogen, has shown that 7 days of exposure of common carp, *Cyprinus carpio*, to a GBH, at concentrations corresponding to 0.5 and 5.0 mg/L of glyphosate, induced immunosuppression balanced by a compensatory response of the hematopoietic system (Kondera et al., 2018). Hematology and more specifically, cellular numeration, are often used to evaluate effects induced by pollutants on fish (Burgos-Aceves et al., 2019). In our experiment, the 96 period of chemical contamination induced an increase in RBCs in fish exposed to Roundup. This result was previously reported for the neotropical fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to 5 mg L^{-1} but not to 1 mg L^{-1} (Modesto and Martinez, 2010). This increase, not triggered by pure glyphosate or Viaglif, could be a protective response to the toxic effect of the specific Roundup formulation or a result of detoxification of the chemical compounds included in this formulation. Also, alone, the chemical contamination had no impact on the leukocyte counts, but a significant increase was observed for the Viaglif condition after the viral infection. Interestingly, when the WBCs were compared overall before and after the viral infection, leucopenia was observed after the infection with *IHNv*. This leucopenia is not commonly observed under a viral infection challenge in rainbow trout (Amend and Smith, 1975). In conclusion, blood cell counts revealed that depending on the viral status of the fish, co-formulated products can change the cellular parameters in rainbow trout, but this fact was not observed in the case of exposure to pure glyphosate.

A potential MoA is the inhibition of AChE, demonstrated in vitro (El-Demerdash et al., 2001) and in vivo (Cattaneo et al., 2011; Menéndez-Helman et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010; Gluszcak et al., 2006; Gluszcak et al., 2007), which could induce oxidative stress leading to other physiological dysfunctions in cells and organisms (Cattaneo et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010). However, concentrations of

glyphosate that inhibit AChE activity are in most cases higher than those found in the environment. Under the experimental conditions of this study, 96 h chemical contamination activated AChE in fish exposed to glyphosate and Roundup, and this tendency became statistically significant after the viral infection. This result is surprising because the majority of studies report that glyphosate, associated or not with co-formulants, have been shown to inhibit fish AChE at concentrations ranging from 0.2 to 20 mg L⁻¹ for GBH (Cattaneo et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010; Gluszcak et al., 2006; Gluszcak et al., 2007) and from 1 to 30 mg L⁻¹ for pure glyphosate (Menéndez-Helman et al., 2011). However, Cattaneo et al. (2011) have observed in the common carp exposed 96 h to a GBH at a glyphosate concentration between 0.5 and 10 mg L⁻¹, a first inhibition phase of AChE followed by activation in the brain after 96 h of recovery. An exposure of males guppies, *Poecilia vivipara*, and *Astyanax* sp. to 130 µg L⁻¹ and approximately 1 and 2 mg L⁻¹ of glyphosate formulated in a GBH, respectively also induced a non-statistically significant increase of AChE in the brain and/or muscle (H. et al., 2013; Rossi et al., 2011). Thus, it could be possible that exposure to glyphosate and GBHs has an inhibitory action on ChE, but that the increased levels observed result from a response of fish to counteract the effect of contaminants. However, this effect of glyphosate, observed on AChE, does not appear to be impacted by the Roundup formulation, but some co-formulant of Viaglif seemed to counteract this effect. The activation of AChE, observed here, more probably reflects an indirect effect of the contamination due to changes in some metabolic processes associated with both chemical contamination and viral infection because as suggested by Payne et al. (1996), AChE activity is positively correlated with the global activity of fish.

Viral infection tends to globally decrease the levels of AChE activity in comparison to levels observed post-contamination. Increased expression of AChE transcripts concomitant to a reduction of a specific subunit of a nicotinic receptor of acetylcholine have been demonstrated in adult zebrafish, *Danio rerio*, exposed to a virus, with potential involvement in behavioral fever (Boltaña et al., 2013). However, Eder et al. (2007) have shown that *IHNv* infection does not impact levels of AChE in *Oncorhynchus tshawytscha* exposed or not to the herbicide chlorpyrifos. Biotic or abiotic stresses have already been correlated to a loss of AChE activity (Hodson, 1997). The infection protocol we used in this study is stressful and probably also contributed to the decrease in AChE activity.

Several studies have reported direct or indirect effects of acute exposure of fish to glyphosate and some co-formulants on energy metabolism (Erhunmwunse et al., 2014; Gluszcak et al., 2006; Gluszcak et al., 2007; Gluszcak et al., 2011; Topal et al., 2015; Li et al., 2016). Energy metabolism has a fundamental function in the adaptation of an organism facing multiple stressors, e.g. by allowing the individual to compensate for the increase in energy demand due to a higher maintenance cost (Sokolova, 2013). These effects on metabolism are observed at different levels of organization after glyphosate exposure associated or not with co-formulants. Li et al. (2016) have shown a reduction in the use of glucose in goldfish, *Carassius auratus*, after 96 h of exposure to a GBH, indicating a potential blockage of glycolysis and/or the Krebs cycle, and thus a reduction of ATP production. This observation was associated with enhanced catabolic energy production (i.e. accelerated fatty acid oxidation) and the activation of creatine phosphate-based ATP regeneration. At the tissue level, the impact on food absorption could be triggered by histologic damage (Erhunmwunse et al., 2014). Increased protein catabolism due to higher energy demand is also suspected to be involved (Gluszcak et al., 2007), and modifications in energy storage (Gluszcak et al., 2006), lactatemia, and glycemia (Gluszcak et al., 2011) have been reported. Moreover, changes in energy metabolism have been pointed out by proteomic analysis in the gill of the guppy, *Poecilia reticulata*, exposed for 24 h to a sublethal dose of GBH (R et al., 2015). The authors hypothesized that inhibition of alpha-enolase observed in contaminated fish could be related to alternative energy metabolisms

engaged to counteract the hypoxia induced by gill structure alterations. Using the same experimental design dos Santos et al. (2017) showed that GBH exposure increases the production of a cytochrome-c oxidase sub-unit in the liver, a key organ in the detoxification process. These metabolic changes could impact the physiological performances of fish, affecting biological fitness-related functions such as food intake (i.e. growth), escape from predators (i.e. survival), and reproduction. These types of impacts at the organism level have been observed for rainbow trout exposed to a GBH, with decreased swimming performance potentially attributed to systemic impact (e.g. reduced aerobic scope due to increased maintenance cost) or to a specific mechanism of toxicity (e.g. impact on muscular activity) (Topal et al., 2015).

No statistically significant changes in the activities of metabolic enzymes were observed after 96 h of contamination in our RT. In other fish species, rapid changes (i.e. 1–24 h) were reported in response to thermal stress (Hodson, 1997) and it is therefore probable that the concentration of glyphosate we used could have been insufficient to induce re-organization of energy metabolism and thus a need to adapt enzymatic activities. In silver catfish, exposed to a concentration of 0.4 mg L⁻¹ of glyphosate, metabolic disruptions were expressed differently as a function of the tissues considered (Gluszcak et al., 2007). Also, sub-chronic exposure to glyphosate and GBHs at lower concentrations (i.e. <0.1 mg L⁻¹) up-regulated pathways implicated in energy metabolism in the brown trout, *Salmo trutta* (Webster and Santos, 2015). Metabolic effects in a specific tissue could be masked by the fact that, in our study, we gave priority to a measure of whole-body response and were not able to detect tissue variations. Increased CS:CCO ratios were observed in our rainbow trout after their contamination by Roundup, in accordance with Pereira et al. (2018) who have shown that co-formulated glyphosate at concentrations comprised between 0.065 and 10 mg L⁻¹ induced disruption of the mitochondrial respiratory chain (Ibarz et al., 2010). However, LDH:CS ratios indicate that there was not greater use of anaerobic metabolism to compensate for a possible reduction in aerobic metabolism efficiency.

The viral challenge represents supplementary stress added to chemical contamination. This context of multi-stress could generate toxic effects of glyphosate (co-formulated or not) which could not be detected with the chemical contamination alone. Viral infection with *IHNv* led to a rapid reduction in the activities of all the metabolic enzymes tested, except for LDH in the Viaglif condition. This overall metabolic decrease could be the result of prioritization of metabolic pathways essential to the anti-infectious response. Ibarz et al. (2010) reported a modification of the allocation of the energy and lipid metabolism in rainbow trout infected by the viral hemorrhagic septicemia virus and the Gram-negative bacterium *Aeromonas salmonicida*. This reduction could also be interpreted as an overall metabolic depression resulting from the intense stress due to the viral infection, associated or not with the chemical contamination (Sokolova, 2013). After the viral infection, the enzyme CCO presented a moderate but significant increase in contaminated fish that could indicate higher aerobic metabolism in fish exposed to glyphosate. Moreover, this effect was not affected by the presence of co-formulants. The reduced CS:CCO ratio in contaminated fish could indicate that the activity in the mitochondrial matrix increased less than the activity in the membrane (Ibarz et al., 2010). After the viral infection, LDH activity was also increased in chemically contaminated fish but this tendency was stronger for fish exposed to GBHs, indicating an increase in the anaerobic metabolism potentially exacerbated by co-formulants of the GBHs. Also, the slight increase of the LDH:CS ratios revealed that fish exposed to GBHs increased their use of anaerobic metabolism compared to aerobic metabolism. G6PDH plays a role in protection against oxidative damage and is also considered a relevant marker of anabolism (Pédron et al., 2017). In the present study, the activity of this enzyme was increased, in chemically contaminated fish exposed to the virus. It may have been associated with a need to supply NADPH to maintain redox homeostasis, due

to both chemical and viral stresses (Wu et al., 2018). This could also indicate that anabolism was higher in contaminated fish compared to controls. TBARS levels appear to be poorly informative of the oxidative stress that occurred in the exposed fish because means were highly influenced by extreme values, suggesting that interfering compounds present in the whole fish could have affected the assay. Information in the literature regarding levels of TBARS resulting from acute exposure of fish to GBHs is quite confusing and might depend on the organ, the concentration of glyphosate, and the species considered, although GBH seems to be able to increase lipid peroxidation in the liver of exposed fish (Gluszczak et al., 2011; Sinhorin et al., 2014; Murussi et al., 2016).

5. Conclusions

Some controversy still exists around the regulation of glyphosate based-herbicides, mainly due to the integration of the effects of co-formulants in the risk assessments of these very widely used products. It remains difficult to differentiate between the effects of pure glyphosate and those of GBHs. This study demonstrated that acute exposure to a concentration of 0.5 of glyphosate alone or associated with co-formulants in two GBHs did not induce drastic toxic effects on the physiology of rainbow trout. Only limited effects were observed for fish exposed to Roundup, on the red blood cell count and a metabolic parameter associated with mitochondrial function. Despite this, chemical exposure does not seem to alter the ability of rainbow trout to survive infection with *IHNv*. However, viral infection revealed changes in specific physio-hematological parameters due to chemical contamination. In particular, additional stress created by the viral infection induced different effects on energy metabolism pathways depending on the chemical status of the trout (i.e. unexposed versus chemically contaminated fish). This may indicate that detoxification and repair processes used to counteract the stress induced by the chemical contamination represent supplementary metabolic costs that are revealed only in multistress conditions. Moreover co-formulants, depending on the GBH considered, seemed to either have no impact or increased or decreased the effect of pure glyphosate. Further studies would help to clarify the mechanisms underlying the ability of glyphosate with or without co-formulants to decrease the potential of fish to face multiple stressors.

CRediT authorship contribution statement

Jessy Le Du-Carrée: Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Joëlle Cabon:** Investigation. **Thierry Morin:** Validation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision. **Morgane Danion:** Validation, Writing – review & editing, Visualization, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Département des Côtes d'Armor, the Agglomération de Saint Brieuc and the Région Bretagne.

We sincerely thank Dr. Daniel DORY for his involvement in the management of J. LE DU's Ph.D. and Craig STEVENS, MA, DESS, ELS (Coup de Puce Expansion; <http://www.coupdepuce.com>) for the English language review.

References

Amend, D.F., Smith, L., 1975. Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout: hematological and blood chemical changes in moribund fish. *Infect. Immun.* 11, 171–179. <https://doi.org/10.1128/IAI.11.1.171-179.1975>.

- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.
- Anses, 2019. Synthèse des données de surveillance - Appui scientifique et technique numéro 2017-04. Technical Report. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) URL: https://www.anses.fr/fr/system/files/Fiche_PPV_Glyphosate.pdf.
- Aylward, B., Bandyopadhyay, J., Belausteguigotia, J.C., Börker, P., Cassar, A., Meadors, L., Saade, L., Siebentritt, M., Stein, R., Tognetti, S., Tortajada, C., Allan, T., Bauer, C., Bruch, C., Guimaraes-Pereira, A., Kendall, M., Kiersch, B., Landry, C., Rodriguez, E.M., Meinzen-Dick, R., Moellendorf, Suzanne, Pagiola, S., Porras, I., Ratner, B., Shea, A., Swallow, B., Thomich, T., Voutchkov, N., Lead, C., Bruce, A., Authors, L., Bo, P., Authors, C., Moellendorf, S., Editors, R., Constanza, R., Jacobi, P., Rijdsberman, F., 2005. Freshwater ecosystem services. In: Chopra, K., Leemans, R., Kumar, P., Simons, H. (Eds.), *Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends*. Island Pre, Washington, D. C. pp. 213–255.
- Bjørn, A., Diamond, M., Birkved, M., Hauschild, M.Z., 2014. Chemical footprint method for improved communication of freshwater ecotoxicity impacts in the context of ecological limits. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13253–13262. <https://doi.org/10.1021/es503797d>.
- Boltaña, S., Rey, S., Roher, N., Vargas, R., Huerta, M., Huntingford, F.A., Goetz, F.W., Moore, J., Garcia-Valtanen, P., Estepa, A., MacKenzie, S., 2013. Behavioural fever is a synergic signal amplifying the innate immune response. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20131381. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1381>.
- Bruggen, A.V., He, M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K., Finckh, M., Morris, J., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>.
- Burgos-Aceves, M.A., Lionetti, L., Faggio, C., 2019. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. *Sci. Total Environ.* 670, 1170–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.275>.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., de Menezes, C.C., Pretto, A., Baldissarotto, B., Santi, A., de Avila, L.A., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 597–602. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0396-7>.
- Collet, B., 2014. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Develop. Comp. Immunol.* 43, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.017>.
- Costabile, M., 2010. Measuring the 50% haemolytic complement (CH50) activity of serum. *JoVE*, e1923 <https://doi.org/10.3791/1923>.
- Danion, M., Floch, S.L., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2012. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 4000® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 424, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.055>.
- dos Santos, A.P.R., Rocha, T.L., Borges, C.L., Bailão, A.M., de Almeida Soares, C.M., de Sabóia-Morais, S.M.T., 2017. A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 168, 933–943. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.116>.
- Doumayrou, J., Ryan, M., Wargo, A., 2019. Method for serial passage of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.* 134, 223–236. <https://doi.org/10.3354/dao03368>.
- Dunn, O.J., 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6, 241–252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>.
- Dunnett, C.W., 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50, 1096–1121. <https://doi.org/10.1080/01621459.1955.10501294>.
- Dupuy, C., Cabon, J., Louboutin, L., Floch, S.L., Morin, T., Danion, M., 2019. Cellular, humoral and molecular responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a herbicide and subsequently infected with infectious hematopoietic necrosis virus. *Aquat. Toxicol.* 215, 105282. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105282>.
- Eder, K.J., Köhler, H.R., Werner, I., 2007. Pesticide and pathogen: heat shock protein expression and acetylcholinesterase inhibition in juvenile Chinook salmon in response to multiple stressors. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1233. <https://doi.org/10.1897/05-462R2.1>.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Elagamy, E.I., 2001. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro). *J. Environ. Sci. Health B* 36, 29–42. <https://doi.org/10.1081/pfc-100000914>.
- El-Gendy, K.S., Aly, N.M., El-Sebae, A.H., 1998. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *J. Environ. Sci. Health B* 33, 135–149. <https://doi.org/10.1080/03601239809373135>.
- Erhunmwunse, N.O., Ewere, E.E., Ainerua, M.O., Alohan, F.I., 2014. Biomarker of exposure: alterations in GIT of post juvenile Africa cat fish (*Clarias gariepinus*) exposed to sub-lethal concentrations of glyphosate herbicide (IPA 360 g/L). *Int. J. Innov. Sci. Res.* 4, 1–5.
- European Food Safety Authority, 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 13, 4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>.
- Félix, F.J., Saradhamani, N., 2015. Impact of the herbicide glyphosate roundup (41%) on the haematology of the freshwater fish, *Catla catla* (Hamilton). *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. (IOSR-JESTFT)* 9, 56–60 URL: <https://iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/vol9-issue4/Version-3/H09435660.pdf>.
- Fijan, N., Sulimanović, D., Bearzotti, M., Muzinić, D., Zwillenberg, L., Chilmonczyk, S., Vautherot, J., de Kinkelin, P., 1983. Some properties of the Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Inst. Pasteur Virol.* 134, 207–220. [https://doi.org/10.1016/s0769-2617\(83\)80060-4](https://doi.org/10.1016/s0769-2617(83)80060-4).
- Gauthier, C., Campbell, P.G., Couture, P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151, 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.010>.

- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. volume 167. Springer, New York, pp. 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2.
- Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M.B., de Araújo Pedron, F., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>.
- Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004>.
- Glusczak, L., Loro, V.L., Pretto, A., Moraes, B.S., Raabe, A., Duarte, M.F., da Fonseca, M.B., de Menezes, C.C., de Sousa Valladao, D.M., 2011. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 624–630. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9652-4>.
- Gonçalves, B., Giaquinto, P., Dos Santos Silva, D., de Melo, C., Neto, S., de Lima, A., Darosci Brito, A., Portinho, J., Carvalho, W., Rocha, T., 2019. Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment. *IntechOpen* <https://doi.org/10.5772/intechopen.85157>.
- H., C.A., Jr, V.A., M., A.A., L., C.C., P., E.G., B., A., C., C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>.
- Hodson, P.V., 1997. Water pollution and fish physiology. *Alan G. Heath. Quart. Rev. Biol.* 72, 483–484. <https://doi.org/10.1086/420013>.
- Ibarz, A., Ivañc, J., Gallardo, M., Fernández-Borrás, J., 2010. Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 155, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.012>.
- Jorgensen, P.E., Olesen, N.J., Lorenzen, N., Winton, J.R., Ristow, S.S., 1991. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health* 3, 100–108. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1991\)003<0100:IHNAV>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1991)003<0100:IHNAV>2.3.CO;2).
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480–483. <https://doi.org/10.1007/bf01863914>.
- Kekic, H., Ivanc, A., 1982. A new direct method for counting fish blood cells. *Ichthyologia* 14, 55–58.
- Kelly, D.W., Poulin, R., Tompkins, D.M., Townsend, C.R., 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J. Appl. Ecol.* 47, 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x>.
- Kondera, E., Teodorczuk, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2018. Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol. Biochem.* 44, 1011–1018. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0489-x>.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Marteninghe, A., dos Santos, E.D., Zanatta, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellf. Immunol.* 29, 694–697. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.003>.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., de Faria Valle, S., de Oliveira Silva, T., Anziliero, D., dos Santos, E.D., Pivato, M., Zanatta, R., 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellf. Immunol.* 30, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.012>.
- Li, M.H., Xu, H.D., Liu, Y., Chen, T., Jiang, L., Fu, Y.H., Wang, J.S., 2016. Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Toxicol. Res.* 5, 1039–1052. <https://doi.org/10.1039/c6tx00011h>.
- Loro, V.L., Glusczak, L., Moraes, B.S., Leal, C.A.M., Menezes, C., Murussi, C.R., Leitemperger, J., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., 2015. Glyphosate-based Herbicide Affects Biochemical Parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837)). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140082>.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E., Laroche, J., 2006. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Mar. Biotechnol.* 8, 275–294. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3>.
- Martin-Ortega, J., Ferrier, R.C., Gordon, I.J., Khan, S., 2015. *Water Ecosystem Services*. Cambridge University Press, Cambridge <https://doi.org/10.1017/CBO9781316178904>.
- Menéndez-Helma, R.J., Ferreyroa, G.V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2011. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 6–9. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8>.
- Micah, A.D., 2016. Acute effects of glyphosate on the behavioural and hematological characteristics of *Heteroclinias* (hybrid) fingerlings. *J. Aquacult. Eng. Fish. Res.* 3, 13–18. <https://doi.org/10.3153/jaefr17003>.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B., 2010. Effects of roundup transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>.
- Murussi, C.R., Costa, M.D., Leitemperger, J.W., Guerra, L., Rodrigues, C.C.R., Menezes, C.C., Severo, E.S., Flores-Lopes, F., Salbego, J., Loro, V.L., 2016. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 445–455. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0150-x>.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everitt, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health* 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.
- OECD, 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. *OECD Environ. Health Saf. Publ.* 54.
- OECD, 2012. *Fish toxicity testing framework*. Series on Testing and Assessment. Organisation for Economic co-Operation and Development, pp. 1–174.
- OECD, 2019. *Test Guideline No. 203 Fish, Acute Toxicity Testing*.
- Orun, I., Doğru, M.I., Erdoğan, K., Doğru, A., Öngün, A., Yüksel, E., Talas, Z.S., 2013. Effects of acute and chronic exposure to glyphosate on common carp (*Cyprinus carpio* L.) hematological parameters: the beneficial effect of propolis. *Fresenius Environ. Bull.* 22, 2504–2509.
- Payne, J., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225–231. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00112-Z](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00112-Z).
- Pédrón, N., Du, J.L., Charrier, G., Zambonino-Infante, J.L., Bayon, N.L., Vasconcelos, R.P., Fonseca, V.F., Grand, F.L., Laroche, J., 2017. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 129, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010>.
- Pereira, A.G., Jaramillo, M.L., Remor, A.P., Latini, A., Davico, C.E., da Silva, M.L., Müller, Y.M., Ammar, D., Nazari, E.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075>.
- R Core Team, 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R, T.L., S, A.P., Y, Á.T., S, C.M., B, C.L., B, A.M., S, M.S.M., 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016>.
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L., 2017. 20 years of fish immunotoxicology - what we know and where we are. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 516–542. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024>.
- Rossi, S.C., Dreyer da Silva, M., Piancini, L.D.S., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., Silva de Assis, H.C., 2011. Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 603–607. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0397-6>.
- Seber, G., Wild, C., 1989. *Growth models*. Wiley Series in Probability and Statistics, pp. 325–365. <https://doi.org/10.1002/0471725315.ch7>.
- Sinhonin, V.D.G., Sinhonin, A.P., dos Santos Teixeira, J.M., Milési, K.M.L., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Kawashita, N.H., Baviera, A.M., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposure to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.040>.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>.
- Székács, A., Darvas, B., 2018. Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.* 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>.
- Therneau, T.M., 2015. *A Package for Survival Analysis in R*.
- Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınç, N., Erdoğan, O., Ceyhan, S.B., 2015. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027>.
- Torretta, V., Katsoyiannis, I., Viotti, P., Rada, E., 2018. Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability* 10, 950. <https://doi.org/10.3390/su10040950>.
- Vainio, H., 2020. Public health and evidence-informed policy-making: the case of a commonly used herbicide. *Scand. J. Work Environ. Health* 46, 105–109. <https://doi.org/10.5271/sjweh.3851>.
- Wang, W., Liu, Q., Zhang, T., Chen, L., Li, S., Xu, S., 2020. Glyphosate induces lymphocyte cell dysfunction and apoptosis via regulation of miR-203 targeting of PIK3R1 in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellf. Immunol.* 101, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.047>.
- Webster, T.M.U., Santos, E.M., 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and roundup. *BMC Genomics* 16, 32. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>.
- Welch, B.Y.B.L., 2012. *Biometrika* trust. *Biometrika* 38, 330–336.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.
- Woodward, G., Perkins, D.M., 2015. Biodiversity, ecosystem functioning, and services in fresh waters: ecological and evolutionary implications of climate change. In: Belgrano, A., Woodward, G., Jacob, U. (Eds.), *Aquatic Functional Biodiversity*. Elsevier, San Diego, pp. 127–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417015-5.00006-2>.
- Wu, Y.H., Lee, Y.H., Shih, H.Y., Chen, S.H., Cheng, Y.C., Chiu, D.T.Y., 2018. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is indispensable in embryonic development by modulation of epithelial-mesenchymal transition via the NOX/Smad3/miR-200b axis. *Cell Death Dis.* 9, 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0005-8>.
- Zebral, Y.D., Lansini, L.R., Costa, P.G., Roza, M., Bianchini, A., Robaldo, R.B., 2018. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. *Chemosphere* 196, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.196>.

3.3 Impact d'une exposition prolongée de plus de 10 mois à une dose environnementale de glyphosate, seul ou co-formulé dans deux GBHs, sur les capacités de reproduction et la santé de la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*

3.3.1 Contexte

Dans le milieu naturel, les poissons vivants dans des cours d'eau en aval de bassins versants situés dans des zones cultivées sont exposés de façon chronique aux composés chimiques ubiquistes tels que le glyphosate. L'évaluation de l'impact de ces composés sur l'état de santé des poissons adultes, géniteurs dont le maintien d'un état physiologique favorable à la reproduction est primordial pour la survie des populations naturelles, est un élément important. L'évaluation de l'exposition prolongée au glyphosate sur les capacités de reproduction et la santé de la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, était donc la première étape des études de toxicité chronique du projet GlyphoTAC.

3.3.2 Objectifs / approche

La caractérisation de l'état de santé de truites arc-en-ciel adultes d'une génération F0 soumises à une faible dose de glyphosate, en association ou non avec des co-formulants, était nécessaire pour interpréter efficacement les résultats obtenus sur les générations ultérieures. En effet, les truites adultes de cette génération F0 sont celles qui ont donné naissance à l'ensemble des générations F1 et F2 analysées dans la suite du projet. Pour cette raison majeure, l'étude des truites F0 offrait, en plus d'apporter des éléments de caractérisation de l'effet du glyphosate en exposition directe sur des truites adultes, la possibilité de relier les effets observés sur cette génération aux effets induits sur les générations F1 et F2. L'impact des contaminants sur la fertilité et la fécondité des truites adultes ont également été examinés.

3.3.3 Principaux résultats

Les points clefs

- Une exposition chronique au glyphosate seul ou co-formulé a été étudiée chez la truite arc-en-ciel adulte.
- Les poissons ont été exposés directement, pendant 10 mois, à une dose de glyphosate faible présentant une haute pertinence environnementale.
- Aucun changement dans les principaux paramètres reproductifs, métaboliques, ou liés au stress oxydant n'a été observé suite à l'exposition chimique.
- Quelques perturbations des paramètres leucocytaires (proportion relative de macrophages et capacité de phagocytose) ont été mesurées, dépendamment de la période considérée.
- voir la figure 3.2 pour un résumé graphique.

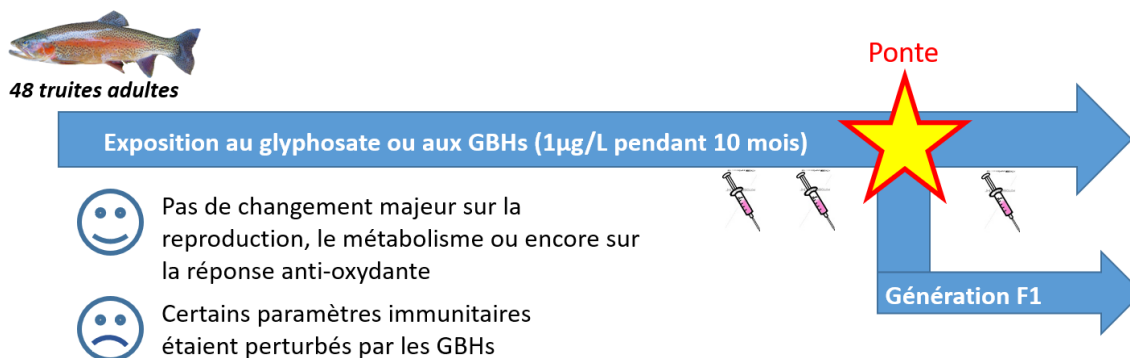
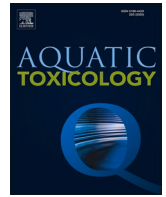


FIGURE 3.2 – Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de la génération de truites F0 adultes soumises à une exposition chronique au glyphosate.

3.3.4 Article

Voir l'article publié dans le journal *Aquatic Toxicology* pages 130-140 (11 pages).



Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides

Jessy Le Du-Carrée^{a,b,*}, Thierry Morin^a, Morgane Danion^a

^a French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Viral Fish Diseases Unit, 29280 Plouzané, France

^b UBO University of Western Brittany, Brest, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Glyphosate
Glyphosate-based herbicide
Ecotoxicity
Reproduction
Immune system

ABSTRACT

Glyphosate is an herbicidal active substance (AS) entering in the composition of a large diversity of pesticide products (glyphosate-based herbicides; GBH) used in modern intensive agriculture. This compound has a favorable environmental safety profile but was suspected to induce deleterious effects in aquatic organisms, with a potential effect of some associated co-formulants. This study aimed to assess the impact of direct and chronic exposure to glyphosate on the health status of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. A total of 36 genitors were exposed daily for 10 months to a dose of glyphosate representative of environmental concentrations (around $1 \mu\text{g L}^{-1}$) using the AS alone or two GBHs formulations (i.e. Roundup Innovert® and Viaglif Jardin®) and findings were compared to an unexposed control group ($n = 12$). The effects of chemical exposure on the reproductive capacities, hemato-immunologic functions, energetic metabolism, oxidative stress and specific biomarkers of exposure were analyzed over a period of 4 months covering spawning. A limited mortality between 15% and 30% specific to the spawning occurred under all conditions. No differences were observed in reproduction parameters i.e. mean weights, relative fertility and fecundity. Red blood cell count, hematocrit index, mean corpuscular volume and white blood cell counts were similar for all the sampling dates. Significant changes were observed two months before spawning with a 70% decrease of the proportion of macrophages in trout exposed to Viaglif only and a reduction of 35% of the phagocytic activity in fish exposed to the two GBHs. Trends towards lower levels of expression of tumor necrosis factor- α (between 38% and 66%) were detected one month after the spawning for all contaminated conditions but without being statistically significant. Biomarkers of exposure, i.e. acetylcholine esterase and carbonic anhydrase activities, were not impacted and none of the chemical contaminants disturbed the oxidative stress or metabolism parameters measured. These results suggest that a 10 months exposure of rainbow trout to a concentration of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of glyphosate administered using the pure active substance or two GBHs did not significantly modify their global health including during the spawning period. The immunological disturbances observed will need to be further explored because they could have a major impact in response to infectious stress.

- Exposure to glyphosate alone or co-formulated was studied in rainbow trout.
- Chronic low doses representative of environmental levels were studied for 10 months.
- No major changes in reproduction, metabolism nor oxidative response were observed.
- Occasional impacts of glyphosate-based herbicides on immune response occurred

1. Introduction

In the context of rapid human population growth, a major challenge for agriculture is to meet food production demand by using sustainable practices that protect both human health and the environment (Tilman et al., 2002). Modern intensive agriculture is economically highly dependent on the use of agrochemical products (Udeigwe et al., 2015). Among the broad range of substances available on the market,

* Corresponding author at: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Viral Fish Diseases Unit, 29280 Plouzané, France.

E-mail address: jessy.ledu@anses.fr (J.L. Du-Carrée).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105687>

Received 1 April 2020; Received in revised form 11 November 2020; Accepted 16 November 2020

Available online 26 November 2020

0166-445X/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

glyphosate is one of the most widely used herbicide compounds in the world. Its massive use, enhanced by the development of genetically modified glyphosate-resistant crops (Székács and Darvas, 2018; Torretta et al., 2018), has resulted in high prevalence of the compound in the environment. Glyphosate is found in different environmental compartments, including surface water. Although higher concentrations are detected in countries where farming of glyphosate-resistant crops is authorized (e.g. levels from 2 to 430 $\mu\text{g L}^{-1}$ in United states in stream and river water), glyphosate is present in water sources in Europe where levels above regulatory limits have been observed (Van Bruggen et al., 2018). In France, between 2007 and 2017, glyphosate and aminomethyl phosphonic acid (AMPA, the first metabolite of its degradation pathway) have been detected in 43.1–74.4% of environmental samples with mean maximal annual concentrations ranging from 2.4 to 70.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 8.4 to 67.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, 2019). The ubiquity of this herbicide compound has raised particular concern for its effects on human health and the environment.

The physico-chemical properties of glyphosate associated with its specific action on 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase, an enzyme present exclusively in plants and some micro-organisms, suggest a favorable environmental safety profile (Giesy et al., 2000). In a report of the European Food Safety Authority (EFSA) (European Food Safety Authority, 2015), half maximal effective concentration (EC50) of 38 and 306 mg L^{-1} were reported for rainbow trout (RT) exposed to glyphosate and a commercial formulation, respectively, considering mortality during an exposure of 96 h. Reported value of chronic toxicity, for RT exposed during 85 days to glyphosate, was a no observed effect concentration (NOEC), based on growth, of 9.6 mg L^{-1} (European Food Safety Authority, 2015). As a result, EFSA has classified the impact of glyphosate on aquatic organisms as “limited” (European Food Safety Authority, 2015). However, the number of studies reporting deleterious effects of this herbicide on aquatic organisms has increased, and a strong need to focus on environmentally relevant chronic low dose exposures have been pointed out (reviewed by Annett et al. (2014)). In addition, there has been considerable debate in the context of the re-registration of glyphosate in the European Union (EU) concerning the potential toxic effects of the active substance (AS), but also of the co-formulants integrated into finished products called glyphosate-based herbicides (GBHs) to increase efficacy. Some co-formulants have already been shown to be more toxic than the AS and synergistic interactions among the different chemicals present in formulations may occur (Annett et al., 2014; Székács and Darvas, 2018).

Pesticides can act at different levels of biological organization (Oost et al., 2003). At the molecular level, inhibition of carbonic anhydrase (CA), a key respiration enzyme involved in blood transport of CO_2 , has been demonstrated to be a target of chemical contaminants ((Ceyhun et al., 2010; Kiliç et al., 2015; Mela et al., 2013; Sulukan et al., 2017); reviewed by Lionetto et al. (2012)). Sulukan et al. (2017) showed that inhibition of this enzyme could be associated with respiratory acidosis in zebrafish (*Danio rerio*) larvae exposed to a GBH with a concentration of glyphosate comprised between 1 and 100 mg L^{-1} , resulting in adverse effects such as apoptosis and malformations during development. Pure glyphosate has a capacity to inhibit acetylcholine esterase (AChE) activity *in vitro*, however only at relatively high concentrations (El-Demerdash et al., 2001). Glyphosate, associated or not to co-formulant, have been shown to inhibit fish AChE at concentration ranging from 0.2 to 20 mg L^{-1} for GBH (Cattaneo et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010; Glusczak et al., 2006, 2007) and from 1 to 30 mg L^{-1} for AS (Menéndez-Helman et al., 2012). Muscle hyperactivity induced by AChE inhibition could generate oxidative radicals inducing oxidative damage such as lipid peroxidation (Cattaneo et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010). Oxidative stress is known to be activated by environmental contaminants such as pesticides, through direct and indirect mechanisms (Lushchak, 2016). Furthermore, several studies have pointed out

that the toxic mode of action of glyphosate alone or GBHs in non-targeted species might be directly or indirectly associated with the generation of oxidative stress (Lushchak et al., 2009; Oost et al., 2003; Cattaneo et al., 2011; Sulukan et al., 2017).

These types of changes in the equilibrium of cellular physiology could have adverse effects at higher levels of biological organization. In particular, energetic metabolism plays a key role in the tolerance of an organism to environmental stressors (Sokolova, 2013). Several studies indicate that glyphosate AS and/or GBHs could impact the metabolism of fish (Li et al., 2016; Soso et al., 2007; Salbego et al., 2010; Marchand et al., 2006; Peixoto, 2005; Glusczak et al., 2006, 2007; Uren Webster and Santos, 2015). Particularly, Topal et al. (2015) observed a reduction of swimming performance possibly due to the dysregulation of energy metabolism in rainbow trout exposed short or long term to a GBH at concentrations of glyphosate comprised between 2.5 and 10 mg L^{-1} . Disruptions of energy production and key metabolic pathways could result in a trade-off in the allocation of energy used for fitness dependent functions such as growth, survival, and reproduction (Sokolova, 2013). Therefore, the impact of glyphosate on reproduction, using fecundity and fertility indices, is of particular interest. More specific processes, such as the steroidogenic biosynthesis pathway, can also be altered as suggested for zebrafish (Uren Webster et al., 2014).

Innate and acquired immunity play a crucial role in the survival of individuals facing infectious diseases. Several hematologic and immunologic blood parameters were shown to be altered (Ma et al., 2015; Ma and Li, 2015; Kreutz et al., 2011) in fish exposed to glyphosate, potentially resulting in higher susceptibility to bacterial infections (Kreutz et al., 2010), but the immunotoxicity potential of this AS is still poorly defined.

The present study investigated the impact of a chronic exposure to environmentally relevant low doses of glyphosate on the overall health of genitors of rainbow trout *O. mykiss*, a species particularly sensitive to several aquatic contaminants and commonly produced in Europe for food consumption (Environmental Protection Series, 1996; OECD, 2019). Toxicity of the AS was compared to that of two GBHs (Roundup Innovert® and Viaglif Jardin®) across different levels of organization including reproduction, immunity, and antioxidant defense systems.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All animal studies were carried out in strict accordance with the European guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare (European Union Directive 2010/63). All animal experimental procedures were approved by the ethics committee on animal experimentation ANSES/ENVA/UPC No. 16 and were authorized by the French Ministry of Research, under the number APA-FIS#2017090117104091. Blood sampling and stripping were done on fish anesthetized with 2% eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol). Euthanasia involved addition of a lethal dose of 100 ppm of Eugenol into tank water. Compassionate euthanasia was planned for animals showing lesions (damaged fins, wounds) or abnormal behavior during the experiment.

2.2. Fish maintenance

Forty-eight specific pathogen free (SPF) rainbow trout including a mixture of three-year-old males and females from the protected and monitored fish facilities of the ANSES Plouzané Laboratory site (France) were used. Fish were placed in four 400 L tanks. All tanks have been grouped in the same room and maintained identically to limit inter-tank variability as much as possible. Fish were maintained under continuous flow-through conditions (300 L h⁻¹) and oxygen levels were maintained above 60% of saturation with aeration. Fish were fed daily with appropriate food at 1.5% of the biomass. Fish were submitted to the

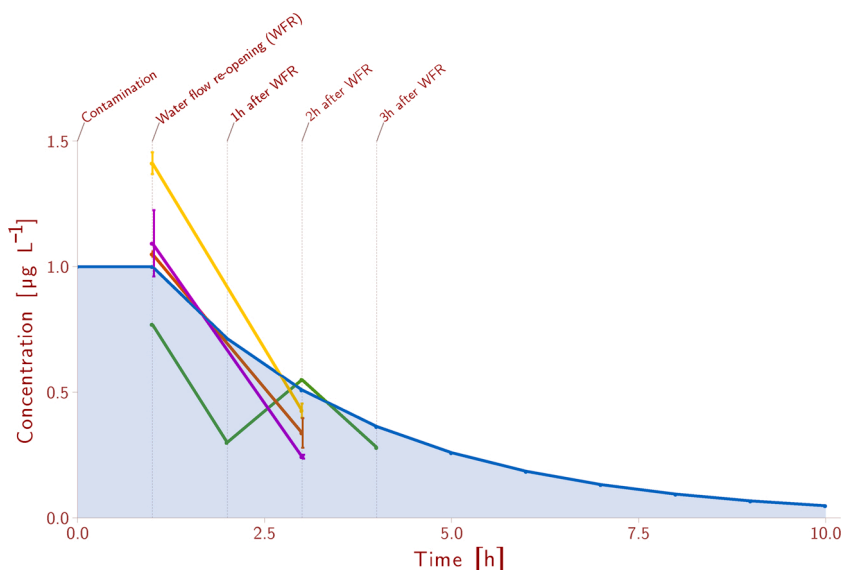


Fig. 1. Mean concentration of glyphosate as a function of time ($\mu\text{g L}^{-1}$). Theoretical concentrations (in blue) are compared to concentrations measured at different times of the kinetic using ELISA or HPLC methods. ELISA analysis was done after 1 month of contamination for each condition (Glyphosate – G in yellow, Roundup – R in orange and Viaglif – V in purple) and two points of the kinetics. HPLC analysis was done after 10 months of contamination in the tank contaminated with G for all points of the kinetics (in black). Error bars represent standard-errors.

natural photoperiod occurring in Brest (France) throughout the time of the experiment and a temperature increasing from 9 to 21 °C between April and July and decreasing from 21 to 8 °C between July and November.

2.3. Chemical exposure

Four conditions of contamination were tested, each including 12 RT (proportion of 1 male for 2 females): control (C; non-exposed RT), glyphosate (G; Sigma–Aldrich, ref. 45521, CAS Number 1071-83-6), Roundup Innovert® (R; Agrilisa – for professional use) and Viaglif Jardin® (V; Agrilisa – for home gardens). G had a purity of 98%, while the concentration of R and V were 360 and 420 g L^{-1} of glyphosate, respectively. The nature and concentrations of the co-formulants of the two commercial products, R and V, are unknown. Concentrated solutions of each product (4 mg L^{-1}) were prepared and stored under appropriate conditions (darkness, controlled temperature). From January to November 2018 (i.e. 10 months), every working day (generally 5 days a week), a volume of 100 mL of each of these respective solutions was added to the tanks hosting the fish for which the freshwater flow was stopped for one hour. After one hour of contact, regulated water flow was set up for the rest of the day at 135 L h^{-1} , allowing for the gradual dilution of glyphosate. Theoretical kinetics of glyphosate concentrations in contaminated tanks are presented in Fig. 1 and have been calculated from the Eq. (1). The integrated mean theoretical concentration of glyphosate for each contamination day was approximately 123 ng L^{-1} (the area integrated is represented by a blue zone on the theoretical dilution curve in Fig. 1).

$$C(t) = C_{\text{initial}} e^{(-\text{rate}/V_{\text{tank}} t)} \quad (1)$$

2.4. Sampling date and spawning of RT

2.4.1. Water sampling

Two sampling dates were performed in February and November, respectively at the beginning and at the end of the exposure period, to measure glyphosate concentrations in water tanks. The first samples were analyzed using the ELISA method and the second by HPLC. For each sampling date, 150 mL water samples were taken in each tank using sterile glass bottles. They were stored at -20 °C until the ELISA test or directly sent, at 4 °C , to the external provider for HPLC analysis.

2.4.2. Fish sampling

Non-invasive sampling was carried out two and one months before

spawning (2 mbs and 1 mbs) by withdrawing 2 mL of blood from the caudal vein with a lithium heparin vacutainer (Greiner ref. KG454244). For flow cytometry analyses, 300 μL of blood collected from each fish were immediately diluted with 10 mL of Leibovitz 15 medium (L15, Eurobio) containing 8 mg L^{-1} of lithium heparin (Sigma–Aldrich ref. H0878). Whole blood was used for hematologic analyses, while the remaining blood samples were centrifuged ($1200 \times g$, 10 min, 4 °C) and plasma was stored at -80 °C for immunological analysis. One month after spawning (1mas), another blood sample was taken and fish were euthanized. Then, the liver, spleen, gills and brain were sampled, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for future analyses.

2.4.3. Spawning

The spawning period occurred in November 2018 and the maturation of fish was tested every week by exerting manual abdominal stripping to ensure spawning on a day when most of the fish were mature. Stripping events were done twice over the spawning period to collect eggs and sperm from the most mature fish, with approximately two weeks between them. For each stripping event, sperm of all mature males were used to fertilize eggs of mature females belonging to the same experimental condition. After the stripping, females were weighed before and after stripping to measure the total weight of eggs. A fraction of eggs for each mature female was sampled in modified Gilson's solution (as described by Friedland et al. (2005), without nitric acid) for egg numbering and weighing. Relative fecundity was considered as the number of eggs divided by the weight of each respective female after stripping (Contreras-Sánchez et al., 1998).

2.4.4. Survival of the eggs

Eggs of each female were independently fertilized with the pool of sperm collected for each respective chemical condition. Embryonic development was conducted in tank, containing approximately 300 L, continuously renewed with a river water flow (approximately 300 L h^{-1}). Temperature during embryonic development was maintained at $8 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Water quality parameters were monitored as described for adult fish. Fertility was considered to be the proportion of eggs surviving at five days post fertilization (Contreras-Sánchez et al., 1998). To perform this measurement, 4, 7, 7 and 5 females were considered for the C, G, R and V respectively. Survival of eggs was assessed daily for each female on a fraction of approximately 200 eggs isolated in plastic breeding boxes.

Table 1
Immune genes targeted and primers used in this study.

Gene	Primer.sequences (5'–3')	Genbank.references	Source	Efficiencies
<i>EF</i>	Forward: GATCCAGAAGGAGGTCACCA Reverse: TTACGTTTCGACCTTCCATCC	AF498320.1	Ballesteros et al. (2015)	1.12
<i>C3-1</i>	Forward: GAGATGGCCTCCAAGAAGATAGAA Reverse: ACCGCATGTACGCATCATCA	L24433.1	Cortés et al. (2013)	1.19
<i>C3-4</i>	Forward: TGCTCTAGTCACATCTACCACTCT Reverse: CAGGCACATGGGTATAACAGTAGAA	AF271080	Løvoll et al. (2007)	1.18
<i>IL-1</i>	Forward: ACCGAGTTCAAGGACAAGGA Reverse: CATTTCATCAGGCCAGCAC	DQ778946	Bjork et al. (2014)	1.18
<i>TNF – α</i>	Forward: GGGGACAAACTGTGGACTGA Reverse: GAAGTTCTTGCCTGCTCTG	AJ277604	Pérez-Sánchez et al. (2011)	1.20

2.5. Chemical analysis

Quantification of glyphosate using direct competitive ELISA assay (Novakits, ref. 1500086) was done at two times of the daily kinetics (i.e. just before the water flow reopening, wfr, and 2 h after wfr) in all tanks, following supplier’s instructions. Briefly, 50 µL of river water was filtered and derivatized, before to be transferred into wells of a microplate coated with goat anti-rabbit antibodies. Sample was diluted at 1/2 with rabbit anti-Glyphosate antibody reagent and competitive reaction with enzyme conjugate solution lasted 1 h. After a step of washing, the colored reaction was started by adding 150 µL of substrate solution to the wells. The reaction was stopped after 25 min, and plates were read at 450 nm on a TECAN Spark 10M microplate spectrophotometer. The development of the color is inversely proportional to the concentration of AS in the sample. Standard curve has been realized using the four-parameter log-logistic function, LL.4, of the R package “drc” (Seber and Wild, 1989). Quantification was done by reporting the OD value obtained for the sample to the quantification standard curve obtained for each assay.

Quantification of glyphosate and AMPA by HPLC/fluorometric methods (Method ref. ANA-I10.MOA.69.B) was done by an external provider (Labocea, France) at different times of the daily kinetics (i.e. just before wfr and 1, 2 and 3 h after wfr), in the tank contaminated with the AS.

2.6. Hematologic and immunologic parameters

The hematocrit index was measured using microhematocrit capillary tubes after 5 minutes centrifugation at 12,000 × g. Counting of red and white blood cells was performed on a Thoma cell hemocytometer using whole blood diluted to 1/200 in Giemsa solution (Kekic and Ivanc, 1982). Mean corpuscular volume (MCV) was expressed as the ratio of the hematocrit index to the number of erythrocytes per unit of volume. Blood leukocyte populations were analyzed by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Leukocytes were extracted on a Ficoll gradient (Histopaque® 1077, Eurobio) after several centrifugation cycles according to Danion et al. (2011). For each sample, cell parameters were analyzed on 15,000 events. Two leukocyte populations, lymphocytes and macrophages, were differentiated according to their scatter properties. Phagocytic activity was measured with a solution of leukocytes with 2.7 × 10⁹ fluorescence beads/mL (FluoroSpheres® carboxylate-modified microspheres, diameter 1 µm, molecular probes, ThermoFisher Scientific) after 1 hour of incubation at room temperature. Phagocytic capacity was considered to be the proportion of leukocytes that presented a fluorescence intensity equal to or greater than two beads (modified from Brousseau (1999)). Note that due to a technical problem, phagocytic activity could not be obtained at 1mbs. The alternative pathway of plasma complement activity was measured according to Danion et al. (2012). Results were expressed using the formula described by Costabile (2010).

2.7. Gene expression analysis

Total RNA was isolated using an RNeasy Plus kit (Qiagen) from 20 mg of spleen sampled at 1mas, and all samples were treated with the RTS DNase Kit (Mobio) to prevent DNA contamination. For each sample, RT was carried out using 1 µg total RNA with a RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) and an iCycler System (Bio-Rad). mRNA was quantified for the following four genes: complement (*C3-1* and *C3-4*), interleukin – 1β (*IL – 1β*) and tumor necrosis factor-α (*TNF – α*). In addition, the elongation factor gene *EF* was included in the analysis as a housekeeping gene. Primers were obtained from the literature and are based on sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Table 1). The characteristics of the quantitative real-time PCR (qPCR) reactions performed in the CFX96 real-time PCR System (Bio-Rad) are available in (Dupuy et al., 2019). Relative expression of the target gene was calculated with the Pfaffl formula (Eq. (2); (Pfaffl, 2001)). The ratio of a target gene was expressed in a sample versus a control, in comparison to a reference gene.

$$\frac{\text{Efficacyoftargetgene}^{C_{\text{target pool}} - C_{\text{target sample}}}}{\text{EfficacyofEFgene}^{C_{\text{EF pool}} - C_{\text{EF sample}}}} \tag{2}$$

2.8. Bio-markers, metabolic parameters and oxidative stress

All organs were homogenized in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor using the tissue homogenizer Precellys 24 (Bertin Technologies, France). Protein concentrations in the extracts were measured using the Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific). Each assay measurement was performed in triplicate. All enzymatic reactions were monitored using a TECAN Spark 10M microplate spectrophotometer. Metabolic parameters were calculated using the slope of the curve optical density = f(time) and the Beer-Lambert law (A = εlc). Oxidative stress activities were calculated using calibration curves generated using standards. All results were expressed in specific activities (IU mg⁻¹).

Choline esterases (ChE) were measured in brain following a protocol adapted from Ellman et al. (1961). Briefly, 20 µL of extract were assayed in 140 µL of a reaction solution with acetylthiocholine iodide and dithiobis-2-nitrobenzoic acid. The variation in optical density was recorded at 412 nm.

Carbonic anhydrase (CA) was assayed in gill following a protocol adapted from Verpoorte et al. (1967) using a reaction solution with 4-nitrophenyl acetate and acetazolamide (AZM) or dimethyl sulfoxide (DMSO) (total esterase activity without or with CA activity, respectively). The enzymatic reaction was monitored spectrophotometrically at 405 nm.

Citrate synthase (CS), Cytochrome c oxidase (CCO), Lactate dehydrogenase (LDH) and Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) metabolic parameters were measured in liver at, respectively, 412 nm, 550 nm, 340 nm and 340 nm, following an adaptation of the procedures described by Gauthier et al. (2008).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were quantified by their reactivity with thiobarbituric acid in acidic conditions according to Espín et al. (2017).

Total activity of superoxide dismutase (totalSOD) and manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) activity were measured in liver according to Espín et al. (2017), Mesa-Herrera et al. (2018). Briefly, samples were assayed in a solution of pyrogallol and the rate of pyrogallol autoxidation was measured with a spectrophotometer at 325 nm. MnSOD activity was calculated by subtracting the activity of totalSOD by the activity of SOD measured in presence of an inhibitor of MnSOD, the sodium cyanide

Glutathione Peroxidase (GPx) activity was determined in liver using 15 μL of diluted sample according to the Paglia method (Paglia and Valentine, 1967). Cumene hydroperoxide was used as the substrate and enzymatic activity was assessed at 340 nm.

Catalase (CAT) was assayed in liver using the method of Aebi (1984). Briefly, the assay mixture consisted of phosphate buffer (100 mM, pH 7) and H_2O_2 (28 mM). The variation of H_2O_2 absorbance was measured with a spectrophotometer at 225 nm.

2.9. Data processing and statistical analyses

Data processing and statistical analyses were conducted with R software (R Core Team, 2018), except for normalized gene expressions that were obtained with Bio-RAD CFX Manager™ Software (Bio-Rad). Figures were produced using the ggplot2 package (Wickham, 2016). All the data were tested for normality and homoscedasticity. In the case of normal and homoscedastic data, one-way Anova tests were used to compare means, followed by a post-hoc test of Dunnett (Dunnett, 1955). In the case of normal and heteroscedastic data, modified one-way Anova tests were used to compare means (Welch, 2012), followed by a post-hoc test of Tamhane-Dunnett (OECD, 2006). In the case of non-normal data, a Kruskal-Wallis test was used to compare means, followed by a post-hoc test of Dunn (Dunn, 1964). Differences between survival and fecundity percentages were compared with a Chi-squared test. A p -value of 0.05 was used as the threshold for statistical significance. A test of correlations between variables was carried out using the lmrob R function (R package robustbase; Wilcox (2017)).

3. Results

3.1. Concentration assays

Glyphosate and AMPA were not detected in control tank throughout the experiment. AMPA was never detected in any of the exposure tanks. Using ELISA assay, concentrations of glyphosate ranged between 1.05 and 1.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ in all exposure tanks one hour after the addition of the chemical (Fig. 1). The glyphosate concentration measured by HPLC was approximately 30–40% lower (0.77 $\mu\text{g L}^{-1}$) at the same point of the kinetic. Two hours after restarting the water flow, glyphosate concentrations were similar (between 0.24 and 0.55 instead of the modeled concentration of 0.51 $\mu\text{g L}^{-1}$ predicted by the theoretical dilution curve) regardless of the method used.

3.2. Survival and growth parameters

No mortality was recorded before the spawning period. However, spawning induced mortality rates between 15% and 30% (data not shown), without significant differences between the exposure conditions, that were randomly distributed across all treatment groups.

Mean ratios of weights before and after the spawning period were 1.14, 1.11 and 1.15 for control, glyphosate and Viaglif, respectively, while a ratio of 1.03 was found for the Roundup condition. No statistical differences were found among the means of the four exposure conditions.

Table 2

Mean reproductive parameters (\pm standard-error) of female RT. Relative fecundity corresponds to the ratio of the number of eggs to the weight of the fish (eggs g^{-1}). Fecundity is the proportion of surviving eggs five days post fertilization (%). n is comprised between 4 and 8 for relative fecundity and between 4 and 7 for fertility.

Condition	Reproductive parameters	
	Relative fecundity (eggs g^{-1})	Fertility (%)
C	2.63 \pm 0.72	99.6 \pm 0.4
G	2.71 \pm 0.30	95.8 \pm 3.9
R	2.55 \pm 0.22	99.8 \pm 0.1
V	2.47 \pm 0.32	99.5 \pm 0.5

3.3. Reproductive parameters

High fertility was observed for RT in all conditions. Relative fecundity and fertility between control and contaminated fish were not significantly different (Table 2).

3.4. Hematologic and immune blood parameters

No statistically significant change was observed among hematologic parameters (i.e. RBCC, HT, MCV and WBCC) of adult trout exposed to glyphosate or GBHs compared to controls (Table 3) before, during and after the spawning period (Table 3).

Considering the proportion of macrophages (Fig. 2), the only statistically significant change was a reduction of approximately 70% for Viaglif condition ($\chi^2 = 12.2$; degrees of freedom, $df = 3$; p -value = 0.007) compared to the control two months before the spawning. At the same period, phagocytic capacity (Table 3) was significantly lower for fish exposed to GBHs compared to controls ($\chi^2 = 19.7$; $df = 3$; p -value = 0.0002). ACH_{50} activity was not significantly altered in adult trout exposed to glyphosate or GBHs (Table 3).

3.5. Immune gene expression in spleen

No significant differences between mean expressions were found one month after spawning for C3-1, C3-4 and IL1- β . An overall significant difference of means was observed for TNF- α expression ($f = 19.7$; $df = 3$; p -value = 0.045; Table 4), with a decrease of 38, 56 and 66% in the glyphosate, Roundup and Viaglif groups, respectively, compared to the control. A post-hoc test revealed no significant difference for TNF- α between chemically exposed conditions and control. A positive correlation was observed between the proportion of macrophages and the expression of IL1- β (adjusted R-squared: 0.1571, $p = 0.001$) but not with TNF- α (adjusted R-squared: -0.02838, $p = 0.46$).

3.6. Biochemical parameters and oxidative stress in liver

No significant difference was noted in metabolic activities between contaminated and control fish one month after spawning (Table 5). Means of CS/CCO ratio values were 1.4 \pm 0.07, 1.3 \pm 0.08, 1.1 \pm 0.05 and 1.2 \pm 0.11 for control, glyphosate, Roundup and Viaglif conditions, respectively. For LDH/CS ratio, they were of 15.5 \pm 0.38, 17.3 \pm 0.42, 18.6 \pm 0.95 and 16.9 \pm 0.93 respectively. No significant difference was noted in any of these metabolic ratios between contaminated and control trouts.

No significant modification of the AChE and CA activities was observed one month after spawning in the brain and the gills of adult trout, respectively (Fig. 3).

No significant difference was measured for MDA concentrations or CAT, GPx, SODmn, SODtotal and TBARS activities regardless of the chemical treatment occurred (Table 6) one month post-spawning.

Table 3

Immuno-hematologic parameters measured in blood of contaminated RT in the period covering the spawning. Parameters indicated were analyzed for contaminated (G, R, V) and control (C) fish at 1 and 2 months before (mbs), during or 1 month after (mas) spawning. Values are expressed as means with standard-error. RBCC: Red blood cell count ($12 \geq n \geq 8$); HT: Hematocrit index ($11 \geq n \geq 8$); MCV: Mean corpuscular volume ($11 \geq n \geq 8$); WBCC: White blood cell count ($12 > n > 8$); PC: Phagocytic capacity ($12 \geq n \geq 7$); ACH₅₀: 50% Alternative haemolytic complement activity ($12 \geq n \geq 6$). The numbers in bold with an asterisk are significantly different from the values obtained for the control condition at the same period. ND: not done.

Date	Condition	RBCC (TL)	HT (%)	MCV (fL)	WBCC (GL)	PC (%)	ACH ₅₀ (CH ₅₀ units mL ⁻¹)
1 mbs	C	1.72 (0.096)	ND	ND	31.33 (3.83)	ND	19.58 (1.54)
	G	1.98 (0.158)	ND	ND	46.33 (5.6)	ND	23.06 (1.02)
	R	2.02 (0.165)	ND	ND	34.73 (2.97)	ND	20.94 (1.34)
	V	1.98 (0.175)	ND	ND	46.33 (7.45)	ND	19.47 (2.17)
	C	1.3 (0.12)	ND	ND	38.6 (2.86)	46.36 (3.63)	20.76 (1.34)
2 mbs	G	1.27 (0.094)	ND	ND	38.5 (2.4)	38.7 (2.63)	21.17 (1.36)
	R	1.22 (0.074)	ND	ND	37.82 (4.03)	29.34* (2.57)	18.95 (1.6)
	V	1.34 (0.083)	ND	ND	41.17 (2.78)	28.59* (2.15)	19.84 (2.01)
	C	1.77 (0.168)	54.33 (1.67)	95.77 (9.32)	20.44 (3.98)	ND	17.93 (1.92)
	G	1.59 (0.146)	51.91 (3.61)	84.61 (10.44)	24.55 (4.86)	ND	20.82 (2.02)
Spawning	R	1.94 (0.089)	53 (2.37)	103.18 (6.94)	17.09 (1.65)	ND	16.68 (1.81)
	V	1.65 (0.186)	43.25 (4.42)	75.92 (13.83)	14.5 (1.64)	ND	17.49 (2.09)
	C	ND	ND	ND	ND	24.32 (3.85)	ND
	G	ND	ND	ND	ND	29.08 (2.83)	ND
	R	ND	ND	ND	ND	25.37 (3.45)	ND
1 mas	V	ND	ND	ND	ND	24.61 (3.5)	ND

RBCC: Red blood cell count ($12 > n > 8$); HT: Hematocrit index ($11 > n > 8$); MCV: Mean corpuscular volume ($11 > n > 8$); WBCC: White: blood cell count ($12 > n > 8$); Macrophages ($12 > n > 7$); PC: Phagocytic capacity ($12 > n > 7$); ACH50: 50% Alternative haemolytic complement activity ($12 > n > 6$).

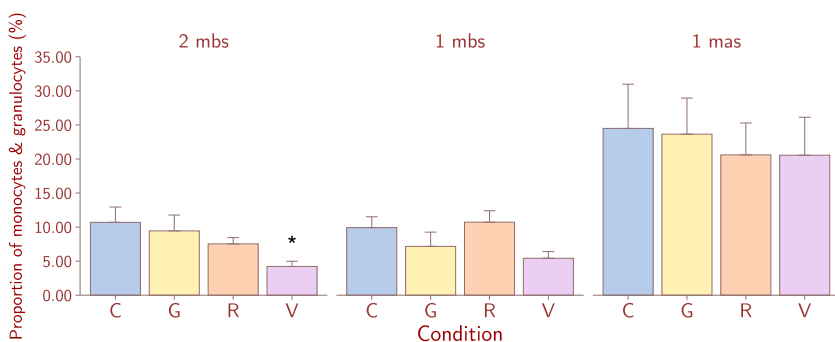


Fig. 2. Mean proportions of macrophages and granulocytes in leukocyte populations of RT over the period covering spawning as a function of exposure conditions. Each window corresponds to a sampling time with mbs. = months before spawning; mas. = months after spawning. Standard errors are represented at the top of each bar ($12 \geq n \geq 7$). Each treatment was compared to the control (at each sampling time points). Statistically significant differences from control means are indicated with an asterisk ($p < 0.05$).

4. Discussion

This study aimed to investigate the effect of long term exposure to low and environmentally relevant concentrations of glyphosate, the most widely used herbicide in the world, on the overall health status of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, a non-target species. In addition, another point of interest lay in the provision of data on the potential modulation of the toxicity of glyphosate by co-formulants of two commercial glyphosate-based herbicides (GBHs).

Our complex experimental design, studying chemical contamination over several months with a low environmentally relevant dose of glyphosate on sexually mature genitors, is particularly useful to understand the complexity of the toxic effects of this herbicide in the aquatic

environment. In this study, only one tank per chemical treatment has been allocated to integrate the ethical rules of reducing the number of animals and the logistics constraints of keeping fish in good conditions throughout a prolonged period. To compensate the possible “tank effect”, we maximized the number of fish sampled to have a relevant overview of the individual variability occurring inside each tank in response to a specific contaminant. To minimize the inter-tank variability, the experimental conditions were strictly managed (i.e. all tanks were positioned in the same room and received the same water at the same temperature in open circuit). As these precautionary measures could not completely prevent the apparition of a “tank effect”, exposure reiteration will be necessary to confirm our results and hypothesis.

Levels of glyphosate contamination observed were relatively in

Table 4

Mean relative expression (\pm standard-error; log) of immune genes in the spleen one month after the spawning period. Results are expressed in Log and include standard errors.

Parameter	Condition of chemical exposure			
	C	G	R	V
C3-1	0.99 \pm 0.57	1.86 \pm 1.57	0.18 \pm 0.11	1.39 \pm 1.16
C3-4	0.6 \pm 0.25	0.82 \pm 0.54	0.2 \pm 0.1	2.49 \pm 2.27
IL1 - β	1.71 \pm 0.67	1.17 \pm 0.35	0.71 \pm 0.2	0.47 \pm 0.09
TNF - α	1.21 \pm 0.39	0.75 \pm 0.11	0.54 \pm 0.04	0.42 \pm 0.06

n between 7 and 10.

Table 5

Mean of specific activities of enzymes involved in metabolic activities measured in the liver of contaminated RT one month after spawning. Data are expressed in IU mg⁻¹ of protein with standard error for each contaminated conditions (G, R, V) and the control group (C).

Parameter	Condition of chemical exposure			
	C	G	R	V
CS	0.02 (0.00082)	0.017 (0.0012)	0.017 (0.0008)	0.017 (0.00123)
CCO	0.014 (0.00079)	0.014 (0.00064)	0.015 (0.00094)	0.015 (0.00042)
LDH	0.3 (0.012)	0.29 (0.01)	0.31 (0.01)	0.29 (0.014)
G6PDH	0.053 (0.0081)	0.049 (0.0037)	0.048 (0.005)	0.052 (0.0061)

n between 7 and 10.

phase with our theoretical kinetics, with a maximum variation of the expected concentration of glyphosate of approximately 23% for the HPLC method and 45% for the ELISA assay. The lower specificity of the ELISA compare to the HPLC method could explain the overestimation of glyphosate concentrations measured for several points of the kinetics. The first degradation metabolite of glyphosate, AMPA, was not detected in our contaminated tanks, probably because the water renewal prevented any accumulation of metabolites. No traces of glyphosate or

AMPA were found in the control tank either, demonstrating that no external source of glyphosate was introduced into our experimental system. Glyphosate is known to have low bioconcentration factors in animal tissues (European Food Safety Authority, 2015; Jackson et al., 2009), and we therefore did not quantify the AS in fish. Nevertheless, a study of bio-markers of exposure has shown that the compound can be distributed at low doses in fish (reviewed by Annett et al. (2014)).

Several authors have hypothesized that glyphosate, combined or not with co-formulants in GBHs, can cause toxicity through altering AChE and CA (AChE: (Cattaneo et al., 2011; Modesto and Martinez, 2010); CA: (Sulukan et al., 2017)). AChE has been shown to be inhibited by concentrations of pure glyphosate of at least 1 mg L⁻¹ and both enzymes were impacted by 0.2 mg L⁻¹ and 1 mg L⁻¹ of glyphosate formulated in several GBHs different from those tested here, respectively (Cattaneo et al., 2011; Menéndez-Helman et al., 2012; Modesto and Martinez, 2010; Gluszczak et al., 2006). Activation of AChE have also been reported during chronic exposure in freshwater stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*) or in common carp (*Cyprinus carpio*) after a recovery period (Dey et al., 2016; Cattaneo et al., 2011) as well as hybrid situations coupling inhibition and activation, like in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*)

Table 6

Means of specific activities and TBARS levels measured in livers of RT one month after spawning. Specific activities are expressed in IU mg⁻¹ of protein) and TBARS levels as MDA concentrations in nmol mg⁻¹ of protein). Standard error are included in parenthesis.

Parameter	Condition of chemical exposure			
	C	G	R	V
CAT	10.14 (0.46)	10.85 (0.41)	11.81 (0.69)	11.43 (0.55)
GPx	0.38 (0.02)	0.41 (0.011)	0.39 (0.01)	0.36 (0.017)
SODmn	1.97 (0.18)	1.83 (0.24)	2.05 (0.21)	2.3 (0.29)
SODtotal	3.77 (0.24)	3.83 (0.37)	4.19 (0.37)	4.24 (0.42)
TBARS	0.018 (0.0023)	0.02 (0.0024)	0.022 (0.0033)	0.02 (0.003)

n between 6 and 10.

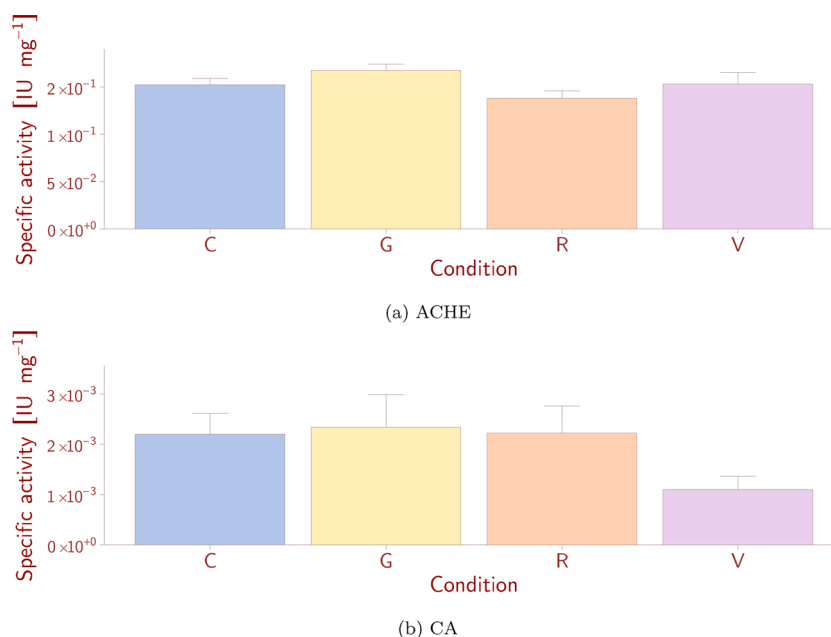


Fig. 3. Mean AChE and CA activities as a function of exposure conditions one month after spawning. Activities are expressed in (IU/mg of protein) for each contaminated conditions (G, R, V) and the control group (C) with standard errors represented at the top of each bar (10 > n > 7). AChE was measured in the brain and CA in the gills.

(Matozzo et al., 2019). The development of a dynamic compensatory response in these aquatic organisms facing the stress induced by chemical exposure could explain the slight activation and inhibition of AChE observed in the brains of our RT exposed to glyphosate and GBHs. Nevertheless, the dose of glyphosate exposure used was probably too low to induce changes in AChE activity. In vitro and in vivo inhibitions of CA have also been reported after exposure to a GBH, and it has been suggested that this inhibition could be responsible for other toxic effects at higher levels of biological organization (Kilinc et al., 2015; Sulukan et al., 2017). Although inhibition of the activity in animals contaminated with Viaglif seems to be emerging one month after spawning, no significant effect was measured in our study regardless of the condition. Complementary investigations will be necessary to confirm if this tendency lasts and grows with the exposure time.

Several enzymes implicated in both energy metabolism and antioxidant defenses have been monitored in livers of RT to assess the effect of chemical contamination in this organ that has been demonstrated to be the main target of glyphosate toxicity (Lushchak et al., 2009; Marchand et al., 2006). Among them, malondialdehyde (MDA), an indicator of oxidative damage to lipids, was of particular interest as glyphosate and GBH have been described to induce oxidative stress and increase lipid peroxidation in fish (Gluszczak et al., 2011; de Moura et al., 2017; Lushchak et al., 2009; Oost et al., 2003; Cattaneo et al., 2011; Sulukan et al., 2017). Most of the previous data on oxidative stress was obtained with glyphosate concentrations above 1 mg L^{-1} (i.e. a concentration 1000 times greater to the dose we used in the present study) and exposures were conducted with co-formulated products only. At lower concentrations, Persch et al. (2017) no impact on TBARS levels was observed in different tissues of Catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to concentrations of a GBH comprised between 18 and $144 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ but reduction of glycogen and total lipid and protein contents occurred in this study. An increase of the CAT activity was also observed, particularly in gills at concentration above $36 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Under our conditions, we obtained only slight and no significant variations in activities of enzymes involved in defenses against oxidative stress. This is likely due to the fact that glyphosate concentrations used might be insufficient to induce an antioxidant response and damage in adult trouts. Previous authors had already reported that after a first phase of response with anti-oxidant enzymes induced in liver of the neotropical fish (*Prochilodus lineatus*) contaminated by a GBH, a subsequent phase occurred where enzymatic activities returned to baseline levels without an increase in oxidative damage (Modesto and Martinez, 2010). Applied to our study, this means that adaptations occurring in the first phase of the chemical contamination might not be revealed by the pattern of oxidative stress defenses observed later in the experiment but also that, at the time of sampling, fish were protected from oxidative stress. G6PDH helps to protect against oxidative damage and is also recognized as being a relevant marker of anabolism (Pédrón et al., 2017). G6PDH activity of our control group showed considerable interindividual variability, and the contaminants studied appeared not to influence the regeneration capacity of NADPH implicated in oxidative stress defenses, nor anabolic capacity. Several discrete disruptions were observed in chemically exposed fish for three liver enzymes that play key roles in metabolic pathways. LDH activity appeared not to be particularly influenced by chemical contamination, suggesting that fish did not increase anaerobic metabolism as a compensatory mechanism against loss of aerobic capacity (Sokolova, 2013). Activities of enzymes involved in aerobic metabolism, CCO and CS, were not impacted by the chemical contamination. Some tendencies were observed when CS/CCO and LDH/CS ratios of activities were considered but further studies are needed to confirm these results. Higher LDH/CS could indicate a transition from aerobic to anaerobic metabolism (Pimentel et al., 2019), while a lower CS/CCO ratio could reveal mitochondrial dysfunction (Ibarz et al., 2010). Craig et al. (2007) observed that Cu exposure affected this ratio in the liver of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) and suggested that it

could, therefore, affect normal mitochondrial biogenic processes. GBHs have been shown to generate mitochondrial dysfunction in isolated mitochondria (Peixoto, 2005), cells (Luo et al., 2017), and fish (Pereira et al., 2018) and mitochondrial impairments were reported in the brain of zebrafish (*Daion rerio*) sub-chronically exposed to a GBH at concentration as low as $65 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ Pereira et al. (2018). Interestingly, mitochondrial effects and neurotoxicity did not seem to be linked to glyphosate or co-formulant concentrations.

Seasonal variations in hematologic parameters resulting in erythrocytosis or leukopenia are well documented in RT and explained by physiological adaptation to external conditions (Morgan et al., 2008; Ihu? et al., 2018) or to breeding cycles with gonad maturation (Burgos-Aceves et al., 2019). Disturbance in hematologic parameters can also be induced by acute, sub-chronic or chronic exposure to GBHs, as reported in various fish species (Kreutz et al., 2011; Gluszczak et al., 2006; Gholami-Seyedkolaei et al., 2013; Salbego et al., 2010; Modesto and Martinez, 2010; Kondera et al., 2018). We showed that hematological parameters had a tendency to fluctuate during the sexual maturation and the spawning period but chemical contamination with glyphosate or GBHs had no impact on these parameters. At the spawning time, RT contaminated with Viaglif showed a lower, but not significantly different from the control, hematocrit index associated with a lower MCV. The hematocrit value reflects the capacity of blood to transport oxygen and low hematocrit could have been associated with lower physiological performances (Gallaughan and Farrell, 1998). The proportion of different leukocyte populations in fish exposed to GBHs presented a smaller proportion of macrophages and, consequently reduced phagocytic activity before the spawning period. These kinds of changes have already been reported after exposure to GBHs, and several authors have hypothesized that this could be the consequence of the oxidative stress induced by chemical contaminants which increases production of reactive oxygen species and damage cell membranes (Orun et al., 2013; Kreutz et al., 2010, 2011). The present study does not allow the validation of this hypothesis and further investigations will be necessary to demonstrate the involvement of oxidative stress in the toxicity of glyphosate and its co-formulants regarding immuno-hematological cell functions.

The complement system is an important component of innate immunity in teleost fish and can be affected by various abiotic stresses (Boshra et al., 2006), including chemical exposure (Rehberger et al., 2017). Different effects of GBHs on fish complement have been reported, depending in particular on the exposure dose. Kreutz et al. (2011) found no impact of sub-chronic exposure to a concentration of 0.730 mg L^{-1} of a GBH on complement hemolytic activity in the serum of goldfish (*Carassius auratus*), while Ma et al. (2015) reported that chronic exposure to doses of 52.08 and 104.15 mg L^{-1} of a GBH reduced both the expression and the content of complement (C3) in the kidney of common carp (*Cyprinus carpio*). At our level of contamination, no impact in hemolytic activity of alternative complement pathway was detected.

Cytokines are secreted proteins that are important for the development and regulation of fish immune responses. Among them, TNF- α and IL1- β act in inflammation and regulation of immune cells (Reyes-Cerpa et al., 2012). The expression of both these cytokines showed a decreasing (non-significant) trend in fish exposed to GBHs and this trend was also observed to a lesser extent for fish exposed to the AS. As some of these cytokines, like IL1- β , are produced by macrophages (Hong et al., 2013; Reyes-Cerpa et al., 2012), there can be a direct correlation between their level of expression and variations in the population of these immune cells. Disruption of the specific immune response set up to fight against an infectious agent could be detrimental for fish health and complementary studies must be done to confirm these tendencies.

Outside of the spawning period, where mortality events occurred in control and contaminated groups, no abnormal behavior or clinical signs were observed. Reproduction periods mobilize a large amount of energy and are frequently associated with greater fragility, making fish more

sensitive to external aggression (e.g. pathogens, sampling events; (Contreras-Sánchez et al., 1998)). No significant differences between conditions occurred in ponderal growth during the period of gonad maturation and spawning. Fish exposed to Roundup showed slightly lower weights, which could suggest an increase in energy demand due to detoxification and repair processes, leaving less energy available for growth and reproduction (Sokolova, 2013). The lower growth observed for the Roundup condition could be the result of an investment of the extra-energy produced in reproduction rather than in growth. This phenomenon has already been observed in RT, and different trade-offs can be seen depending on stress events (Contreras-Sánchez et al., 1998). Fecundity and fertility were studied using different markers on mature adult RT, and no impact of chemical exposure was shown. If a specific mechanism of reproductive toxicity occurred, such as hormone disruptions, it did not affect reproductive parameters measured here. Uren Webster et al. (2014) reported effects on steroidogenic biosynthesis pathways in zebrafish (*Danio rerio*), but no disruption of spermatogenesis and fertilization after simple or complex exposure at 10 mg L⁻¹ of glyphosate. In their study, egg production was impacted with pure glyphosate but not with GBH, which could act to maintain or restore the estrogen signaling pathway. Even though, in the present study, the very low environmentally relevant exposure of adult RT to glyphosate and GBHs might not affect reproductive parameters, it would be interesting to investigate if an impact may still occur on F1 generation due to exposure of gametes during gametogenesis.

5. Conclusions

This study investigated the impact of long-term chronic exposure to a low-dose of glyphosate in adult rainbow trout through the observation of a wide variety of parameters e.g. reproduction, oxidative response, energetic metabolism and immune system, including a comparison between the AS and two GBHs. The results obtained revealed no major changes for the majority of markers analyzed except, occasionally, some elements of the immune response such as the proportion of macrophages in the blood or phagocytic capacities. Interestingly, these significant modifications were observed only for the formulated products, suggesting a potential role of the co-formulants in the induced effect. The environmentally relevant exposure concentration of glyphosate of less than 1 µg L⁻¹ we used is probably too low to induce detectable changes over the 10-month period in adult fish. It is important to note that although our experimental conditions were optimal for the physiology of RT, the toxicity of glyphosate and GBH co-formulants in the real aquatic environment could be enhanced by biotic and abiotic stressors, and interaction with other chemicals – i.e. a cocktail effect. Complementary studies are ongoing on F1 and F2 generation derived from the RT used in this study to explore the potential effects of a direct interaction of chemicals with germinal cells but also of a transgenerational exposure.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the *Département des Côtes d'Armor*, the *Agglomération de Saint Brieuc* and the *Région Bretagne*.

We sincerely thank Dr. Daniel DORY for his involvement in the management of J. LE DU's Ph.D. and Craig STEVENS, MA, ELS (Coup de Puce Expansion; <http://www.coupdepuce.com>) for the English language review.

Appendix A. Growth parameters

Table 7

Table 7
Mean weights of mature RTs before and after spawning period.

Condition	Weights		
	Before spawning	After spawning	Ratios before/after
C	1208 ± 117	1387 ± 213	1.14 ± 0.13
G	1131 ± 193	1249 ± 222	1.11 ± 0.11
R	1252 ± 337	1230 ± 221	1.03 ± 0.25
V	1119 ± 245	1269 ± 189	1.15 ± 0.11

Weights values expressed as: mean(g) ± standard – deviation(g)

Weight before spawning have been measured in September 2018, weight after spawning have been measured in November 2018.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, vol. 105. Academic Press, pp. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, 2019. *Synthèse des données de surveillance Appui scientifique et technique n°2017-04*. Technical Report. Anses.
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.
- Ballesteros, N.A., Rodriguez Saint-Jean, S., Perez-Prieto, S.I., 2015. Immune responses to oral pcDNA-VP2 vaccine in relation to infectious pancreatic necrosis virus carrier state in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 165, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.04.001>.
- Bjork, S.J., Zhang, Y.A., Hurst, C.N., Alonso-Naveiro, M.E., Alexander, J.D., Sunyer, J.O., Bartholomew, J.L., 2014. Defenses of susceptible and resistant Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) against the myxozoan parasite *Ceratomyxa shasta*. *Fish Shellfish Immunol.* 37, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.024>.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 239–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.04.004>.
- Brousseau, P.P., 1999. *Manual of Immunological Methods*.
- Burgos-Aceves, M.A., Lionetti, L., Faggio, C., 2019. Multidisciplinary haematology as prognostic device in environmental and xenobiotic stress-induced response in fish. *Sci. Total Environ.* 670, 1170–1183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.275>.
- Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., de Menezes, C.C., Pretto, A., Baldissierotto, B., Santi, A., de Avila, L.A., 2011. Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 597–602. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0396-7>.
- Ceyhun, S.B., Senturk, M., Erdogan, O., Kufrevioglu, O.I., 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pest. Biochem. Physiol.* 97, 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.01.003>.
- Contreras-Sánchez, W.M., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S., Pereira, C.B., 1998. Effects of Stress on the Reproductive Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 58, 439–447. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.439>.
- Cortés, R., Teles, M., Tridico, R., Acerete, L., Tort, L., 2013. Effects of cortisol administered through slow-release implants on innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Genomics* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/619714>.
- Costabile, M., 2010. Measuring the 50% haemolytic complement (CH₅₀) activity of serum. *J. Visual. Exp.* 8–10. <https://doi.org/10.3791/1923>.
- Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1882–R1892. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00383.2007>.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2011. Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquat. Toxicol.* 105, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.022>.
- Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2012. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 400® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 424, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.055>.
- Dey, S., Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Kole, D., Ghosh, A.R., 2016. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerg. Contam.* 2, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>.
- Dunn, O.J., 1964. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6, 241–252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>.
- Dunnett, C.W., 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50, 1096–1121. <https://doi.org/10.1080/01621459.1955.10501294>.
- Dupuy, C., Cabon, J., Louboutin, L., Le Floch, S., Morin, T., Danion, M., 2019. Cellular, humoral and molecular responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a herbicide and subsequently infected with infectious hematopoietic necrosis

- virus. *Aquat. Toxicol.* 215, 105282. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105282>.
- El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I., Elagamy, E.I., 2001. Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro). *J. Environ. Sci. Health B* 36, 29–42. <https://doi.org/10.1081/PFC-100000914>.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Environmental Protection Series, 1996. *Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Rainbow Trout*.
- Espín, S., Sánchez-Virosta, P., García-Fernández, A.J., Eeva, T., 2017. A microplate adaptation of the thiobarbituric acid reactive substances assay to determine lipid peroxidation fluorometrically in small sample volumes. *Revista de Toxicología* 34, 94–98.
- European Food Safety Authority, 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 13, 4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>.
- Friedland, K.D., Ama-Abasi, D., Manning, M., Clarke, L., Kligis, G., Chambers, R.C., 2005. Automated egg counting and sizing from scanned images: rapid sample processing and large data volumes for fecundity estimates. *J. Sea Res.* 54, 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2005.06.002>.
- Gallaugh, P., Farrell, A., 1998. Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. *Fish Physiology*, vol. 17. Elsevier Inc., pp. 185–227. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60262-9](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60262-9).
- Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comp. Biochem. Physiol.* 151, 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.010>.
- Gholami-Seyedkolaei, S.J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Kosari, A.A., 2013. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.011>.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 167, pp. 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2.
- Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., Braga da Fonseca, M., de Araújo Pedron, F., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>.
- Glusczak, L., Loro, V.L., Pretto, A., Moraes, B.S., Raabe, A., Duarte, M.F., Da Fonseca, M. B., De Menezes, C.C., De Sousa Valladao, D.M., 2011. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 624–630. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9652-4>.
- Glusczak, L., Miron, D.d.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004>.
- Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C.J., Wang, T., 2013. Two Types of TNF- α Exist in Teleost Fish: Phylogeny, Expression, and Bioactivity Analysis of Type-II TNF- α 3 in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Immunol.* 191, 5959–5972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301584>.
- Ibarz, A., Blasco, J., Gallardo, M.A., 2010. Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp. Biochem. Physiol.* A 155, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.012>.
- Ihu?, A., Raducu, C., La?iu, C., Cocan, D., Uiuu, P., Mire?an, V., 2018. The influence of season variation on hematological parameters and oxidative stress for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Univ. Agric. Sci. and Vet. Med. Cluj-Napoca Anim. Sci. Biotechnol.* 75, 11. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb-003517>.
- Jackson, S.H., Cowan-Ellsberry, C.E., Thomas, G., 2009. Use of quantitative structural analysis to predict fish bioconcentration factors for pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 57, 958–967. <https://doi.org/10.1021/jf803064z>.
- Kekic, H., Ivanc, A., 1982. A new direct method for counting fish blood cells. *Ichthyologia* 14, 55–58.
- Kiliç, N., Işgör, M.M., Sengül, B., Beydemir, Ş., 2015. Influence of pesticide exposure on carbonic anhydrase ii from sheep stomach. *Toxicol. Ind. Health* 31, 823–830. <https://doi.org/10.1177/0748233713475508>.
- Kondera, E., Teodorczuk, B., Ługowska, K., Witeska, M., 2018. Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 44, 1011–1018. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0489-x>.
- Kreutz, L.C., Gil Barcellos, L.J., de Faria Valle, S., de Oliveira Silva, T., Anziliero, D., Davi dos Santos, E., Pivato, M., Zanatta, R., 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.012>.
- Kreutz, L.C., Gil Barcellos, L.J., Marteninghe, A., Davi dos Santos, E., Zanatta, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 694–697. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.003>.
- Li, M.H., Xu, H.D., Liu, Y., Chen, T., Jiang, L., Fu, Y.H., Wang, J.S., 2016. Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Toxicol. Res.* 5, 1039–1052. <https://doi.org/10.1039/c6tx00011h>.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Erroi, E., Schettino, T., 2012. Carbonic anhydrase as pollution biomarker: an ancient enzyme with a new use. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9, 3965–3977. <https://doi.org/10.3390/ijerph9113965>.
- Løvoll, M., Dalmo, R.A., Bøgwald, J., 2007. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 23, 721–731. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.019>.
- Luo, L., Wang, F., Zhang, Y., Zeng, M., Zhong, C., Xiao, F., 2017. In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. *J. Environ. Sci. Health B* 52, 410–417. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1293449>.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Chemosphere low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932–937. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>.
- Lushchak, V.I., 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>.
- Ma, J., Bu, Y., Li, X., 2015. Immunological and histopathological responses of the kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sublethally exposed to glyphosate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.004>.
- Ma, J., Li, X., 2015. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere* 128, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E., Laroche, 2006. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Mar. Biotechnol.* 8, 275–294. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3>.
- Matozzo, V., Munari, M., Masiero, L., Finos, L., Marin, M.G., 2019. Ecotoxicological hazard of a mixture of glyphosate and aminomethylphosphonic acid to the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Sci. Rep.* 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50607-0>.
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M., de Oliveira Ribeiro, C., Pereira, L., Maraschi, A., Prodocimo, V., Freire, C., Silva de Assis, H., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>.
- Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G.V., Dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2012. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 6–9. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8>.
- Mesa-Herrera, F., Quinto-Aleman, D., Díaz, M., 2018. A sensitive, accurate, and versatile method for the quantification of superoxide dismutase activities in biological preparations. *React. Oxygen Species*. <https://doi.org/10.20455/ros.2019.809>.
- Modesto, K.A., Martinez, B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>.
- Morgan, A.L., Thompson, K.D., Auchinachie, N.A., Migaud, H., 2008. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.011>.
- de Moura, F.R., Brentegani, K.R., Gemelli, A., Sinhorin, A.P., Sinhorin, V.D.G., 2017. Oxidative stress in the hybrid fish *juandara* (*Leiodorus marmoratus* × *Pseudoplattystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. *Chemosphere* 185, 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030>.
- OECD, 2006. *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application*. OECD Environment Health and Safety Publications, p. 54.
- OECD, 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>.
- Oost, D., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).
- Orun, I., Dogru, M.I., Erdogan, K., Dogru, A., Ongun, A., Yuksel, E., Talas, Z.S., 2013. Effects of acute and chronic exposure to glyphosate on common carp (*Cyprinus carpio* L.) hematological parameters: the beneficial effect of propolis. *Fresenius Environ. Bull.* 22, 2504–2509.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765>.
- Pédon, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J.L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V.F., Le Grand, F., Laroche, J., 2017. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 129, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010>.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044>.
- Pereira, A.G., Jaramillo, M.L., Remor, A.P., Latini, A., Davico, C.E., da Silva, M.L., M”uller, Y.M., Ammar, D., Nazari, E.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075>.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Giocchini, G., de Blas, I., Ruitz-Zarzuola, I., 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.005>.

- Persch, T.S.P., Weimer, R.N., Freitas, B.S., Oliveira, G.T., 2017. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere* 174, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.092>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> e45–e45.
- Pimentel, M.S., Faleiro, F., Machado, J., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., 2019. Seabream larval physiology under ocean warming and acidification. *Fishes* 5, 1. <https://doi.org/10.3390/fishes5010001>.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L., 2017. 20 Years of fish immunotoxicology – what we know and where we are. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 509–535. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024>.
- Reyes-Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-Lpez, F., Toro-Ascuy, D., Mara, A., Imarai, M., 2012. Fish cytokines and immune response. *New Advances and Contributions to Fish Biology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53504>.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes, C.C., Lazzari, R., Radünz Neto, J., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 740–745. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9464-y>.
- Seber, G., Wild, C., 1989. Growth Models. <https://doi.org/10.1002/0471725315.ch7>.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., da Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.008>.
- Sulukan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Isik, M., Atamanalp, M., Ceyhun, S.B., 2017. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* 180, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018>.
- Székács, A., Darvas, B., 2018. Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.* 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671–677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>.
- Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kiliç, N., Erdogan, O., Ceyhun, S.B., 2015. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027>.
- Torretta, V., Katsoyiannis, I.A., Viotti, P., Rada, E.C., 2018. Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability (Switzerland)* 10, 1–20. <https://doi.org/10.3390/su10040950>.
- Udeigwe, T.K., Teboh, J.M., Eze, P.N., Hashem Stietiya, M., Kumar, V., Hendrix, J., Mascagni, H.J., Ying, T., Kandakji, T., 2015. Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. *J. Environ. Manage.* 151, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.024>.
- 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>.
- Uren Webster, T.M., Santos, E.M., 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics* 16, 32. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>.
- Van Bruggen, A., He, M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K., Finckh, M., Morris, J., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *J. Biol. Chem.* 242, 4221–4229.
- Welch, B.L., 2012. *Biometrika Trust. Biometrika* 38, 330–336.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilcox, R., 2017. *Robust Regression. Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing*, pp. 517–583. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804733-0.00010-X>.

Chapitre 4

Impact d'une faible dose environnementale de glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé d'une génération F1 de truites arc-en-ciel

« Si rien n'existe que la matière, le bien et le mal, le beau et le laid, le juste et l'injuste n'ont pas d'existence réelle. »

André Comte-Sponville

Sommaire

4.1 Introduction	142
4.2 Effet d'une exposition chronique à une faible dose environnementale de glyphosate sur le développement sur la truite arc-en-ciel, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	142
4.2.1 Contexte	142
4.2.2 Objectifs / approche	142
4.2.3 Principaux résultats	143
4.2.4 Article	143
4.3 Modifications des défenses immunitaires de la truite arc-en-ciel <i>Oncorhynchus mykiss</i> juvénile exposée intergénérationnellement au glyphosate et soumise à une infection au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse.	155
4.3.1 Contexte	155
4.3.2 Objectifs / approche	155
4.3.3 Principaux résultats	155
4.3.4 Article	156

4.1 Introduction

La génération étudiée dans ce chapitre est la génération F1_2018, génération obtenue en novembre 2018 de la génération de truites F0_2014 contaminée pendant 8 mois à la substance active et aux deux GHBs. Cette génération F1 a été exposée au glyphosate seul ou associé à des co-formulants via différents modes d'exposition.

4.2 Effet d'une exposition chronique à une faible dose environnementale de glyphosate sur le développement sur la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*

4.2.1 Contexte

Les études décrites dans la revue bibliographique de cette thèse montrent que les stades juvéniles de certaines espèces de poissons sont parmi les plus sensibles face à la contamination au glyphosate seul ou co-formulé. En effet, les stades précoces passent, en quelques jours ou quelques heures dépendamment de l'espèce considérée, par des phases critiques de développement. L'orchestration du déroulement de ces différentes phases est régie par des signaux moléculaires fondamentaux pour leur accomplissement. La perturbation de ces processus physiologiques finement régulés par une contamination à des composés chimiques peut altérer l'ensemble du développement des stades précoces de poissons. La considération de ces stades de vie sensibles dans l'évaluation de la toxicité liée au glyphosate est donc primordiale. De plus, la transmission de la toxicité via les générations antérieures par des mécanismes non génétiques est encore peu étudiée, même si certaines études semblent pointer un effet de ce mode de transmission.

4.2.2 Objectifs / approche

Dans une première étude visant à caractériser l'impact des contaminants sur le développement précoce de la truite arc-en-ciel, les expositions directes, intergénérationnelles et mixtes ont été prises en compte. Le principal objectif était d'intégrer l'effet de l'exposition des parents sur le développement embryonnaire et larvaire de truites exposées ou non avec la substance parentale (c.-à-d. ayant elle-même été administrée aux parents). Pour permettre une caractérisation la plus complète possible de l'effet des différents contaminants ainsi que de l'exposition parentale, des analyses ont été réalisées à l'échelle de différents niveaux d'organisations biologiques allant du comportement de l'individu (c.-à-d. paramètre très intégratif) jusqu'à l'effet sur une cible moléculaire potentielle du glyphosate. Tous les effets de la contamination parentale ne sont cependant pas détectables au stade larvaire, pour des raisons à la fois pratiques (p. ex. les épreuves virales expérimentales sont plus facilement mises en place et efficaces au stade juvénile) et biologiques (c.-à-d. effets latents).

4.2.3 Principaux résultats

Les points clefs

- La toxicité directe, inter et multigénérationnelle, du glyphosate a été étudiée sur le développement précoce de la truite arc-en-ciel.
- La substance active seule ou co-formulée n'a pas augmenté le taux de mortalité des embryons ou des larves.
- Des changements biométriques ont été induits par l'exposition directe au glyphosate.
- Des perturbations comportementales ont été observées chez les larves issues d'une exposition intergénérationnelle au glyphosate et au Roundup, mais pas au Viaglif.
- L'exposition parentale au Roundup a induit des perturbations au niveau de la balance énergétique aérobie/anaérobie.
- voir la figure 4.1 pour un résumé graphique.

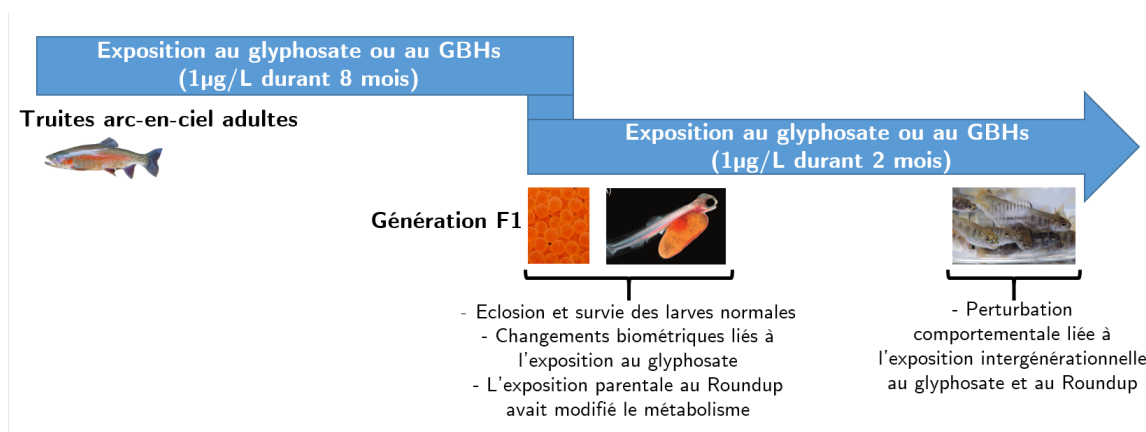
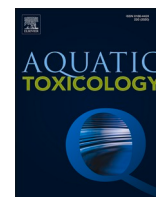


FIGURE 4.1 – Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de l'impact du glyphosate sur le développement précoce de la génération de truites F1.

4.2.4 Article

Voir l'article publié dans le journal *Aquatic Toxicology* pages 144-154 (11 pages).



Developmental effect of parental or direct chronic exposure to environmental concentration of glyphosate on the larvae of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Jessy Le Du-Carrée^{*,a,b}, Florian Saliou^a, Jérôme Cachot^c, Thierry Morin^a, Morgane Danion^a

^a French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Fish Virology, Immunology and Ecotoxicology Unit, 29280 Plouzané, France

^b UBO University of Western Brittany, Brest, France

^c UMR CNRS 5805 EPOC, University of Bordeaux, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Glyphosate-based herbicide
Chronic exposure
Embryo-larval development
Generational toxicity
Larval behaviour

ABSTRACT

The environmental safety profile of glyphosate, the most commonly used herbicide worldwide, is still a subject of debate and little is known about the generational toxicity of this active substance (AS) and the associated commercial formulations called "glyphosate-based herbicides" (GBHs). This study investigated the impact of parental and direct exposure to $1\mu\text{gL}^{-1}$ of glyphosate using the AS alone or one of two GBH formulations (i.e. Roundup Innovert® and Viaglif Jardin®) in the early developmental stages of rainbow trout. Three different modes of exposure on the F1 generation were studied: (1) intergenerational (i.e. fish only exposed through their parents); (2) direct (i.e. fish exposed only directly) and (3) multigenerational (i.e. fish both exposed inter-generationally and directly). The impact of chemical treatments on embryo-larval development (survival, biometry and malformations), swimming behaviour, biochemical markers of oxidative stress equilibrium (TBARS and catalase), acetylcholine esterase (AChE) and energy metabolism (citrate synthase, CS; cytochrome-c oxidase, CCO; lactate dehydrogenase, LDH; glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH) was explored. Chemical exposure did not affect the survival of F1 embryos or malformation rates. Direct exposure to the AS induced some biometric changes, such as reduction in head size (with a 10% decrease in head length), independently of co-formulants. Intergenerational exposure to the AS or the Roundup GBH increased swimming activity of the larvae, with increase of between 78 and 102% in travel speeds. Viaglif co-formulants appear to have counteracted this behavioural change. The minor changes detected in the assayed biochemical markers suggested that observed effects were not due to oxidative damage, AChE inhibition or alterations to energy metabolism. Nonetheless, multi- and intergenerational exposure to Roundup increased CS:CCO and LDH:CS ratios by 46% and 9%, respectively, with a potential modification of the aerobic-to-anaerobic energy production balance. These biochemical effects were not correlated with those observed on individual level of biological organization. Therefore, further studies on generational toxicity of glyphosate and its co-formulants are needed to identify the other mechanisms of glyphosate toxicity at the cellular level.

1. Introduction

Glyphosate is the most commonly used herbicidal active substance (AS) in the world (Benbrook, 2016). Due to its efficiency in controlling weed development, this agrochemical rapidly became vital to the agricultural sector, which has adapted its practices to this herbicide, particularly with the development of genetically modified glyphosate-resistant crops (Székács and Darvas, 2018; Torretta et al.,

2018). The constant increase in the use of this herbicide throughout the world over the past years has made it ubiquitous in the environment (Bruggen et al., 2018). Naturally, this widespread use has raised issues on the ecotoxicity of glyphosate, and some studies have evaluated the risk posed by this substance for different environmental compartments (EFSA; Folmar et al., 1979; Giesy et al., 2000).

Glyphosate, with a mean half-life from 2.8 to 500.3 days in soils and 6.8 to 21.8 days in the water phase of water-sediment system (EFSA)

* Corresponding author.

E-mail address: jessy.ledu@anses.fr (J. Le Du-Carrée).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105894>

Received 26 January 2021; Received in revised form 3 May 2021; Accepted 1 June 2021

Available online 6 June 2021

0166-445X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

(the variability of these values is due to the different biotic and abiotic parameters influencing its degradation (Giesy et al., 2000)), does not have a very high level of persistence in the environment (Matozzo et al., 2019; Myers et al., 2016). In surface water, its occurrence and concentrations depend on the climate, the agricultural region and the frequencies and the AS doses used (Coupe et al., 2011). In French surface water, a maximum concentration of $70.2\mu\text{gL}^{-1}$ was detected among the 21,561 sampling points followed in a 10-year period going from 2007 to 2017 (Anses, 2019). This was the unique analysis that overwhelmed the reported value of Predicted No Effect Concentration (PNEC of $60\mu\text{gL}^{-1}$, determined using both acute and chronic toxicity values) in 10 years. However lower concentrations were detected in 49.7% of the sampling point in 2017. Also, mean concentration in french surface water reported by Ineris (2020) was $0.22\mu\text{gL}^{-1}$ of active substance. Furthermore, several studies have provided evidence that glyphosate associated with co-formulants in glyphosate-based herbicides (GBHs) is toxic to aquatic wildlife (de Brito Rodrigues et al., 2019; Folmar et al., 1979; Giesy et al., 2000). Nevertheless, ecotoxicological research comparing the effect of long-term glyphosate exposure through pure AS or in GBHs in fish are lacking (Smith et al., 2019).

The bioaccumulation potential of glyphosate in animal tissues is low (Duke, 2020; , EFSA), but some studies have revealed that glyphosate and GBHs can affect physiological processes in fish (e.g. oxidative stress, mitochondrial physiology, immune function, energy metabolism), with severity depending on the life stage and the species considered (Gluszczak et al., 2007; Kreutz et al., 2010; Pereira et al., 2018; Webster and Santos, 2015; Weeks Santos et al., 2019). Most studies have focused on non-environmentally relevant doses with high toxicity, which trigger unspecific physiological responses, revealing general dysfunctions rather than perturbations directly related to the mode of action of glyphosate. Nonetheless, several ecotoxicological studies have pointed out the toxicity of glyphosate, alone or co-formulated, at lower doses that are more in line with environmental concentrations (Ayanda, 2018; Faria et al., 2020; Marchand et al., 2006; Zhang et al., 2017). At these environmentally relevant doses, glyphosate alone induces effects at different levels of biological organization in fish: e.g. at the cellular level, the inhibition of certain enzymes such as acetylcholine esterase (AChE) (Gluszczak et al., 2007), changes in parameters related to the oxidant/antioxidant equilibrium (Ayanda, 2018; Persch et al., 2017), modifications in energy metabolism (Ayanda et al., 2015; Gluszczak et al., 2007; Marchand et al., 2006) and at the individual level, disruptions in early development (Fiorino et al., 2018; Zebral et al., 2017) and behavioural changes (Bridi et al., 2017; Faria et al., 2020; Giaquinto et al., 2017; Zhang et al., 2017).

Toxicity can potentially be transmitted vertically through generations, thereby modulating the toxicity of glyphosate and its co-formulants in the natural environment (Hanson and Skinner, 2016). The generational toxicity of glyphosate has not been intensively studied, principally due to the complexity of the experimental design which must include several generations of fish. Intergenerational toxicity is defined as the toxicity transmitted from the F0 genitor generation to the F1 generation, with the F1 generation being directly contaminated via the germinal cells produced in the parental bodies (Best et al., 2018; Stenz et al., 2018). Multigenerational toxicity corresponds to direct exposure, at the level of the entire individual, of both genitors and future generations (Hanson and Skinner, 2016). In *Danio rerio*, the exposure of the F0 generation to both glyphosate and a GBH at a concentration of 10mgL^{-1} increased the F1 susceptibility to these pesticides during embryogenesis (i.e. increased mortality rate and premature hatching) (Webster et al., 2014). Another study (Smith et al., 2019), showed that a reduction in hatching success and an increase in developmental abnormalities may be associated with epigenetic effects detected in the parental generation following exposure during their early life stages to glyphosate, co-formulated or not, at the concentration of 0.5mgL^{-1} .

In this study, we evaluated the ability of a low environmental

concentration of glyphosate and two GBHs to induce direct and/or generational toxic effects in an F1 generation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Potential toxicity was investigated at the individual level, with analyses of malformation frequencies and behavioural changes, and at the cellular level, focusing on energy metabolism and oxidative stress.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

Assays on fish were done in strict accordance with European guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare (European Union Directive 2010/63). Experimental procedures were validated by the animal ethics committee ANSES/ENVA/UPC No. 16 and authorized by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS#2019010812403065). A lethal dose of 100 ppm of eugenol into tank water was used to euthanize fish.

2.2. Chemical compounds

We used the AS glyphosate (G; Sigma-Aldrich, ref. 45521, CAS Number 1071-83-6) and two GBHs, Roundup Innovert® (R) and Viaglif Jardin® (V). The purity of G was 98%, and the glyphosate concentration of Roundup and Viaglif were 360 and 420gL^{-1} , respectively. The two commercial products were bought at Agrilisa, R was formulated for professional use and V was formulated for home gardens. Details on the formulations and concentrations of these two commercial products were not listed and were unknown because they are proprietary and protected by industrial secret. For each product, aqueous concentrated solutions (4mgL^{-1}) were prepared and stored under appropriate conditions (darkness, 4°C). Pure glyphosate was diluted first in 10mL of pure methanol (solvent concentration of concentrated solution was 10mLL^{-1} so the final dose of methanol exposure was kept under $4\mu\text{LL}^{-1}$ as recommend by Hutchinson et al. (2006)).

2.3. Fish

Specific pathogen free mature rainbow trout (3 years old; F0 generation) were exposed daily for 8 months to control (C) or to a mean glyphosate concentration of 123ngL^{-1} using pure glyphosate, Roundup or Viaglif, before producing the F1 generation (Le Du-Carrée et al., 2021). Embryonic development was conducted in a shallow bottom tank containing approximately 300L. All fish were maintained in filtered river water, with a water flow rate to ensure complete renewal once an hour and maintain appropriate physico-chemical conditions and oxygen saturation greater than 60%. A photoperiod of 12 h of daylight was maintained throughout the experiments. Fish feed (Le Gouessant), adapted for fish size, was given *ad libitum*.

2.4. Reproduction and embryonic development

Reproduction of fish from F0 generation is described in the article of Le Du-Carrée et al. (2021). Embryonic development of the F1 generation until the eyed stage (Bobe et al., 2000) was conducted in tanks, containing approximately 300L, continuously renewed with river water (at a flow rate of approximately 300L h^{-1}). After the eyed stage, rainbow trout embryos were placed in 10 tanks (40L) in a confined room. Temperature was maintained at $8^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ throughout embryonic development.

2.5. Chemical exposure

Once the embryos reached the eyed stage, they were exposed to 10 conditions of chemical exposure that are given in Fig. 1. The name of

each condition is composed of two letters separated by a slash, the first letter represents the chemical exposure of the F0 generation and the second letter represents the chemical exposure of the F1 generation. Fish from non-contaminated parents and not directly exposed to glyphosate or GBHs formed the control condition (i.e. C/C). Fish from non-contaminated parents, but directly contaminated make up the C/G, C/R, and C/V conditions. Fish from contaminated F0 and not directly contaminated compose the intergenerationally contaminated conditions G/C, R/C, and V/C. Finally, the fish that were contaminated directly and intergenerationally represent the multigenerational exposure conditions G/G, R/R, and V/V. Chemical exposure of the F1 generation was conducted using the same methodology as that used for the F0 (details are available in ref. Le Du-Carrée et al., 2021): every working day (generally 5 days a week), 10mL of the condition respective concentrated chemical solution was added to the experimental tanks in which water input was stopped for 1 h. After 1 h of contact, water flow was set to 13.5 L h^{-1} for the rest of the day, resulting in the gradual dilution of glyphosate. The theoretical kinetics of glyphosate concentrations was modelled using the Equation 1 and the resulting curve is shown in Fig. 3. The integrated mean daily expected concentration was approximately 123 ngL^{-1} (the area integrated is the blue zone under the theoretical dilution curve in Fig. 3).

$$C(t) = C_{\text{initial}} \times e^{-\text{rate}/V_{\text{tank}} \times \text{time}} \quad (1)$$

2.6. Samples and sampling dates

The experimental design timeline is presented in Fig. A.5 in supplementary data. To measure hatching frequencies, egg survival was assessed daily for each female on a fraction of approximately 200 eggs isolated in plastic breeding boxes until all eggs were either dead 34 or hatched. Larval survival was determined on the hatched eggs used for evaluating hatching frequencies; these eggs were placed in plastic breeding boxes 35 days after hatching.

For each condition, 25 larvae were sampled at 320 degree-day (DD ; sampling date S1, see Fig. A.5) after 14 days of direct exposure and at 328DD (S2) for intergenerational exposure. They were placed in a 3% glutaraldehyde solution (described by (Nikolakakis et al., 2014)), at 4°C until biometric and malformation analyses. At 488DD (S3), 25 larvae were sampled in each tested condition to measure oxidative stress and metabolic markers. Whole larvae were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for future analyses. Proteins were extracted by homogenizing whole larvae in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8) with 20% glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor using the tissue homogenizer Precellys 24 (Bertin Technologies, France).

2.7. Determination of glyphosate concentrations in exposure tank

Glyphosate was quantified in water after two months of chemical contamination using a direct competitive ELISA assay (Novakits, ref. 1500086) at two time points in the daily experimental procedure (i.e. just before restarting the water flow (wfr) and 2 hours after wfr), as described in ref. Le Du-Carrée et al., 2021. A total of $250 \mu\text{L}$ of filtered water was used to conduct the ELISA assay and final absorbance was read at 450nm on a TECAN's Spark 10M microplate spectrophotometer. The four-parameter log-logistic function, LL.4, of the "drc" R package (Seber and Wild, 1989), was used to generate the standard curve. The OD value obtained for the sample was plotted on the quantification standard curve to determine the glyphosate concentration in each sample.

2.8. Biometric index measurements and malformation analyses

Biometric index measurements and malformations were analysed on images of individual larvae taken on a stereo microscope (Leica MZ75)

combined with a ToupCam camera (U3CMOS05100KPA). Body and head length, eye diameter and yolk-sac surface were measured using the software ToupView 3.7 (Fig. 2a). Malformation frequencies were determined on larvae considering jaw malformations (Fig. 2b), yolk-sac oedema (not shown) and spinal curvatures (Fig. 2c) as described by Sulukan et al. (2017).

2.9. Swimming behaviour analysis

The protocol of photomotor assay was adapted from the study of Weeks Santos et al. (2019) and applied to swimming larvae (i.e. 855DD; S4) maintained at 11 °C throughout the experiment. To avoid perturbation due to the circadian rhythm, analyses were done during a maximum duration of 4 h per day for three days. The DanioVision (Noldus, version 12.1) system was used to record the behaviour of larvae placed in six-well cell culture plates (Nunc, ref. 140685) with each flat well containing 2 mL of water. For each assay, larvae were acclimated in the plate for 10 min in the dark before the measurements began. An infrared camera coupled to the DanioVision system was used for recording videos. The 30 min recording was divided into three phases at different light intensities: 10 min of darkness (Dark 1), followed by 10 min of light (light 1), finally followed by 10 minutes of darkness (Dark 2). The distance (in meters) travelled by each larva during these three light-dark phases was then used to compare the effect of the different chemical treatments.

2.10. Assays for oxidative stress and metabolic markers and choline esterases

Colorimetric analysis was carried out on a TECAN Spark 10M microplate spectrophotometer. Choline esterases (ChE) were measured at 412nm, using a protocol adapted from Ellman et al. (1961). Each assay was performed in duplicate or triplicate. Oxidative stress markers, namely thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and catalase (CAT) were assayed in whole larvae homogenates at 532nm and 240nm, respectively, following procedures adapted from Espin et al. (2017) and Aebi (1984). Metabolic markers, i.e. citrate synthase, CS; cytochrome c oxidase, CCO; lactate dehydrogenase, LDH; glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH, were measured in whole larvae samples at 412nm, 550nm, 340nm and 340nm, respectively, following procedures described in Gauthier et al. (2008).

The slope of the optical density = $f(\text{time})$ curve plotted on a calibration curve allowed the calculation of enzymatic activity. Calibration curves were generated using pure enzymes purchased at Sigma-Aldrich: CAT (ref. SRE1010), GPx (ref. G6137), SOD (ref. 55395), AChE (ref. C3389), CA (ref. C2624), CS (ref. C3260), CCO (in-house reference solution made from trout liver at our laboratory, from which enzyme activity was calculated with a molar extinction coefficient, ϵ , of 21.84), LDH (ref. 427217) et G6PDH (ref. G5885) and 1,1,3,3-tetramethoxypropane (ref. T9889) for the TBARS assay. Protein concentrations were measured using the Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific), and results were expressed as specific activity (IUmg^{-1} of protein).

2.11. Data processing and statistical analyses

Statistical analyses and data processing were done using R software (R Core Team, 2018). Figures were generated using the ggplot2 package (Wickham, 2016). Data sets were tested for normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (test of Levene for parametric data and Fligner-Killeen for non-parametric data). When normal and homoscedastic data were confirmed, one-way ANOVA tests were used to compare means, followed by Dunnett's post-hoc test (Dunnett, 1955). For normal and heteroscedastic data, modified one-way ANOVA were employed to compare means (Welch, 2012), followed by Tamhane-Dunnett post-hoc test of (OECD, 2006). For non-normal data, a Kruskal-Wallis test was

Table 1
Final hatching rate (expressed in %; $159 \leq n \leq 274$) and survival rate after 35 days (expressed in %; $155 \leq n \leq 268$) for each chemical exposure condition (see Fig. 1).

Mode of exposure	Condition	Parameter	
		Hatching rate (%)	Survival rate (%)
Control	C/C	95.14	87.92
	Direct C/G	99.11	91.44
	C/R	97.24	93.93
	C/V	97.54	91.70
Intergenerational	G/C	97.04	91.37
	R/C	97.48	90.32
	V/C	96.37	85.48
Multigenerational	G/G	97.81	91.04
	R/R	97.66	91.24
	V/V	94.50	85.19

Table 2
Malformation frequencies measured in trout larvae directly ($23 \leq n \leq 25$) and intergenerationally exposed to contaminants ($n = 25$) for each chemical exposure condition (see Fig. 1).

Mode of exposure	Condition	Type of malformation (%)	
		jaw	spinal curvature
Direct	C/C	0	13
	C/G	4	12
	C/R	4	12
	C/V	4	24
Intergenerational	C/C	4	12
	G/C	0	12
	R/C	0	12
	V/C	4	20

used to compare means, followed by Dunn’s post-hoc test (Dunn, 1964). Differences between hatching and malformation rates were compared using a chi-squared test. Survival rates for the different chemical treatments were compared using the log-rank test in the “survival” R package (Therneau, 2015). A p-value of 0.05 was used as the threshold for statistical significance.

Table 3
Mean biometric indices measured in trout larvae directly or intergenerationally exposed to contaminants (see Fig. 1). Standard errors are given in parentheses under the mean ($23 \leq n \leq 25$). Lengths are expressed in mm, surfaces in mm² and ratios in %. The values in bold with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$) to the values obtained for the control condition (C/C).

Index	Intergenerational exposure				Direct exposure			
	C/C	G/C	R/C	V/C	C/C	C/G	C/R	C/V
Body length	12.67 (0.15)	12.52 (0.1)	13.56* (0.08)	12.52 (0.14)	13.13 (0.12)	12.61 (0.11)	12.35 (0.16)	12.89 (0.14)
Head length	2.54 (0.046)	2.5 (0.045)	2.67 (0.036)	2.44 (0.046)	2.82 (0.043)	2.52* (0.046)	2.5* (0.059)	2.6* (0.032)
Eye diameter	1.24 (0.025)	1.23 (0.018)	1.3 (0.017)	1.26 (0.02)	1.32 (0.019)	1.18* (0.018)	1.19* (0.029)	1.23* (0.018)
Yolk-sac surface	18.89 (0.59)	17.8 (0.47)	20.21 (0.31)	19.22 (0.72)	19.72 (0.54)	20.14 (0.55)	18.95 (0.72)	20.49 (0.49)
Head:Body length	20.05 (0.22)	19.98 (0.28)	19.7 (0.21)	19.49 (0.29)	21.45 (0.27)	19.94* (0.25)	20.26* (0.42)	20.2* (0.21)
Eye:Head length	48.86 (0.51)	49.45 (0.57)	48.9 (0.44)	51.64* (0.52)	47.02 (0.53)	47.00 (0.84)	48.09 (1.21)	47.3 (0.6)

3. Results

3.1. Glyphosate concentration in water

Glyphosate was never detected in the control tank during the experiment. Glyphosate concentrations between 1.18 ± 0.036 and $1.95 \pm 0.086 \mu\text{gL}^{-1}$ were detected in all contaminated tanks 1 h after adding the chemical solutions (Fig. 3). Two hours after restarting the water flow, measured concentrations were slightly below those predicted by the theoretical kinetics (from 0.30 ± 0.015 to 0.34 ± 0.021 instead of expected value of $0.51 \mu\text{gL}^{-1}$).

3.2. Hatching and larvae survival, malformations and biometric indices

Neither the hatching percentage nor the larval survival rate during the 35 days after hatching was significantly affected by chemical exposure (Table 1).

No yolk-sac oedemas were observed. Jaw appeared in larvae at frequencies varying from 0 to 4%, depending on the exposure condition. Spinal curvature was the most frequent malformation observed (12 to 24%). Chemical treatments had no impact on malformation rates (Table 2).

No statistical significant differences between control and directly contaminated larvae were observed for body length, yolk-sac surface or eye:head length ratio (Table 3). However, there were significant reductions in head ($p.value < 0.0001$, d.f.= 3 and $f = 9.46$), eye diameter ($p.value < 0.0001$, d.f.= 3 and $\chi^2 = 28.06$) and head:body length ratio ($p.value = 0.008$, d.f.= 3 and $f = 6.51$). For head length, post-hoc tests revealed significant differences for the C/G (-11%), C/R (-11%) and C/V (-8%) conditions compared with the control ($p.value < 0.05$). For eye diameter, significant differences were observed for the C/G (-11%), C/R (-10%) and C/V (-7%) conditions ($p.value < 0.05$). For head:body length ratio, significant differences were observed for the C/G (-7%), C/R (-6%) and C/V (-6%) conditions compared with the control ($p.value < 0.05$). Intergenerational exposure induced no statistically significant differences between control and chemically contaminated larvae for most of the biometric indices considered (Table 3). However, a significant effect of chemical concentration was observed in body length ($p.value < 0.0001$, d.f.= 3 and $\chi^2 = 45.05$) and in the ratio between eye and head length ($p.value = 0.0004$, d.f.= 3 and $f = 6.56$). Post-hoc tests revealed significant increases compared with the control, with +7% in body length for the R/C condition and +6% in eye:head length ratio for the V/C condition ($p.value < 0.05$).

Table 4

Mean specific enzymatic activity, activity ratios and TBARS level measured in whole larvae at 488DD according to chemical exposure condition (see Fig. 1). Standard errors are represented in parentheses under the mean ($12 \leq n \leq 20$). Specific activity is expressed in IUmg⁻¹ of protein and MDA concentrations in nmolmg⁻¹ of protein. The numbers in bold with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$) to the values observed for the control condition. CCO, cytochrome-c oxidase; CS, citrate synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; LDH lactate dehydrogenase; CAT, catalase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances, AChE, acetylcholine esterase.

Biochemical marker	Mode of exposure									
	Control	Intergenerational			Direct			Multigenerational		
	C/C	G/C	R/C	V/C	C/G	C/R	C/V	G/G	R/R	V/V
CS:CCO	0.0088 (0.00052)	0.0087 (0.00046)	0.0095 (0.00089)	0.0082 (0.00031)	0.0085 (0.00053)	0.0087 (0.00051)	0.0097 (0.00042)	0.008 (0.00045)	0.013* (0.0017)	0.0094 (0.00049)
LDH:CS	458.98 (7.18)	471.04 (12.28)	512.21* (10.57)	458.56 (8.42)	481.81 (7.65)	480.03 (9.54)	471.29 (10.6)	482.19 (13.62)	501.93* (9.09)	470.33 (12.95)
G6PDH	0.64 (0.023)	0.63 (0.033)	0.63 (0.027)	0.59 (0.021)	0.57 (0.018)	0.62 (0.022)	0.65 (0.029)	0.62 (0.038)	0.69 (0.023)	0.61 (0.021)
CAT	56.88 (2.28)	57 (2.49)	58.31 (2.53)	55.26 (2.09)	52.19 (1.99)	56.95 (2.61)	58.15 (3.16)	57.62 (2.8)	62.5 (2.88)	57.61 (1.96)
TBARS	0.35 (0.065)	0.32 (0.027)	0.27 (0.033)	0.24 (0.03)	0.29 (0.036)	0.32 (0.036)	0.35 (0.046)	0.29 (0.024)	0.34 (0.052)	0.44 (0.127)
AChE	0.39 (0.0104)	0.39 (0.011)	0.35 (0.0105)	0.36 (0.0113)	0.37 (0.0106)	0.37 (0.0116)	0.36 (0.0121)	0.42 (0.0244)	0.34 (0.011)	0.36 (0.0085)

Table B.5

Mean specific enzymatic activity measured in whole larvae at 488DD according to chemical exposure condition (see Fig. 1). Standard errors are represented in parentheses under the mean ($12 \leq n \leq 20$). Specific activity is expressed in IUmg⁻¹ of protein. The numbers in bold with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$) to the values observed for the control condition. CCO, cytochrome-c oxidase; CS, citrate synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; LDH lactate dehydrogenase; CAT, catalase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances, AChE, acetylcholine esterase.

Biochemical marker	Mode of exposure									
	Control	Intergenerational			Direct			Multigenerational		
	C/C	G/C	R/C	V/C	C/G	C/R	C/V	G/G	R/R	V/V
CCO	35.77 (1.82)	35.1 (1.74)	32.97 (1.94)	36.04 (1.33)	33.54 (1.91)	34.3 (1.53)	31.21 (1.27)	37.41 (2.24)	29.22 (2.21)	32.79 (1.27)
CS	0.29 (0.008)	0.29 (0.008)	0.29 (0.0073)	0.29 (0.0075)	0.27 (0.0083)	0.28 (0.0058)	0.29 (0.0107)	0.28 (0.0123)	0.32 (0.0121)	0.3 (0.0096)
LDH	134 (4.11)	134.86 (4.58)	146.14 (3.76)	131.3 (3.19)	131.25 (4.2)	136.73 (4.19)	136.62 (4.42)	136.63 (5.47)	156.08* (5.21)	139.4 (4.61)

3.3. Metabolic activity in whole larvae

Results from the enzymatic and TBARS assays are given in Table 4 (except for CS, CCO and LDH activities presented in supplementary data in Table B.5). No major significant change in mean activity was observed at 488DD for the oxidative stress markers (i.e. CAT and TBARS), or for AChE and the metabolic markers (i.e. CS, CCO, G6PDH) except for LDH ($p.value = 0.004$, d.f.= 9 and $\chi^2 = 24.02$). A post-hoc test revealed a significant increase in LDH activity for the R/R condition compared with the control (+ 16%, $p < 0.05$).

Means of CS:CCO ratio values were $8.8 \times 10^{-3} \pm 5.2 \times 10^{-4}$ for the control condition (Table 4) and comprised between $8.0 \times 10^{-3} \pm 4.5 \times 10^{-4}$ and $9.7 \times 10^{-3} \pm 4.2 \times 10^{-4}$ for the other conditions except for the R/R condition which showed a ratio of $13 \times 10^{-3} \pm 1.7 \times 10^{-3}$. This latter ratio was significantly different to the control condition (global mean difference : $p.value = 0.004$, d.f.= 9 and $\chi^2 = 24.27$; +46%, $p < 0.05$).

For the LDH:CS ratio (Table 4), values were 458.98 ± 7.18 for the control condition, comprised between 458.56 ± 8.42 and 482.19 ± 13.62 for the other conditions, except for R/C and R/R, which showed values of 512.21 ± 10.57 and 501.93 ± 9.09 , respectively. For the LDH:CS ratio, a statistical difference was observed among all the conditions ($p.value = 0.002$, d.f.= 9 and $\chi^2 = 25.86$) and a post-hoc test revealed significant differences to the control for the R/C (+12%, $p < 0.05$) and

R/R (+9%, $p < 0.05$) conditions.

3.4. Swimming behaviour of intergenerationally exposed trout

During the photomotor assay, larvae travelled approximately $4.95m \pm 0.49m$ and $6.86m \pm 0.51m$ in the first and the second period of darkness, respectively (Fig. 4). Speed dramatically decreased in the presence of light with a mean travelled distance of $0.81m \pm 0.12m$. No effect of chemical exposure was found in the presence of light, but global mean differences were observed between distance travelled by larvae in the first ($p.value < 0.0001$, d.f.= 3 and $\chi^2 = 30.46$) and in the second period of darkness ($p.value < 0.0001$, d.f.= 3 and $\chi^2 = 41.78$). Post-hoc tests revealed significant differences in means obtained for the G/C and R/C conditions compared with the control during the first period of darkness (+83 and 102%, respectively, $p < 0.05$) and during the second period of darkness (+78 and 83%, respectively, $p < 0.05$).

4. Discussion

Glyphosate is a ubiquitous contaminant of surface water that, with its co-formulants included in GBHs, could be a concern for teleost fish species, particularly because contact occurs during their early development (Annett et al., 2014). Also little is known about the generational transmission of the toxicity of these contaminants. This study

investigated the effects of chronic exposure to an environmentally relevant concentration of glyphosate (administered pure or in two GBHs) on the development, metabolic markers, and behaviour of juvenile rainbow trout. To mimic chronic exposure, we added a given quantity of glyphosate once a day to the experiment tanks. At the end of the static exposure period (1 h), the dynamics of glyphosate concentrations in our experimental system showed values higher than nominal concentrations (i.e. where a maximum concentration of $1\mu\text{gL}^{-1}$ is expected). However, two hours after restarting water flow, the observed values were much closer to expected values. Water flow probably better homogenizes the glyphosate in the tank, with dilution over time corresponding to the expected concentration kinetics.

Effects of exposures to glyphosate or GBHs during the embryo-larval development depends on various biotic and abiotic factors such the species considered or doses of exposure. In *Cyprinus carpio* embryos, direct exposure to $5\mu\text{gL}^{-1}$ of glyphosate induced mortality 120 h post-fertilization (hpf) (Fiorino et al., 2018), whereas in *D. rerio* embryos, only a dose of $50\mu\text{gL}^{-1}$ causes mortality 48 hpf. In another study (Webster et al., 2014), only multigenerational contamination of 10mgL^{-1} of glyphosate and a GBH reduced embryo survival of *D. rerio*, with no effect for intergenerational exposure at the same concentration or both modes of exposures at lower concentrations (down to $10\mu\text{gL}^{-1}$). Also, direct exposure to glyphosate or GBH did not induce mortality of *D. rerio* or *O. mykiss* during embryo-larval under 1mgL^{-1} of active substance (Bridi et al., 2017; Weeks Santos et al., 2019). In the present study, none of the chemical contaminants nor the mode of exposure studied affected the hatching percentages or larval survival. The concentration used, although environmentally relevant, was probably too low to induce mortality in *O. mykiss* embryos or larvae. Also, sublethal concentrations of glyphosate could induce malformations or modification of biometric parameters of fish larvae. In *D. rerio*, doses of up to $50\mu\text{gL}^{-1}$ did not induce malformations in embryos, but there were modifications of biometric body parameters at doses higher than 100mgL^{-1} (Zhang et al., 2017). At these concentrations, decreases in body length, head and eye area have been detected. Although doses ranging from 0.1 to 10mgL^{-1} do not induce changes at the individual organism level, modifications in the expression of genes involved in embryonic development have been detected at 10mgL^{-1} (Zhang et al., 2017). Our results did not indicate that glyphosate alone or associated with co-formulants can induce malformations at a concentration of $1\mu\text{gL}^{-1}$. However, some changes in biometric indices were observed depending on the mode of exposure considered. Larvae exposed directly to glyphosate or either of the two GBHs showed a decrease in head size relative to the rest of the body as well as a reduction in eye diameter. These results corroborate those obtained (Zhang et al., 2017) on *D. rerio* with concentrations greater than 100mgL^{-1} , suggesting that *O. mykiss* is more sensitive than *D. rerio*. Furthermore, our results reflect those on rainbow trout exposed at an early stage to a GBH at concentrations of 0.1 and 1mgL^{-1} (Weeks Santos et al., 2019), with no change in total size but a decrease in head size. In our study, direct exposure to the two GBHs and thus their co-formulants did not modulate or increase glyphosate effects on rainbow trout development. Also, whereas intergenerational exposure did not induce as many changes as direct exposure, small developmental modifications were observed, e.g. increased body size and a modified eye to head ratio depending on the GBH. Therefore, exposure of the F1 generation to GBHs at the germinal cell stage or inherited non-genetic changes from contaminated parents (e.g. modified DNA methylation) may have engendered the 2 observed effects (Stenz et al., 2018). Higher AS concentrations (0.5mgL^{-1} pure AS) can induce

developmental malformations in *Oryzias latipes* upon intergenerational chronic exposure of an F0 generation, whereas 0.5 and 5mgL^{-1} of the AS co-formulated in a GBH does not induce any effect (Smith et al., 2019). This observation indicates that, depending on the experimental conditions and the species considered, glyphosate can affect development through parental exposure and that co-formulants may modulate this effect.

We investigated the intergenerational impact of glyphosate on swimming behaviour. Direct exposure to glyphosate, alone or co-formulated, has been shown to modify several behavioural traits (e.g. related to feeding, predator avoidance, locomotion) in multiple fish species and at different concentrations (da Costa Chaulet et al., 2019; Faria et al., 2020; Giaquinto et al., 2017; Topal et al., 2015; Weeks Santos et al., 2019; Zhang et al., 2017). Parental exposure to environmental stressors (i.e. intergenerational stress) including pesticide contamination, have been shown to induce behavioural changes in offspring (Colson et al., 2019; Lamb et al., 2020). In this study, glyphosate induced in particular an increase of swimming activity in larvae in the dark. This effect was observed for pure glyphosate and Roundup, but not for Viaglif, indicating that co-formulants may modulate AS toxicity. The possible explanations, e.g. the existence of one or more co-formulants in Viaglif that may have an antagonistic effect on the AS or decrease its bioavailability, could not be tested because the qualitative and quantitative formulation of the commercial product is undisclosed. Effects observed for glyphosate and Roundup are in accordance with a previous study with doses ranging from 0.01 to 1mgL^{-1} (Zhang et al., 2017). Interestingly, concentrations of up to 10mgL^{-1} were tested and induced fewer effects, indicating a non-monotonic dose-response of glyphosate and its co-formulants. However, another study reported an increase in the mean speed of *O. mykiss* larvae exposed during early development to a GBH with glyphosate at 1mgL^{-1} , with no effect at 0.1mgL^{-1} (Weeks Santos et al., 2019). In light of that study and our study, these results may indicate that direct and intergenerational exposure induces similar behavioural changes, but exposure of the parental generation has more potential to modify behaviour of the F1 generation than direct exposure.

The appearance of a toxic effect in fish exposed to glyphosate is correlated with changes in several biochemical markers (Ayanda, 2018; Ayanda et al., 2015; Gluszcak et al., 2007; Marchand et al., 2006; Persch et al., 2017; Weeks Santos et al., 2019). Our results have shown that, regardless of the mode of exposure or the contaminants, AChE activity was not affected in larvae. Numerous studies have reported inhibition induced by the pure glyphosate or GBHs at doses comprised between 1 and 30mgL^{-1} (Menéndez-Helman et al., 2011) and 0.2 and 20mgL^{-1} , respectively (Cattaneo et al., 2011; Gluszcak et al., 2006; 2007; Modesto and Martinez, 2010). However, these effects are not systematically observed in larvae. In *Hypomesus transpacificus* adults, no change was observed after exposure to doses ranging from 0.078 to 896mgL^{-1} (Jin et al., 2018). It is therefore possible that, despite different modes of exposure, the concentration used in this study was too low to induce detectable changes in AChE activity.

Although oxidative stress is frequently involved in pesticide toxicity in fish (Lushchak, 2011), only a few studies have investigated the disruption of the redox balance potentially induced by glyphosate. Certain changes in oxidative stress-related markers in fish exposed to an AS concentration as low as 0.71mgL^{-1} have been reported (Jin et al., 2018; Sobjak et al., 2017). Studies on GBHs have detected reactive oxygen species (ROS) (Sánchez et al., 2017), biochemical modifications (e.g. glutathione levels, enzyme activity) (Ayanda, 2018; Guilherme et al., 2012; Persch et al., 2017), and oxidative damage (e.g. lipid

peroxidation, protein carbonylation, DNA damage) (Ayanda, 2018; Guilherme et al., 2012; Menezes et al., 2010). Concentrations inducing effects are generally high, although alterations have been observed in fish at concentrations ranging from 26.5 to 116 µg L⁻¹ (Ayanda, 2018; Guilherme et al., 2012; Persch et al., 2017). We did not detect lipid peroxidation or any increase in catalase activity, which can indicate oxidative damage or an antioxidant response in larvae, respectively. Our results are in accordance with those of Lanzarin et al. (2019) obtained on *D. rerio* exposed to low doses of a GBH (between 2 to 8.5 µg L⁻¹ of glyphosate) during embryonic development, with no effect on ROS production, antioxidant enzymes (i.e. superoxide dismutase, CAT, and glutathione S-transferase), glutathione levels or lipid peroxidation. All these results strongly suggest that the concentration we used was too low to activate antioxidant defences or generate oxidative damage in trout larvae.

Other physiological disruptions in fish, such as changes in the energy metabolism, are also commonly observed during exposure to glyphosate or GBHs (Annett et al., 2014). In our experiment, we assayed CCO, CS, G6PDH and LDH activity, because they reflect potential changes in the aerobic metabolism (CCO, CS) (Norin and Malte, 2012), anabolism (G6PDH) (Pédron et al., 2017) and anaerobic metabolism (LDH) (Couture and Kumar, 2003). We detected only an increase in LDH activity in fish exposed multigenerationally to Roundup. The exposure of the F0 and F1 generation to this GBH may have triggered an increase in anaerobic metabolism to cope with the additional energy demand. A similar change was observed in *Clarias gariepinus* chronically and directly exposed to concentrations ranging from 26.5 to 106 µg L⁻¹ of a GBH (Ayanda et al., 2015). We also showed an increase in the CS:CCO ratio of larvae exposed multigenerationally to Roundup, reflecting the potential disruption of the mitochondrial membranes, which may be due to the inhibition of CCO or to the degradation of the lipid membranes by contaminants (Craig et al., 2007). The significant increase in the LDH:CS ratio in larvae exposed intergenerationally or multigenerationally to Roundup may indicate that parental exposure induced a need to produce more energy via anabolism rather than aerobic metabolism (Pimentel et al., 2019).

5. Conclusions

In this study, we studied the effect of parental and/or direct exposure to an environmental concentration of glyphosate, focusing on the embryo-larval development of the F1 generation. Although no effect was shown on embryo or larval survival rates regardless of the mode of exposure or the contaminants considered, some effects were observed at different levels of biological organization. Glyphosate, apparently independently of co-formulants and only in the case of direct exposure, appeared to induce developmental changes, such as reductions in head size and that of associated organs, but did not cause developmental malformations. Intergenerational exposure to glyphosate increased the swimming activity in larvae, without any correlation with AChE inhibition. This behavioural change may potentially have an important impact on larvae survival in a stressful natural environment. Viaglif co-formulants seemed to counteract this behavioural change. No oxidative stress response or damage was detected in rainbow trout larvae. Nonetheless, parental exposure to one of the two tested GBHs may modify energy production by increasing the amount of energy produced via anaerobic metabolism compared with that produced by aerobic metabolism. Also, multigenerational exposure to the same GBH may potentially cause a reduction in the capacity of mitochondria for energy production. These effects, not detected with the AS alone, were probably

not responsible for the other effects observed. Thus, there are likely other mechanisms of glyphosate toxicity at the cellular level and further investigations are needed to fully understand how they are responsible for both direct and generational toxicity of glyphosate and its co-formulants.

CRedit authorship contribution statement

Jessy Le Du-Carrée: Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Florian Saliou:** Investigation. **Jérôme Cachot:** Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Thierry Morin:** Validation, Writing - review & editing, Visualization, Project administration. **Morgane Danion:** Validation, Writing - review & editing, Visualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Department des Ctes d'Armor, the Agglomération de Saint Brieuc and the Région Bretagne.

We sincerely thank Dr. Daniel DORY for his involvement in the management of J. LE DUS Ph.D. and Carolyn ENGEL-GAUTIER (Coup de Puce Expansion; <http://www.coupdepuce.com>) for the English language review. We are also grateful for the help of all the team of the UMR CNRS 5805 EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) of the University of Bordeaux for giving us their support for the malformation and behavior analyses.

Appendix A. Timeline of the study

Contaminant/ Mode of exposure	Inter-generational	Direct	Multi-generational
Glyphosate	G/C	C/G	G/G
Roundup	R/C	C/R	R/R
Viaglif	V/C	C/V	V/V
Control condition	C/C		

Fig. 1. Experimental conditions of chemical exposure for the F1 generation. Parental exposure/offspring exposure; C/C= control/control, G/C= glyphosate/control, C/G= control/glyphosate, G/G= glyphosate/glyphosate, R/C= Roundup/control, C/R= control/glyphosate, R/R=Roundup/Roundup, V/C= Viaglif/control, C/V= control/Viaglif, V/V= Viaglif/Viaglif

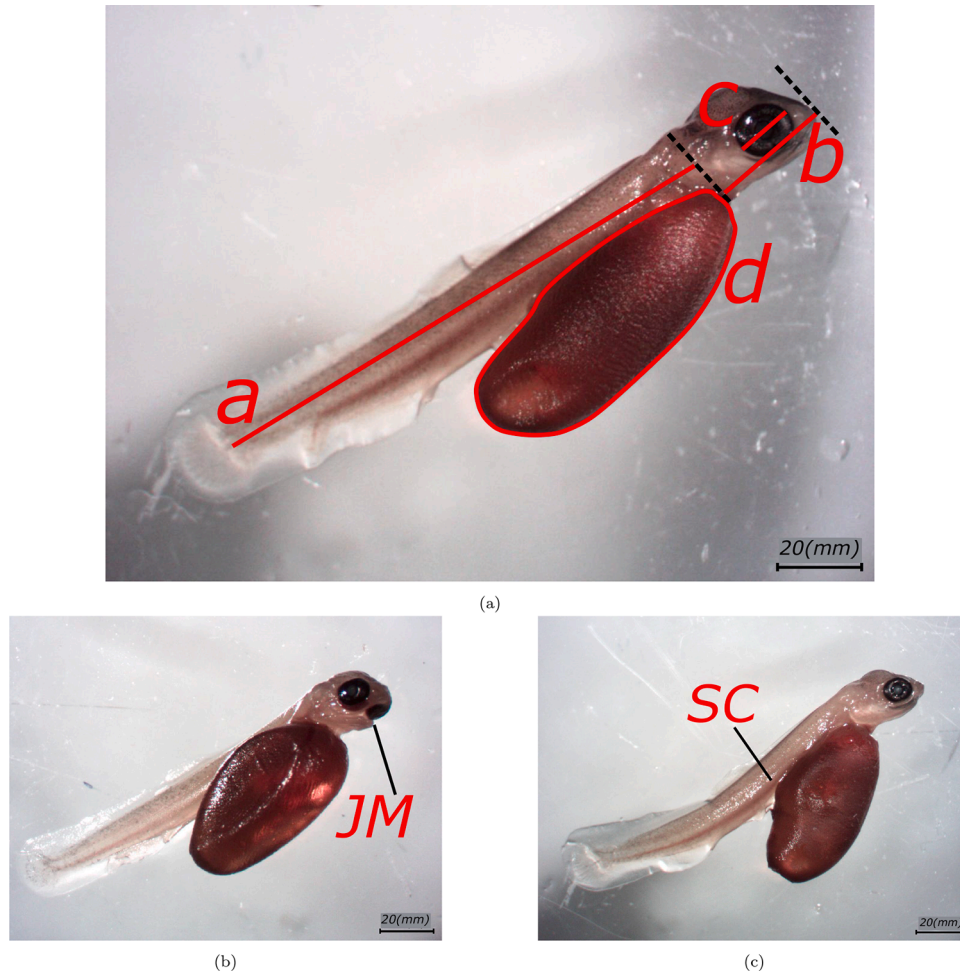


Fig. 2. Normal and malformed larvae. Control larvae (2 a) with the biometric indices measured: a. body length; b. head length; c. eye diameter; d. yolk-sac surface. Directly exposed larvae with jaw malformation (JM, from Roundup condition) (2 b) and spinal curvature (SC, from Viaglif condition) (2 c).

Appendix B. Aerobic and anaerobic enzyme activities in whole larvae

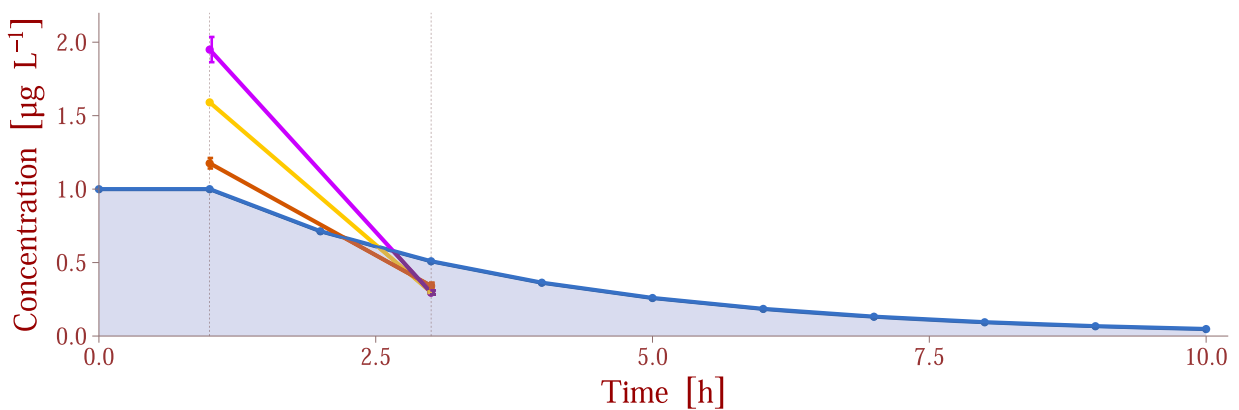


Fig. 3. Mean glyphosate concentrations as a function of time ($\mu\text{g L}^{-1}$). Observed concentrations obtained with the ELISA method were compared with expected concentrations (blue) at different exposure times. The water was sampled after approximately two months after the beginning of the experiment for each condition (glyphosate, yellow; Roundup, orange; Viaglif, purple) just before and 2 h after restarting the water flow. Error bars are standard deviations ($n = 2$).

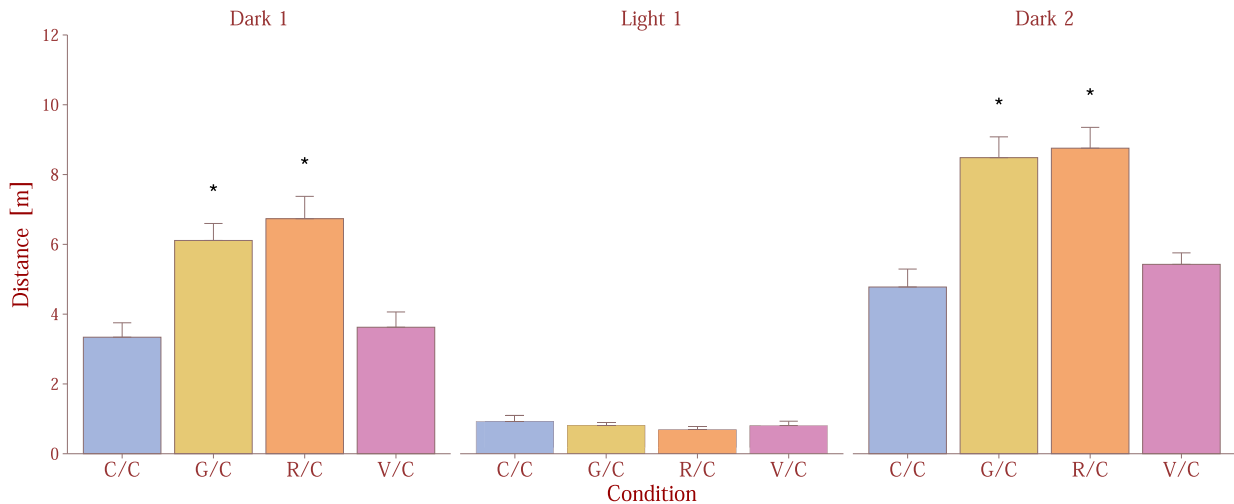


Fig. 4. Mean distance (m) travelled by intergenerationally exposed larvae according to exposure conditions during the different light and dark periods of 10min. Standard errors are shown at the top of each bar (n = 36). Significant differences to control means are indicated with an asterisk (p < 0.05), comparisons were made between groups of a given light or dark period. Parental exposure/direct exposure: C/C= control/control; G/C= glyphosate/control; C/G= control/glyphosate; G/G= glyphosate/glyphosate; R/C= Roundup/control; C/R= control/glyphosate; R/R=Roundup/Roundup; V/C= Viaglif/control; C/V= control/Viaglif; V/V= Viaglif/Viaglif

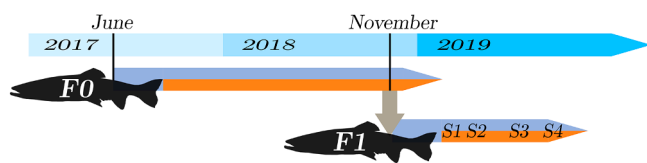


Fig. A.5. Timeline of the experiment on generations F0 2014 and F1 2018. Orange and blue lines represent phases with and without chemical exposure, respectively. Dual coloured bars indicate both intergenerational and multi-generational conditions. Biometric analyses on larvae were done at 320DD (S1) and 328DD (S2). Swimming larvae were sampled for enzymatic tests at 488DD (S3). Behavioural analyses began at 855DD (S4).

References

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, Vol. 105. Elsevier, pp. 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).

Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology* 34 (5), 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.

Anses, 2019. Synthèse des données de surveillance - Appui scientifique et technique numéro 2017-04. Technical Report. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). https://www.anses.fr/fr/system/files/Fiche_PPV_Glyphosate.pdf.

Ayanda, I.O., 2018. Toxicity of Sublethal Concentrations of Glyphosate and Paraquat Herbicide in the African Catfish *Clarias gariepinus*. *International Journal of Agriculture and Biology* 20. <https://doi.org/10.17957/ijab/15.0642>.

Ayanda, O., Oniye, S., Auta, J., Ajibola, V., Bello, O., 2015. Responses of the African catfish *Clarias gariepinus* to long-term exposure to glyphosate- and paraquat-based herbicides. *African Journal of Aquatic Science* 40 (3), 261–267. <https://doi.org/10.2989/16085914.2015.1074882>.

Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28 (1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.

Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D.J., Craig, P.M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., Mennigen, J.A., 2018. Epigenetics in teleost fish: From molecular mechanisms to physiological phenotypes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 224 (September 2017), 210–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006>.

Bobé, J., Andre, S., Fauconneau, B., 2000. Embryonic muscle development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A scanning electron microscopy and immunohistological study. *Journal of Experimental Zoology* 286 (4), 379–389. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(20000301\)286:4<379::AID-JEZ6>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(20000301)286:4<379::AID-JEZ6>3.0.CO;2-2).

Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., Bonan, C.D., 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>.

de Brito Rodrigues, L., Costa, G.G., Thá, E.L., da Silva, L.R., de Oliveira, R., Leme, D.M., Cestari, M.M., Grisolia, C.K., Valadares, M.C., de Oliveira, G.A.R., 2019. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 842 (April), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.002>.

Bruggen, A.V., He, M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K., Finckh, M., Morris, J., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>.

Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., de Menezes, C.C., Pretto, A., Baldissotto, B., Santi, A., de Avila, L.A., 2011. Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 87 (6), 597–602. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0396-7>.

Colson, V., Cousture, M., Damasceno, D., Valotaire, C., Nguyen, T., Cam, A.L., Bobé, J., 2019. Maternal temperature exposure impairs emotional and cognitive responses and triggers dysregulation of neurodevelopment genes in fish. *PeerJ* 7, e6338. <https://doi.org/10.7717/peerj.6338>.

da Costa Chaulet, F., de Alcantara Barcellos, H.H., Fior, D., Pompermaier, A., Koakoski, G., da Rosa, J.G.S., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G., 2019. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 77 (3), 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7>.

Coupe, R.H., Kalkhoff, S.J., Capel, P.D., Gregoire, C., 2011. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science* 68 (1), 16–30. <https://doi.org/10.1002/ps.2212>.

Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology* 64 (1), 107–120. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00028-6).

Craig, P.M., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2007. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (5), R1882–R1892. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00383.2007>.

Duke, S.O., 2020. Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Science* 68 (3), 201–207. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28>.

Dunn, O.J., 1964. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6 (3), 241–252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>.

Dunnnett, C.W., 1955. A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association* 50 (272), 1096–1121. <https://doi.org/10.1080/01621459.1955.10501294>.

(EFSA), E.F.S.A., 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13 (11), 4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>.

Ellman, G.L., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7 (2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

Espin, S., Sanchez Virosta, P., García-Fernández, A., Eeva, T., 2017. A microplate adaptation of the thiobarbituric acid reactive substances assay to determine lipid peroxidation fluorometrically in small sample volumes. *Revista de Toxicología* 34 (2), 94–98. <https://rev.aetox.es/wp/index.php/a-microplate-adaptation/>.

Faria, M., Wu, X., Luja-Mondragón, M., Prats, E., Gómez-Oliván, L.M., Piña, B., Raldúa, D., 2020. Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants. *Science of the Total Environment* 714, 136759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759>.

- Fiorino, E., Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Svobodova, Z., Faggio, C., 2018. Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environmental Science and Pollution Research* 25 (9), 8542–8549. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1141-5>.
- Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8 (3), 269–278. <https://doi.org/10.1007/BF01056243>.
- Gauthier, C., Campbell, P.G., Couture, P., 2008. Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151 (4), 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.010>.
- Giaquinto, P.C., de Sá, M.B., Sugihara, V.S., Gonçalves, B.B., Delício, H.C., Barki, A., 2017. Effects of Glyphosate-Based Herbicide Sub-Lethal Concentrations on Fish Feeding Behavior. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 98 (4), 460–464. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2037-2>.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 167. Springer New York, pp. 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2.
- Gluszcak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M.B., de Araújo Pedron, F., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65 (2), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>.
- Gluszcak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146 (4), 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004>.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M., Pacheco, M., 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 743 (1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>.
- Hanson, M.A., Skinner, M.K., 2016. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environmental Epigenetics* 2 (1), dww002. <https://doi.org/10.1093/eep/dww002>.
- Hutchinson, T., Shillabeer, N., Winter, M., Pickford, D., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology* 76 (1), 69–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.008>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05003255>.
- Ineris, 2020. GLYPHOSATE ET SES PRINCIPAUX COMPOSES. Technical Report. Verneuil-en-Halatte : Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris) - 181229 - v2.0, 27/03/2020. https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_273-1/FicheTox_273.pdf.
- Jin, J., Kurobe, T., Ramirez-Duarte, W.F., Bolotaolo, M.B., Lam, C.H., Pandey, P.K., Hung, T.-C., Stillway, M.E., Zweig, J., Caudill, J., Lin, L., Teh, S.J., 2018. Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*). *Aquatic Toxicology* 197 (October 2017), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.019>.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Marteninghe, A., dos Santos, E.D., Zanatta, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 29 (4), 694–697. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.003>.
- Lamb, S.D., Chia, J.H.Z., Johnson, S.L., 2020. Paternal exposure to a common herbicide alters the behavior and serotonergic system of zebrafish offspring. *PLOS ONE* 15 (4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228357>.
- Lanzarin, G.A., Félix, L.M., Santos, D., Venâncio, C.A., Monteiro, S.M., 2019. Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation - Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis. *Chemosphere* 223, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.071>.
- Le Du-Carrée, J., Morin, T., Danion, M., 2021. Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides. *Aquatic Toxicology* 230, 105687. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105687>.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101 (1), 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E., Laroche, J., 2006. Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder, *Platichthys flesus*, Submitted to Pesticide Exposure. *Marine Biotechnology* 8 (3), 275–294. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3>.
- Matozzo, V., Munari, M., Masiero, L., Finos, L., Marin, M.G., 2019. Ecotoxicological hazard of a mixture of glyphosate and aminomethylphosphonic acid to the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Scientific Reports* 9 (1), 14302. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50607-0>.
- Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G.V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2011. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 88 (1), 6–9. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8>.
- Menezes, C.C., Fonseca, M.B., Loro, V.L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A., Morsch, V.M., 2010. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60 (4), 665–671. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9574-6>.
- Modesto, K.A., Martínez, C.B., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81 (6), 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health* 15 (1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.
- Nikolakakis, S., Bossier, P., Kanlis, G., Dierckens, K., Adriaens, D., 2014. Protocol for quantitative shape analysis of deformities in early larval European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Biology* 84 (1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/jfb.12284>.
- Norin, T., Malte, H., 2012. Intraspecific Variation in Aerobic Metabolic Rate of Fish: Relations with Organ Size and Enzyme Activity in Brown Trout. *Physiological and Biochemical Zoology* 85 (6), 645–656. <https://doi.org/10.1086/665982>.
- OECD, 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. *OECD Environment Health and Safety Publications* 54.
- Pédrón, N., Du, J.L., Charrier, G., Zambonino-Infante, J.-L., Bayon, N.L., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V.F., Grand, F.L., Laroche, J., 2017. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Marine Environment Research* 129, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010>.
- Pereira, A.G., Jaramillo, M.L., Remor, A.P., Latini, A., Davico, C.E., da Silva, M.L., Müller, Y.M., Ammar, D., Nazari, E.M., 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* 2018, 353–362. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075>.
- Persch, T.S.P., Weimer, R.N., Freitas, B.S., Oliveira, G.T., 2017. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere* 174, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.092>.
- Pimentel, M.S., Faleiro, F., Machado, J., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., 2019. Seabream Larval Physiology under Ocean Warming and Acidification. *Fishes* 5 (1), 1. <https://doi.org/10.3390/fishes5010001>.
- Zhang, S., Xu, J., Kuang, X., Li, S., Li, X., Chen, D., Zhao, X., Feng, X., 2017. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 181, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.094>.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sánchez, J.A.A., Varela, A.S., Corcini, C.D., da Silva, J.C., Primel, E.G., Caldas, S., Klein, R.D., Martins, C.D.M.G., 2017. Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 177, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.147>.
- Seber, G., Wild, C., 1989. *Growth Models*, pp. 325–365.
- Smith, C.M., Vera, M.K., Bhandari, R.K., 2019. Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 210, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005>.
- Sobjak, T.M., Romão, S., do Nascimento, C.Z., dos Santos, A.F.P., Vogel, L., Guimarães, A.T.B., 2017. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere* 182, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.031>.
- Stenz, L., Schechter, D.S., Serpa, S.R., Paoloni-Giacobino, A., 2018. Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress. *Current Genomics* 19 (8), 665–675. <https://doi.org/10.2174/1389202919666171229145656>.
- Sulukan, E., Köktürk, M., Ceylan, H., Beydemir, Ş., Işık, M., Atamanalp, M., Ceyhan, S.B., 2017. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018>.
- Székács, A., Darvas, B., 2018. Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science* 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>.
- Therneau, T.M., 2015. A Package for Survival Analysis in R.
- Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kılınc, N., Erdoğan, O., Ceyhan, S.B., 2015. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 111, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.027>.
- Torretta, V., Katsoyiannis, I., Viotti, P., Rada, E., 2018. Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability* 10 (4), 950. <https://doi.org/10.3390/su10040950>.
- Webster, T.M.U., Laing, L.V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 48 (2), 1271–1279. <https://doi.org/10.1021/es404258h>.
- Webster, T.M.U., Santos, E.M., 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics* 16 (1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>.
- Weeks Santos, S., Cormier, B., Mazzella, N., Bonnaud, B., Morin, S., Clérandeau, C., Morin, B., Cachot, J., 2019. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects

- in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology 216, 105291. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291>.
- Welch, B.Y.B.L., 2012. Biometrika Trust. Biometrika 38 (3), 330–336.
- Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Zebal, Y.D., Costa, P.G., de Castro Knopp, B., Lansini, L.R., Zafalon-Silva, B., Bianchini, A., Robaldo, R.B., 2017. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. Chemosphere 185, 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.069>.

4.3 Modifications des défenses immunitaires de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* juvénile exposée intergénérationnellement au glyphosate et soumise à une infection au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse.

4.3.1 Contexte

Une fois atteint le stade juvénile, les poissons doivent commencer à explorer leur environnement afin de pouvoir réaliser leurs cycles biologiques. L'impérativité de se nourrir pour atteindre la taille de maturité sexuelle et pouvoir survivre aux prédateurs est omniprésente. Leur métabolisme augmente rapidement et leur physiologie, fortement sollicitée mais encore immature, les rend particulièrement sensibles aux différents stress environnementaux. Une sensibilité accrue aux pathogènes ainsi qu'aux contaminants est alors observée. La détermination de l'impact de la contamination chimique au glyphosate pour ces stades de vie, dans un contexte de multistress, est donc d'une importance clef.

4.3.2 Objectifs / approche

Nous nous sommes intéressés aux effets de la contamination intergénérationnelle (c.-à-d. uniquement parentale) sur la physiologie et le système immunitaire de truites arc-en-ciel juvéniles. Cette étude, qui a repris une partie des marqueurs physiologiques mesurés chez les larves, donnait la possibilité de comparer les effets observés au stade larvaire avec ceux observés au stade juvénile. Elle a intégré une épreuve d'infection expérimentale au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (*vNHI*) permettant une analyse intégrative des effets des contaminants sur certains paramètres physiologiques (p. ex. métabolisme énergétique), mais plus particulièrement sur le système immunitaire. Des prélèvements réalisés quelques jours avant la période d'infection ont permis d'évaluer certaines modifications physiologiques qui pourraient expliquer une potentielle différence de réponse face au virus. Des prélèvements à 96 heures post-infection (hpi) ont permis d'analyser certains paramètres de la réponse immunitaire antivirale et de déterminer l'existence ou non de différences en fonction des modalités de contamination chimique des parents.

4.3.3 Principaux résultats

Les points clefs

- Des truites contaminées intergénérationnellement au glyphosate ont été infectées avec le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse.
- La contamination n'a pas induit de changement physiologique profond chez les truites juvéniles.
- Après l'infection virale, une réduction de l'interleukin-1 β a été observée dans la rate des poissons issus de parents exposés à la substance active pure.

- Les co-formulations de glyphosate ont modulé à la hausse ou à la baisse, dépendamment du produit considéré, la susceptibilité des truites au virus.
- Aucun des paramètres hémato-immunologiques étudiés n'a permis d'expliquer ces différences de sensibilité.
- voir la figure 4.2 pour un résumé graphique.

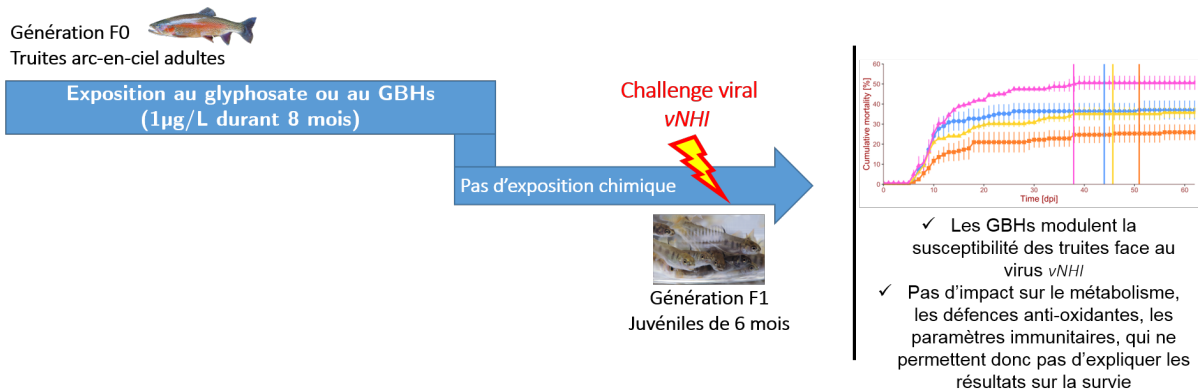


FIGURE 4.2 – Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de la génération de truites F1 juvéniles soumises à une exposition chimique chronique au glyphosate ainsi qu'à une infection virale.

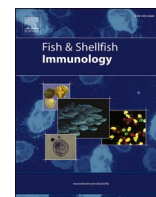
4.3.4 Article

Voir l'article publié dans le journal *Fish and Shellfish Immunology* pages 157-160 (4 pages).



Contents lists available at ScienceDirect

Fish and Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Changes in defense capacity to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout intergenerationally exposed to glyphosate

Jessy Le Du-Carrée^{a,b,*}, Joëlle Cabon^a, Lénaïg Louboutin^a, Thierry Morin^a, Morgane Danion^a

^a French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Fish Virology, Immunology and Ecotoxicology Unit, 29280, Plouzané, France

^b UBO University of Western Brittany, Brest, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Glyphosate-based herbicide
Intergenerational toxicity
Viral challenge
Cumulative mortality
Immunotoxicity

ABSTRACT

Glyphosate, the most widely used herbicide active substance worldwide, has raised many scientific, political and public debates in the context of its recent re-registration in the European Union, highlighting in particular a lack of data concerning its potential generational effects. In this study, we investigated the intergenerational toxicity of this active substance used alone or coformulated in glyphosate-based herbicides (GBHs) on the ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to face a viral challenge. Juvenile trout from parents exposed for eight months to four different chemical exposure conditions (non-exposed control, pure glyphosate, Roundup Innovert®, and Viaglif Jardin®) were experimentally infected with the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Various enzymatic and hemato-immunological markers were assessed before and after the viral challenge. Chemical contamination with GBHs strongly modulated viral trout susceptibility. Pure glyphosate induced a cumulative mortality of 35.8%, comparable to the control (37.0%), which was significantly reduced with Roundup Innovert® (−9.9%) and increased (+14.8%) with Viaglif Jardin®. No modification was observed for the biomarkers analysed for any conditions. These results demonstrate that the nature of the co-formulants associated to glyphosate in GBHs can modulate the susceptibility of fish to pathogens.

1. Introduction

Glyphosate is an herbicidal active substance (AS) widely used in agriculture for its effectiveness in controlling weed development. This chemical compound, associated with co-formulants in the form of “glyphosate-based herbicides” (GBHs), has raised health and environmental concerns because of its ubiquity in the environment, including in surface water. Moreover, divergent risk assessment strategies among health and environment agencies have complicated its re-registration in the European Union [27]. Different toxic effects of both the AS and GBHs have been identified in fish, such as oxidative stress and metabolic impairments [2]. However, although some immunotoxic effects have been detected [7,9,10,19,20,24], the immunomodulating properties of glyphosate are still poorly understood. Only a few studies have reported the use of integrative tools such as challenges with pathogens, despite their proven relevance [21]. Higher susceptibility to the bacterium *Aeromonas hydrophila* has been induced by acute exposure of silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles to 730 µg L^{−1} of a GBH [11]. Studies

have indicated that parental exposure to glyphosate, whether co-formulated or not, could induce developmental impairments, possibly associated with epigenetic changes [26], and could increase offspring susceptibility to recontamination by the parental compound [29]. However, the impact of this mode of exposure on glyphosate immunotoxicity has not yet been studied. Nevertheless, impairments of the immune system related to intergenerational exposure to other chemical contaminants have already been identified [6,14,31].

In the present study, we investigated changes in the overall defense capacity of rainbow trout following chronic exposure to an environmental low dose of glyphosate as the active substance or in the form of two different GBHs. Different resistant profiles were observed using an original approach consisting in submitting F1 generation fish derived from F0 genitors previously exposed to the chemical compounds to a viral challenge with the hematopoietic necrosis virus (IHNV). In addition to survival, various biochemical parameters were assessed before and after the infection to identify metabolic modulation, generation of oxidative stress, and alterations in immune defenses.

* Corresponding author. French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Fish Virology, Immunology and Ecotoxicology Unit, 29280, Plouzané, France.

E-mail address: jessy.ledu@gmail.com (J. Le Du-Carrée).

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.021>

Received 29 March 2021; Received in revised form 22 October 2021; Accepted 15 December 2021

Available online 25 January 2022

1050-4648/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

2. Materials and methods

Fish experiments were conducted using specific pathogen-free (SPF) rainbow trout reared in the protected and monitored fish facilities of the ANSES Plouzané Laboratory site (France). Fish experimentation was carried out in strict accordance with European guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare (European Union Directive 2010/63). Experimental procedures were validated by the animal ethics committee ANSES/ENVA/UPC No. 16 and authorized by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS#2019010812403065). Fish were maintained in tanks containing river water filtered with sand filter (approximately 20 µm), with a water flow rate to ensure complete renewal once an hour and maintain appropriate physico-chemical conditions and oxygen saturation greater than 60%. Our experimental facilities are supplied with river water with a mean pH of 7.8, a conductivity of 400 µS m⁻¹ and a hardness of 12°TH. Concentrations of ammonia, nitrate and nitrite are close to 0. Physico-chemical analyses of the water were regularly carried out to guarantee excellent maintenance conditions for all the fish. A photoperiod of 12 h of daylight was maintained throughout the experiments. Different batches of an F1-2018 generation of SPF rainbow trout were produced from a non-contaminated (C; control) generation and three chemically contaminated F0-2014 generations exposed for 8 months to 1 µg L⁻¹ of glyphosate (see Fig. 1 for graphical explanation and the previous article of Le Du-Carrée et al. [12] for more details on the chemical exposure procedure) administered as the pure active substance (G; Sigma-Aldrich, ref. 45521, CAS Number 1071-83-6) or two GBHs, Roundup Innovert® (R; Agrilisa - for professional use) and Viaglif Jardin® (V; Agrilisa - for home gardens). Once the genitors have reached sexual maturity, reproduction was done as already described (see Le Du-Carrée et al. [12]) and embryonic development until the eyed stage (see Bobe et al. [4]) was conducted in 300 L tanks continuously renewed with river water (filtered with sand and cotton wool filters) with a flow rate of approximately 300 L h⁻¹. After the eyed stage period, embryos were placed in 40 L tanks positioned in a confined room. Temperature during embryonic development was maintained at 8 °C ± 2°C. After this stage, water temperature varied from 6 to 15 °C. A trout-specific feed (Le Gouessant®), adapted to the fish size, was given ad libitum. After approximately 9 months of development without chemical exposure to assess only the intergenerational effect, 180 juveniles (weight and size, mean ± standard error, of 74.0 g ± 4.08 g and 14.2 cm ± 0.30 cm, respectively) of each chemical exposure condition divided in three 50 L tanks were challenged by contact with an infectious dose of 10⁴ TCID₅₀ mL⁻¹ *IHNv* for 3 h in a reduced volume of hyperoxygenated river water at 11 °C ± 2°C. Uninfected control tanks (60 fish of each chemical exposure condition) were similarly challenged with non-infected *epithelioma papulosum cyprini* cell supernatant [15]. General behavior of the fish, specific clinical signs of rhabdoviruses infection, and mortality were recorded twice a day for 9 weeks. At the mortality peak, viral presence was checked. Detection of viral genome was assessed in a pool of organs (brain, spleen, kidneys and heart) from dead fish in each test condition using specific RTqPCR [3]. Sampling was performed before

the viral infection (S1), 4 days post-infection (dpi; S2) and 63 dpi (S3). Euthanasia was done with addition of a lethal dose of 100 ppm of Eugenol into the tank water. The animals were put in contact with the product until complete disappearance of all respiratory activity. Blood was drawn from the caudal vein into lithium heparinized vacutainer tubes to calculate white blood cell (WBC) and red blood cells (RBC) counts at S1 and S2 [8], and to semi-quantify anti-*IHNv* antibodies in survivors at S3 (see Louboutin et al. [15] and Ananda Raja et al. [1] for method reference). The liver and brain were sampled at S1 to analyze oxidative stress (superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx), neuromediator-related enzyme (acetylcholine esterase, AChE) and energy metabolism markers (citrate synthase, CS; cytochrome-c oxidase, CCO; lactate dehydrogenase, LDH; glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH); see Le Du-Carrée et al. [12] for detailed information on the assays. Spleens sampled at S2 were used to quantify the concentration of immune markers (fish interleukin 1β (IL - 1β) and fish tumor necrosis factor α (TNF - α) assayed with Biorbyt® ELISA kits).

3. Results

After nine months of development and before the viral challenge, enzymes representing energetic metabolism (i.e. CS, CCO, LDH, and G6PDH), as well as AChE, and SOD activities were not altered by the parental chemical exposure in the juvenile offspring compared to the control (data not shown). GPx activity was the only parameter affected. Mean values were comprised between 0.23 ± 0.0063 and 0.25 ± 0.010 IUmg⁻¹ for the control and conditions exposed to the two GBHs, while a mean value of 0.20 ± 0.0083IUmg⁻¹ was detected for the glyphosate condition (*p*.value = 0.04, d.f. = 3 and *f* = 3.08). A significant decrease in GPx activity in F1 fish exposed to glyphosate compared to the control was detected by a post-hoc test (-13%; *p* < 0.05).

The mortality kinetics induced by *IHNv* infection (see Fig. 2) were different depending on the conditions, and the cumulative mortality rates were shown to be significantly affected by chemical contamination (*p*.value = 0.000 3, d.f. = 4 and $\chi^2 = 21.40$). Cumulative mortality reached 37%, 36%, 26% and 51% for the control, glyphosate, Roundup and Viaglif conditions, respectively. Target organs of infected fish that died during the peak of mortality were detected positive for *IHNv* by qPCR. Faster and higher mortality appeared to be observed in fish exposed to Viaglif, represented by shorter restricted mean survival times (RMST, an integrated parameter representing both the dynamics and the intensity of mortality [28]; mean ± se, *n* = 3) of 51 ± 2.3 dpi, compared to 44 ± 2.4, 46 ± 1.1 and 51 ± 2.3dpi respectively, for the control and glyphosate conditions while fish exposed to Viaglif tended to present a lower RMST of 38 ± 1.2. Logrank test revealed that the mortality rates for the Viaglif and Roundup conditions respectively, were significantly higher (+39% difference; *p*.value = 0.017) and lower (-29% difference; *p*.value = 0.031) compared to mortality rates of the control and glyphosate conditions. Proportions of *IHNv*-seropositive fish were between 73% and 100% among chemical treatments, with an overall mean of 1235. Approximately 60% highly seropositive fish (antibody titer greater than 640) were found, regardless of the chemical condition.

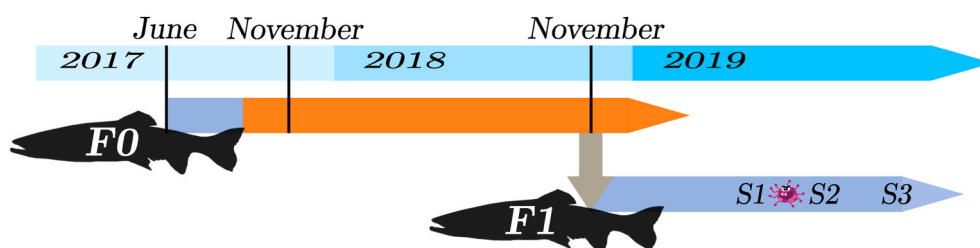


Fig. 1. Timeline of the study on generations F0 2014 and F1 2018. Dark blue and orange lines represent phases without and with chemical exposure, respectively. The exposure of F0 2014 lasted 8 months to a dose of 1 µg L⁻¹ of glyphosate. The viral challenge with *IHNv* is represented by a virus symbol. Sampling was performed one day before the viral infection (S1), four days post-infection (S2), and 63 days later (S3).

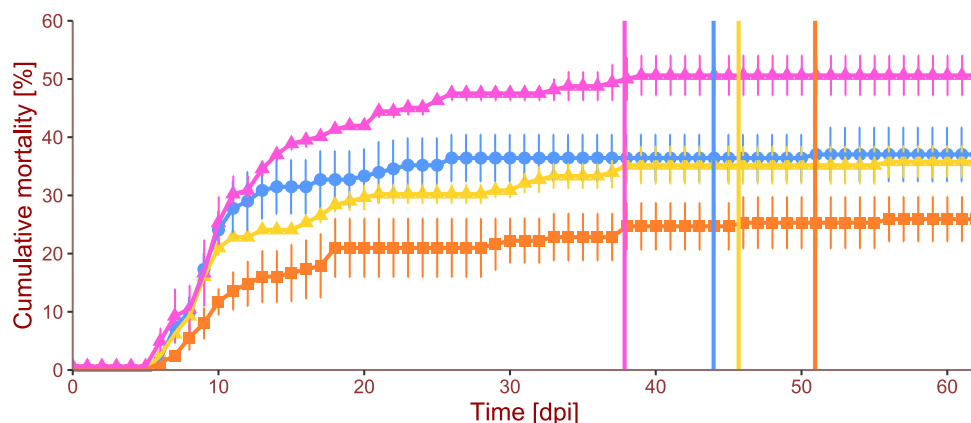


Fig. 2. Kinetics of cumulative mortality in F1 fish intergenerationally exposed to chemical contamination and infected at nine months of development with *IHNv*. Data are expressed as a function of time in days post-infection (dpi) for the G (in yellow), R (in orange), V (in purple) and control (in blue) groups. Error bars represent standard errors, vertical bars the restricted mean survival time.

WBC and RBC counts performed before or after the viral infection were not significantly different (data not shown). Differences in $IL-1\beta$ concentrations were observed (Table 1; p -value = 0.002, d.f. = 3 and f = 11.52), with a reduction of 62% in fish intergenerationally exposed to glyphosate compared to the controls ($p < 0.05$), while $TNF-\alpha$ concentrations were similar among all the conditions.

4. Discussion

Our experimental design was conceived to investigate the potential effects of glyphosate and GBHs on the defense capacity of an offspring born from adult rainbow trout exposed chronically to low, environmentally relevant doses of glyphosate as the active substance or in the form of two different GBHs. Results showed that neither the oxidative defense system nor energetic metabolism were affected by the chemical exposure of the F0 generation. This indicates that glyphosate may not have generated oxidative stress and therefore additional energy requirements, explaining the absence of observed metabolic readaptation. GPx activity, involved in the first line of defense against reactive oxygen species (ROS) [16], was the only activity found to be reduced in the context of intergenerational exposure to pure glyphosate. A similar observation, i.e. a decrease of antioxidant enzyme activities including GPx, was reported in the offspring of an F0 zebrafish (*Danio rerio*) generation exposed chronically to an algal toxin [14]. A higher concentration of glyphosate (i.e. ranging from 2.25 mg L⁻¹ to 15 mg L⁻¹) also induced a reduction in antioxidant enzymes activities in *Pseudoplattystoma* sp directly exposed for 96 h to a GBH, and this was probably due to increased ROS levels [25]. While biochemical parameters measured in juveniles exposed intergenerationally to the chemicals did not indicate any physiological effects, the *IHNv* challenge revealed that only GBHs affected the ability of rainbow trout to survive the infection. This approach has proven to be particularly relevant to measure the effect of

parental exposure to chemicals on the overall defense capacities of the F1 generation. It showed that parental exposure to Viaglif generated higher mortality in the F1 juveniles while, interestingly, Roundup exposure increased the survival of the intergenerationally exposed fish. Kreutz et al. [11] have shown that a GBH could induce a higher susceptibility of silver catfish juveniles to the bacterium *Aeromonas hydrophila* and other authors have reported similar observations [5,6]. However, to our knowledge, our results are the first to demonstrate a decreased in fish susceptibility to a pathogen after exposure to glyphosate through a GBH. Nevertheless, in a review on fish immuno-ecotoxicology, Rehberger et al. [21] revealed that 17% of the experiments considering pathogen challenges detected lower mortality rates in fish exposed to different contaminants compared to the non-exposed controls. Parental exposure to Roundup might have stimulated the immune defenses of the fish, resulting in a greater ability to face the viral infection. The immune-modulating properties of glyphosate formulations we observed do not seem to be related to hematological changes because white and red blood cell counts revealed no effects of the intergenerational exposure. Quantification of two cytokines involved in antiviral immune response [22], $TNF-\alpha$ and $IL1-\beta$, in the spleen, showed that parental exposure to pure glyphosate reduced levels of $IL1-\beta$ but not $TNF-\alpha$. Direct GBH exposures have been reported to modify gene expression [13,17,23,30] and cytokine concentrations [18]. Liu et al. [14] also demonstrated that intergenerational exposure of zebrafish to an algal toxin reduced both $IL1-\beta$ and $TNF-\alpha$ gene expression. In this study, the variation of $IL1-\beta$ expression observed in juveniles from parents exposed to glyphosate did not affect their susceptibility to the virus.

5. Conclusions

This study provides evidence that parental exposure of rainbow trout to GBHs could modulate the defense capacity of juvenile trout to a viral challenge, while parental exposure to the pure active substance had no effect. Depending on the GBH formulations considered, survival following virus exposure was either increased or decreased. Based on the parameters measured, neither the disruptions in metabolic activity and the antioxidant defenses, nor impairment of the immune system can explain the observed differences in survival. Parental exposure to pure glyphosate induced only minor physiological changes by reducing the activity of an antioxidant enzyme and the concentration of a key cytokine of the immune system. Additional in-depth studies evaluating the generational impact of a low dose of both pure and co-formulated glyphosate are required to determine the mechanisms involved in the modulation of fish susceptibility to pathogens.

Table 1

Mean $IL-1\beta$ and $TNF-\alpha$ concentrations in spleen as a function of exposure conditions four days after the viral infection (S2). Concentrations are expressed in ngmg⁻¹ of protein for each contaminated conditions (G, R, V) and the control group (C) with standard errors for $IL-1\beta$ ($5 \leq n \leq 8$) and $TNF-\alpha$ ($8 \leq n \leq 10$). A significant difference from the control mean is indicated with a bold number and an “*” ($p < 0.05$).

Condition	C	G	R	V
$IL-1\beta$ (mean ± se)	1.70 ± 0.20	0.65 ± 0.11*	1.98 ± 0.57	2.63 ± 0.43
$TNF-\alpha$ (mean ± se)	10.85 ± 1.47	9.46 ± 1.17	9.24 ± 1.40	11.55 ± 1.36

CRedit authorship contribution statement

Jessy Le Du-Carrée: Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Joëlle Cabon:** Investigation, Validation. **Lénaïg Louboutin:** Investigation, Validation. **Thierry Morin:** Validation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision. **Morgane Danion:** Validation, Writing – review & editing, Visualization, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Département des Côtes d'Armor, the Agglomération de Saint Brieuc and the Région Bretagne.

We sincerely thank Dr. Daniel Dory for his involvement in the management of J. Le Du's Ph.D. and Craig Stevens, MA, DESS, ELS (Coup de Puce Expansion; <http://www.coupdepuce.com>) for the English language review.

References

- [1] R. Ananda Raja, P.K. Patil, S. Avunje, R.P. Aravind, S.V. Alavandi, K.K. Vijayan, Biosafety, withdrawal and efficacy of anti-parasitic drug emamectin benzoate in asian seabass (*Lates calcarifer*), *Aquaculture* 525 (2020) 735335.
- [2] R. Annett, H.R. Habibi, A. Hontela, Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment, *J. Appl. Toxicol.* 34 (5) (Feb. 2014) 458–479.
- [3] Anses, Détection du virus de la Nécrose Hématopoiétique Infectieuse (vNHI) par RT-PCR en temps réel. ANSES/PLOU/MA/3-Version 6. Tech. rep., Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), Jul. 2020.
- [4] J. Bohe, S. Andre, B. Fauconneau, Embryonic muscle development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a scanning electron microscopy and immunohistological study, *J. Exp. Zool.* 286 (4) (2000) 379–389.
- [5] M. Danion, S.L. Floch, J. Cabon, L. Louboutin, T. Morin, Transchem project — Part II: transgenerational effects of long-term exposure to pendimethalin at environmental concentrations on the early development and viral pathogen susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.* 202 (Sep. 2018) 126–135.
- [6] X. Dong, Z. Zhang, S. Meng, C. Pan, M. Yang, X. Wu, L. Yang, H. Xu, Parental exposure to bisphenol A and its analogs influences zebrafish offspring immunity, *Sci. Total Environ.* 610–611 (Jan. 2018) 291–297.
- [7] F.J. Félix, N. Saradhamani, Impact of the herbicide glyphosate Roundup (41 %) on the haematology of the freshwater fish, Catla Catla (Hamilton), *IOSR.J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. (IOSR-JESTFT)* 9 (4) (Apr. 2015) 56–60.
- [8] H. Kekic, A. Ivanc, A new direct method for counting fish blood cells, *Ichthyologia* 14 (1982) 55–58.
- [9] E. Kondera, B. Teodorczuk, K. Lugoowska, M. Witeska, Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp *Cyprinus carpio*, *Fish Physiol. Biochem.* 44 (3) (Mar. 2018) 1011–1018.
- [10] L.C. Kreutz, L.J.G. Barcellos, S. de Faria Valle, T. de Oliveira Silva, D. Anziliero, E. D. dos Santos, M. Pivato, R. Zanatta, Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate, *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1) (Jan. 2011) 51–57.
- [11] L.C. Kreutz, L.J.G. Barcellos, A. Marteninghe, E.D. dos Santos, R. Zanatta, Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge, *Fish Shellfish Immunol.* 29 (4) (Oct. 2010) 694–697.
- [12] J. Le Du-Carrée, T. Morin, M. Danion, Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides, *Aquat. Toxicol.* 230 (Jan 2021) 105687.
- [13] Y. Li, W. Ding, X. Li, Acute exposure of glyphosate-based herbicide induced damages on common carp organs via heat shock proteins-related immune response and oxidative stress, *Toxin Rev.* (Jun. 2019) 1–13, 0(0).
- [14] W. Liu, Q. Qiao, Y. Chen, K. Wu, X. Zhang, Microcystin-LR exposure to adult zebrafish (*Danio rerio*) leads to growth inhibition and immune dysfunction in F1 offspring, a parental transmission effect of toxicity, *Aquat. Toxicol.* 155 (Oct. 2014) 360–367.
- [15] L. Louboutin, J. Cabon, E. Vigouroux, T. Morin, M. Danion, Comparative analysis of the course of infection and the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the 5 genotypes of infectious hematopoietic necrosis virus, *Virology* 552 (Jan. 2021) 20–31.
- [16] V.I. Lushchak, Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach, *Fish Physiol. Biochem.* 42 (2) (Nov. 2015) 711–747.
- [17] J. Ma, Y. Bu, X. Li, Immunological and histopathological responses of the kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sublethally exposed to glyphosate, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39 (1) (Jan. 2015) 1–8.
- [18] J. Ma, X. Li, Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate, *Chemosphere* 128 (Jun. 2015) 293–298.
- [19] J. Marchand, A. Tanguy, G. Charrier, L. Quiniou, E. Plee-Gauthier, J. Laroche, Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure, *Mar. Biotechnol.* 8 (3) (Mar. 2006) 275–294.
- [20] K.A. Modesto, C.B. Martinez, Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity, *Chemosphere* 81 (6) (Oct. 2010) 781–787.
- [21] K. Rehberger, I. Werner, B. Hitzfeld, H. Segner, L. Baumann, 20 Years of fish immunotoxicology - what we know and where we are, *Crit. Rev. Toxicol.* 47 (6) (Apr. 2017) 516–542.
- [22] S. Reyes-Cerpa, K. Maisey, F. Reyes-Lpez, D. Toro-Ascuy, A. Mara, M. Imarai, Fish cytokines and immune response, in: K. Maisey (Ed.), *New Advances and Contributions to Fish Biology*, vol. 1, InTech, Rijeka, Nov. 2012.
- [23] S. Richard, N. Prévot-D'Alvise, R. Bunet, R. Simide, S. Couvray, S. Coupé, J. P. Grillasca, Effect of a Glyphosate-Based Herbicide on Gene Expressions of the Cytokines Interleukin-1 β and Interleukin-10 and of Heme Oxygenase-1 in European Sea Bass, *dicentrarchus Labrax* L, vol. 92, Bulletin of Environment Contamination and Toxicology, Jan. 2014, pp. 294–299, 3.
- [24] J. Salbego, A. Pretto, C.R. Gioda, C.C. de Menezes, R. Lazzari, J.R. Neto, B. Baldisserotto, V.L. Loro, Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58 (3) (Jan. 2010) 740–745.
- [25] V.D.G. Sinhorin, A.P. Sinhorin, J.M. dos Santos Teixeira, K.M.L. Miléski, P. C. Hansen, P.S.A. Moreira, N.H. Kawashita, A.M. Baviera, V.L. Loro, Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106 (Aug. 2014) 181–187.
- [26] C.M. Smith, M.K. Vera, R.K. Bhandari, Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Aquat. Toxicol.* 210 (May 2019) 215–226.
- [27] A. Székács, B. Darvas, Re-registration challenges of glyphosate in the European union, *Front. Environ. Sci.* 6 (Jul. 2018) 78.
- [28] T.M. Therneau, A Package for Survival Analysis in R, 2015.
- [29] T.M.U. Webster, L.V. Laing, H. Florance, E.M. Santos, Effects of glyphosate and its formulation, Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*), *Environ. Sci. Technol.* 48 (2) (Jan. 2014) 1271–1279.
- [30] T.M.U. Webster, E.M. Santos, Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup, *BMC Genom.* 16 (1) (Jan. 2015) 32.
- [31] X. Yin, Y. Liu, R. Zeb, F. Chen, H. Chen, K.-J. Wang, The intergenerational toxic effects on offspring of medaka fish *Oryzias melastigma* from parental benzo[a]pyrene exposure via interference of the circadian rhythm, *Environ. Pollut.* 267 (Dec. 2020) 115437.

Chapitre 5

Impact inter et transgénérationnel d'une faible dose de glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé d'une génération F2 de truites arc-en-ciel

*« Être conscient de son ignorance,
c'est tendre vers la connaissance. »*

Benjamin Disraeli

Sommaire

5.1 Introduction	162
5.2 Impact inter, trans et multigénérationnel d'une faible dose de glyphosate sur le développement précoce et les défenses immunitaires de truites arc-en-ciel juvéniles .	162
5.2.1 Contexte	162
5.2.2 Principaux résultats	163
5.2.3 Article	163

5.1 Introduction

La génération F2_2019 dont il est objet dans ce chapitre est issue de la reproduction en novembre 2019 des individus de la génération F1_2017 soumis à 24 mois de contamination chimique avec la substance active et les deux GBHs utilisés dans les études précédentes. La principale particularité de cette génération F2_2019 réside dans le fait qu'elle est constituée de certains lots issus d'une génération F0 exposée à ces contaminants, la génération F0_2014 décrite au chapitre 3. En d'autres termes, une composante transgénérationnelle de la contamination chimique est ajoutée à la composante intergénérationnelle déjà existante dans les études évoquées au chapitre précédent. L'avantage majeur dans l'étude de contaminations transgénérationnelles est la possibilité d'évaluer les effets génétiques et épigénétiques induits par les contaminants. En effet, lors des contaminations intergénérationnelles, la génération F1 peut être exposée aux contaminants directement au stade de cellule germinale ou lors de son développement, par l'intermédiaire du transfert de composés dans les gamètes. Théoriquement, lors de son développement, la génération F1 va se décontaminer totalement des composés transmis par la génération F0 avant d'entamer la maturation de ses gamètes. Ce phénomène de dépuración est d'autant plus probable dans le cas du glyphosate du fait qu'il est très peu bioaccumulable. Les effets qui sont potentiellement transmis à la génération F2 par la génération F1 exposée intergénérationnellement sont donc des effets qui ont perduré chez la F1 au cours de son développement soit directement au niveau de ses gènes (c.-à-d. génétique), soit au niveau de l'environnement de ces gènes, en en modifiant la lecture (c.-à-d. épigénétique).

5.2 Impact inter, trans et multigénérationnel d'une faible dose de glyphosate sur le développement précoce et les défenses immunitaires de truites arc-en-ciel juvéniles

5.2.1 Contexte

Ce chapitre se concentre sur l'étude des différentes modalités d'exposition chimique sur le développement précoce des truites de la génération F2. Les analyses effectuées sur la génération F1 ont été reconduites sur la génération F2 afin de comparer les effets résultant d'une contamination intergénérationnelle à ceux d'une exposition transgénérationnelle, mais aussi d'intégrer l'effet de la contamination des deux générations antérieures lors d'une exposition de type mixte. Aussi, des truites F2 ayant subi une contamination intergénérationnelle (plus longue que pour la génération F1) ont également été incluses dans cette étude afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus dans le travail sur la génération F1_2018. Les truites juvéniles de la génération F2_2019 ont également été infectées avec le virus de la NHI afin de tester l'impact des contaminants sur la capacité de défense des poissons face à un agent infectieux. Comme dans la deuxième section du chapitre 4, des prélèvements ont été réalisés en amont et en aval de l'épreuve virale afin de déterminer les effets des contaminants sur le statut physiologique avant l'infection, mais également sur la capacité des animaux à mettre en place une réponse antivirale appropriée.

5.2.2 Principaux résultats

Les points clefs

- La toxicité trans, inter et multigénérationnelle associée au glyphosate, sous la forme de substance active pure ou de solutions commerciales, a été étudiée sur la truite arc-en-ciel.
- Le glyphosate pur ou co-formulé a altéré le développement de la génération F2, induisant des malformations et des perturbations biométriques, métaboliques et comportementales.
- Les expositions inter, mais pas transgénérationnelles, ont induit une augmentation de la susceptibilité des truites juvéniles au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse.
- La réponse de immunitaire acquise, altérée par l'exposition intergénérationnelle, pourrait être associée à ce résultat.
- Des mécanismes non génétiques de transmission, mais également une exposition directe au stade germinal sont probablement impliqués dans la toxicité générationnelle.
- voir la figure 5.1 à la page 164 pour un résumé graphique.

5.2.3 Article

Voir l'article publié dans le journal *Science of the Total Environment* pages 165-178 (14 pages).

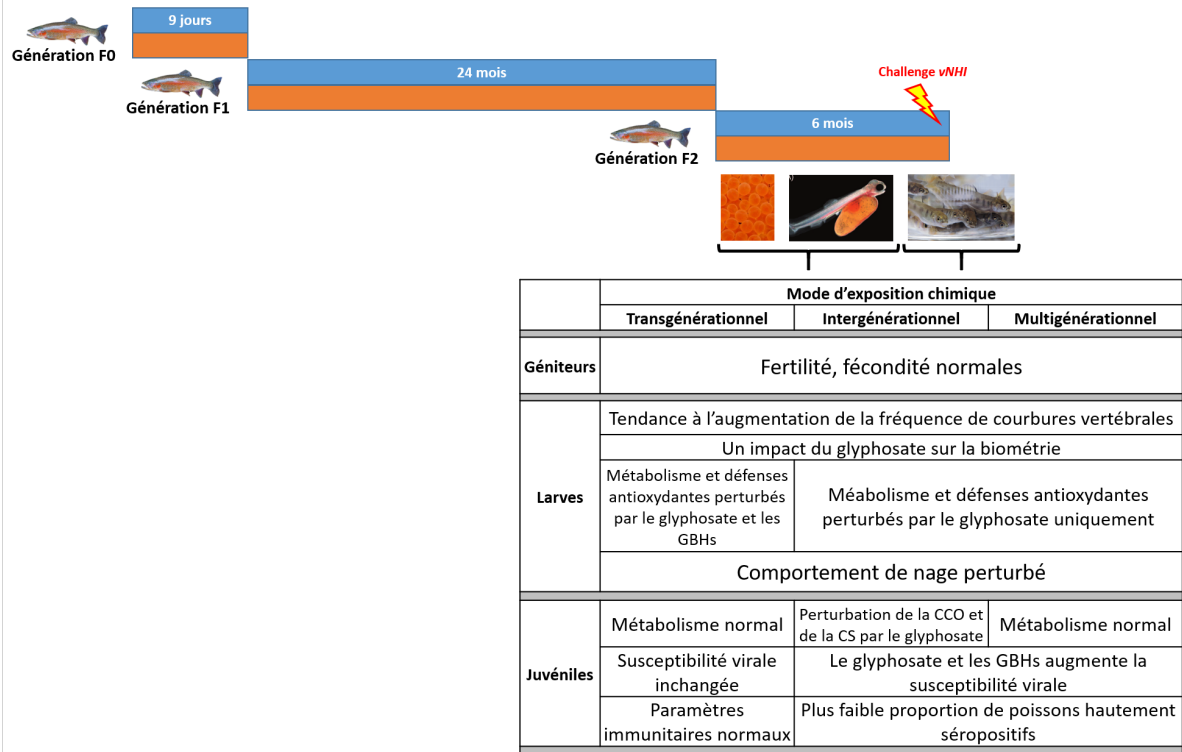


FIGURE 5.1 – Résumé graphique présentant les principaux résultats obtenus dans l'étude de l'impact du glyphosate sur le développement précoce de la génération de truites F2.



Generational effects of a chronic exposure to a low environmentally relevant concentration of glyphosate on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Jessy Le Du-Carrée^{a,b,*}, Rania Boukhari^a, Jérôme Cachot^c, Joëlle Cabon^a, Lénaïg Louboutin^a, Thierry Morin^a, Morgane Danion^a

^a French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Fish Virology, Immunology and Ecotoxicology Unit, 29280 Plouzané, France

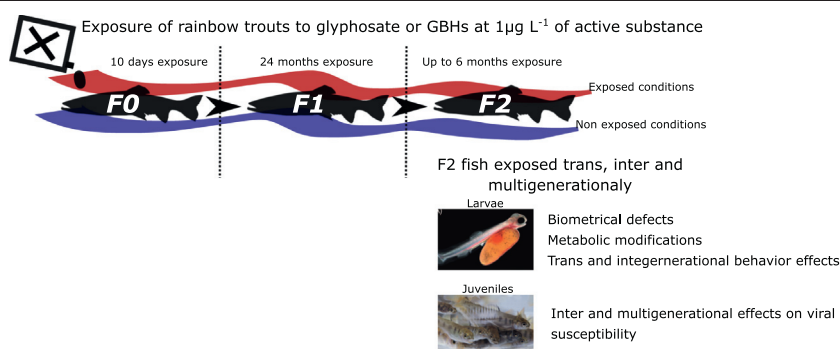
^b UBO University of Western Brittany, Brest, France

^c University of Bordeaux, UMR CNRS 5805 EPOC, Allée Geoffroy Saint Hilaire, 33 600 Pessac, France

HIGHLIGHTS

- Trans, inter and multigenerational toxicity of glyphosate was studied.
- Pure and co-formulated glyphosate induced developmental toxicity on the F2 generation.
- Inter but not transgenerational toxicity increased viral susceptibility of juveniles.
- Both non-genetic inheritance and exposure at the germinal stage could be involved.
- Re-exposure to parental contaminants did not seem to modulate toxicity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2021

Received in revised form 23 July 2021

Accepted 31 July 2021

Available online 4 August 2021

Editor: Henner Hollert

Keywords:

Glyphosate-based herbicide
Embryo-larval development
Swimming behavior
Viral challenge
Oxidative stress
Generational toxicity

ABSTRACT

In the past few decades, glyphosate became the most used herbicide substance worldwide. As a result, the substance is ubiquitous in surface waters. Concerns have been raised about its ecotoxicological impact, but little is known about its generational toxicity. In this study, we investigate the impact of an environmentally relevant concentration of glyphosate and its co-formulants on an F2 generation issued from exposed generations F0 and F1. Trans, inter and multigenerational toxicity of $1\mu\text{g L}^{-1}$ of the active substance was evaluated on early stages of development and juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using different molecular, biochemical, immuno-hematologic, and biometric parameters, behavior analysis, and a viral challenge. Reproductive parameters of generation F1 were not affected. However, developmental toxicity in generation F2 due to glyphosate alone or co-formulated was observed with head size changes (e.g. head surface up to +10%), and metabolic disruptions (e.g. 35% reduction in cytochrome-c-oxidase). Moreover, larvae exposed transgenerationally to Viaglif and intergenerationally to glyphosate and Roundup presented a reduced response to light, potentially indicating altered escape behavior. Overall methylation was, however, not altered and further experiments using gene-specific DNA methylation analyses are required. After several months, biochemical parameters measured in juvenile fish were no longer impacted, only intergenerational exposure to glyphosate drastically increased the susceptibility of rainbow trout to hematopoietic necrosis virus. This result might be due to a lower antibody response in exposed fish. In conclusion, our results show that generational exposure to glyphosate induces developmental toxicity and increases viral susceptibility. Co-formulants present in glyphosate-based herbicides

* Corresponding author at: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Fish Virology, Immunology and Ecotoxicology Unit, 29280 Plouzané, France.

E-mail address: jessy.ledu@anses.fr (J. Le Du-Carrée).

can modulate the toxicity of the active substance. Further investigations are required to study the specific mechanisms of transmission but our results suggest that both non-genetic mechanisms and exposure during germinal stage could be involved.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human activities in modern societies involve particularly strong interactions with natural ecosystems (Milner-Gulland, 2012). In agriculture, production levels have increased significantly in the past few decades to respond to consumer demand, with the massive use of agrochemicals (Udeigwe et al., 2015). Among these chemical inputs, glyphosate is a widely used herbicide that has improved agricultural efficiency by controlling weed development (Benbrook, 2016). Sprayed in the form of co-formulated products called glyphosate-based herbicides (GBHs), this active substance and its associated co-formulants have raised concern about their effects on aquatic ecosystems (Folmar et al., 1979; Giesy et al., 2000; Gill et al., 2018). While glyphosate does not bio-accumulate in animal tissues (Duke, 2020; EFSA, 2015), it is semi-persistent in the aquatic environment for 7 to 14 days (Giesy et al., 2000). Its massive use therefore makes it ubiquitous in surface water, inducing almost continuous exposure with aquatic organisms.

Environmental risk assessments of glyphosate, like those carried out by the European Food Safety Authority (EFSA), classified the risk for aquatic organisms as low, considering both expected levels of this active substance in the environment and its toxicity parameters (EFSA, 2015). However, there is evidence that glyphosate alone possesses its own toxicity, often characterized by a non-monotonic dose-response curve (i.e. lower doses could induce greater effects) (Myers et al., 2016; Smith et al., 2019; Vandenberg et al., 2017), and can disrupt certain physiological functions of aquatic organisms (Annett et al., 2014). There is also considerable debate due to confusion between the toxicity of the active substance alone and that of GBHs, associated with a lack of clarity in certain research papers (Mesnage and Antoniou, 2018). Some GBHs have been found to be more toxic than the pure active substance: this toxicity could be associated in part with the co-formulants or with their interactions with glyphosate (Székács and Darvas, 2018).

In France, where a governmental plan has the objective to reduce its use from 50% for 2022, glyphosate was frequently detected in streams and river waters between 2007 and 2017 (ranging from 22.2 to 49.7%) (Anses, 2019) and a recent study reported mean concentration in surface water of $0.22 \mu\text{g L}^{-1}$ of active substance (Ineris, 2020). At the European level, maximum predicted concentration in surface waters are comprised between 20 and $40 \mu\text{g L}^{-1}$ (EFSA, 2015). Considering these concentration range, the majority of studies evaluating the effects of glyphosate and GBHs on fish were done with non-environmentally relevant concentrations. Although these concentrations are reported as sublethal (EFSA, 2015), they could produce high toxic stress, inducing physiological disruptions that are not specific to the mode of action (MoA). Studies using doses at or near environmentally relevant concentrations have shown effects on acetylcholine esterase (AChE) (Gluszcak et al., 2007), oxidative stress defenses (Ayanda, 2018; Persch et al., 2017), parameters related to energy metabolism (Ayanda et al., 2015; Gluszcak et al., 2007; Marchand et al., 2006), and the immune system (El-Gendy et al., 1998). The changes reported at these levels of biological organization could be associated with observations at the level of the entire organism, such as early development disruptions (Fiorino et al., 2018; Weeks Santos et al., 2019; Zebraal et al., 2017), behavioral changes (Bridi et al., 2017; Faria et al., 2020; Giaquinto et al., 2017; Weeks Santos et al., 2019; Zhang et al., 2017), or decreased resistance to pathogens (Kelly et al., 2010). However, no clear correlations between effects at different levels of organization have been highlighted, and the complex

MoA of glyphosate alone or associated with co-formulants is still not understood (Annett et al., 2014).

Direct exposure to a chemical is the most usual route of contamination that could impact the phenotype of an individual, and it is the most studied in the field of ecotoxicology. Nevertheless, in the last few decades, the transmission of toxicity through genetic and non-genetic mechanisms of heredity has become a particular source of concern (Shaw et al., 2017). It is now acknowledged that these mechanisms play a role in the adaptation of organisms to their changing environment (Munday, 2014). While genetic mutations induced by the genotoxic properties of a chemical could mostly impact the natural population in the very long-term (Bickham et al., 2000), non-genetic mechanisms such as epimutations are more likely to induce physiological changes in the short term (Best et al., 2018). Intergenerational and transgenerational exposures correspond to a generation F1 and at least a generation F2, originating from a contaminated F0 generation (Stenz et al., 2018). In the case of intergenerational exposure, the F1 generation is directly exposed at the stage of germinal cells in the parent organism. In transgenerational exposure in fish having external fecundation, the phenotype of the F2 generation is more likely affected by non-genetic inheritance, such as epigenetic mechanisms (Hanson and Skinner, 2016). Finally, for contaminants that are ubiquitous in the environment such as glyphosate, multigenerational exposure is the most environmentally relevant mode of exposure because it considers fish originating from contaminated parents that are also directly contaminated (Hanson and Skinner, 2016). While transgenerational toxicity has been demonstrated only in mammals, (Kubsad et al., 2019), inter and multigenerational toxicity in fish species has been identified by several authors (Smith et al., 2019; Webster et al., 2014).

In previous studies, we observed that a chronic exposure of adult rainbow trout (F0) to an environmentally relevant dose of glyphosate of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ administered alone or associated with co-formulants, induced only occasional impact on immune response without major change in reproduction, metabolism nor oxidative response (Le Du-Carrée et al., 2021a). However, F1 fish born from this exposed F0 generation (i.e. intergenerationally exposed F1) showed behavioral changes and modified markers of energetic metabolism, depending of the presence and the nature of co-formulants (Le Du-Carrée et al., 2021b). To go further and bring evidence that non-genetic mechanisms of toxicity inheritance exist, we analyzed in this study the impact of glyphosate and GBHs multi, inter and transgenerational exposures on the F2 generation. We focused particularly on the early development of this F2 generation, with measurements of different biochemical parameters and the characterization of biometric and behavioral traits. Defense capacities against a viral infection were also evaluated in F2 juvenile fish and were interpreted in light of their energy metabolic status.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Three chemical compounds were tested: glyphosate active substance (G; Sigma-Aldrich, ref. 45,521, CAS Number 1071-83-6) and two GBHs: Roundup Innovert® (R; Agrilisa - for professional use) and Viaglif Jardin® (V; Agrilisa - for home gardens). The purity of G was 98%, and the concentrations of R and V were 360 and 420 g L^{-1} of glyphosate, respectively. Formulation properties and concentrations of the two commercial products, R and V, were unknown. For each product,

concentrated aqueous solutions (4 mgL⁻¹ in distilled water) were prepared and stored under appropriate conditions (darkness, 4 °C ± 2). A pre-dilution of pure glyphosate was done in 10 mL of pure methanol (concentration of solvent in concentrated solution was 10 mL⁻¹ so the final dose of methanol exposure was kept under 4 µLL⁻¹ as recommend by Hutchinson et al. (2006)).

2.2. Fish

Experiments were conducted using specific pathogen-free (SPF) rainbow trout reared in the protected and monitored fish facilities of the ANSES Plouzané Laboratory site (France).

Fish experimentation was carried out in strict accordance with European guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare (European Union Directive 2010/63). Experimental procedures were validated by the animal ethics committee ANSES/ENVA/UPC No. 16 and authorized by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (APAFIS#2019010812403065). Euthanasia involved the addition of a lethal dose of 100 ppm of Eugenol into the tank water. The animals were put in contact with the product until complete disappearance of all respiratory activity.

A timeline describing the production of the three rainbow trout generations and the experimental design is presented in Fig. 1.

Fish were maintained in tanks of 40 L (juveniles) and 400 L (adult) containing river water filtered with sand filter (approximately 20 µm), with a water flow rate to ensure complete renewal once an hour and maintain appropriate physico-chemical conditions and oxygen saturation greater than 60%. Our experimental facilities are supplied with river water with a mean pH of 7.8, a conductivity of 400 µSm⁻¹ and a hardness of 12°TH. Concentrations of ammoniac, nitrate and nitrite are close to 0. Physico-chemical analyses of the water were regularly carried out to guarantee excellent maintenance conditions for all the fish. A photoperiod of 12 h of daylight was maintained throughout the experiments. After the eyed stage period, embryos were placed in 8 tanks (40 L) positioned in a confined room. Temperature during embryonic development was maintained at 8 °C ± 2 °C. After this stage water temperature varied from 6 to 15 °C. A trout-specific feed (Le Gouessant®), adapted to the fish size, was given ad libitum.

The F0 and F1 generations were exposed daily for 10 days and 24 months, respectively, to a mean concentration of 123 ngL⁻¹ of glyphosate using G, R, and V (Le Du-Carrée et al., 2021a). Unexposed control conditions (C) were included. F0 engendered the F1 generation (see (Le Du-Carrée et al., 2021a) for more explanations on reproduction). The F2 generation was produced by 2 to 5 females and 2 to 8 males of the F1 generation from the conditions described in Fig. 2. Conditions C/V and V/V were lost during the experiment due to material dysfunction, so 8 conditions only could give birth to the F1 generation.

Procedure of trout reproduction is described in the article of Le Du-Carrée et al. (Le Du-Carrée et al., 2021a) and embryonic development until the eyed stage (see Bobe et al., 2000) was conducted in 300 L tanks containing two breeding boxes by tank and continuously renewed

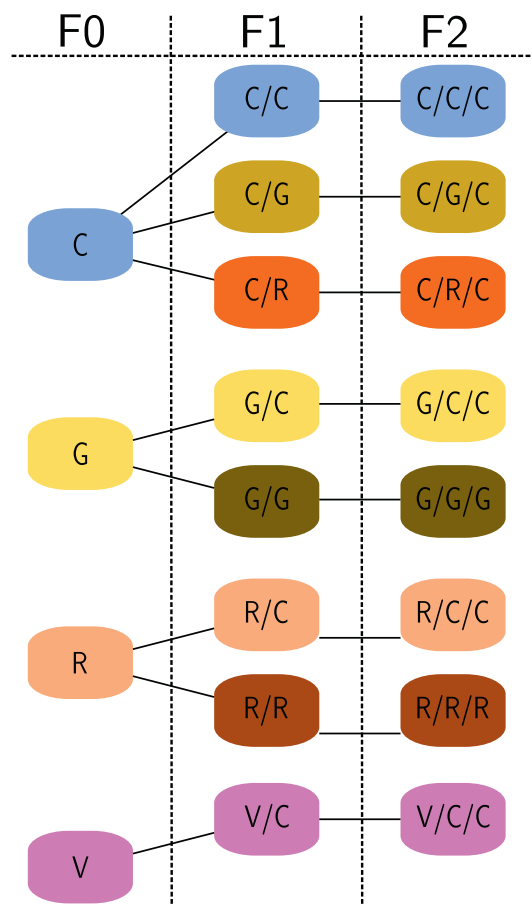


Fig. 2. Origins and exposure status of the F2 generation after multi, inter and transgenerational exposure to glyphosate or GBHs. Conditions of chemical exposure are represented by the following letters: C, Control; G, Glyphosate; R, Roundup; V, Viaglif. F0: the letter before the slash corresponds to the condition of direct exposure of the genitors. F1: the letter before the slash corresponds to the exposure condition of F0, while the letter after the slash corresponds to the condition of direct exposure of the F1 generation. F2: the letter before the first slash corresponds to the exposure condition of F0, while the letter between the slashes corresponds to the exposure condition of the F1 generation, and the letter after the second slash corresponds to the condition of direct exposure of generation F2.

with river water (filtered with sand and cotton wool filters) with a flow rate of approximately 300 Lh⁻¹.

2.3. Experimental design

2.3.1. Chemical exposure

Once the F2 larvae reached eyed stage, rainbow trout embryos were exposed to the 8 conditions presented in Fig. 2. The name of the condition is described with three letters separated by a forward slash, i.e. the

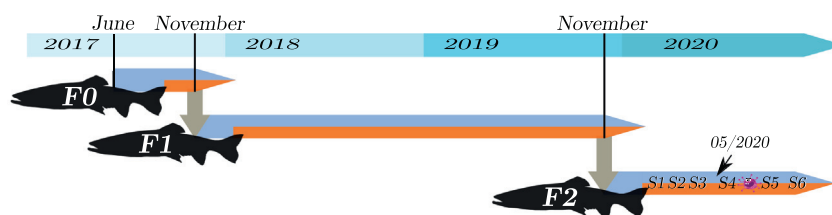


Fig. 1. Timeline illustrating production of the different rainbow trout generations and the analyses carried out on water and fish samples for the F2 generation. For each generation (F0, F1, F2), full blue lines represent phases without chemical exposure. Colors on bars represent period with (orange) and without chemical contamination (blue; for details see Fig. 2), and the control groups (in blue). Viral challenge is marked with a virus symbol. Sampling were done at larvae stage: S1 (350 degree-day, DD), S2 (541 DD), S3 (between 615 and 681 DD) and at juvenile stage: S4 (11 days before the IHNv challenge), S5 (4 days post-infection (dpi)), and S6 (42 dpi). Analysis of glyphosate and AMPA in water is indicated with an arrow, above which the period of analysis. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

first column represents the exposure conditions of generation F0, the second and third represent the exposure conditions of generations F1 and the F2, respectively. Fish produced from non-contaminated F0 and F1 and not directly contaminated formed the control condition called C/C/C. Fish produced from non-contaminated F0 but directly contaminated in F1 were C/G/C, and C/R/C and are considered intergenerationally exposed fish. Fish only contaminated through F0 are considered transgenerationally contaminated, and were G/C/C, R/C/C, and V/C/C. Finally, multigenerational exposure designated fish that were contaminated continuously for three generations. They are represented by the conditions G/G/G and R/R/R. F1 and F2 chemical exposure was conducted with the same methodology as for F0 (details are available in Le Du-Carrée et al. [(Le Du-Carrée et al., 2021a)]. In brief, every working day (generally 5 days a week), 10 mL of each of the respective concentrated chemical solutions were added to the experimental tanks, for which the arrival of water was stopped for 1 h. Regulated water flow was set up after 1 h of contact for the rest of the day at 13.5 L h^{-1} , resulting in gradual dilution of glyphosate. Theoretical glyphosate concentration kinetics were modeled using the Eq. (1) and the resulting curve is presented in Fig. 4. The integrated mean daily theoretical concentration was approximately 123 ng L^{-1} (the area integrated is represented by a blue zone on the theoretical dilution curve in Fig. 4).

$$C(t) = C_{\text{initial}} \times e^{-\text{rate}/V_{\text{tank}} \times \text{time}} \quad (1)$$

Water sampling was performed in March 2020 (after approximately three months of chemical contamination) to measure concentrations of glyphosate and its main metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) in water tanks. For each chemically contaminated and control tank, 150 mL water samples were taken using sterile plastic bottles and stored at -4°C . Quantification of glyphosate and AMPA was done within 72 h after sampling using HPLC and fluorometric methods (Method ref. ANA-I10.MOA.69.B) by an external provider (Laboccea, France).

2.3.2. Viral challenge

The virus used for viral challenge was the N61 strain (genotype E) of the infectious hematopoietic necrosis *IHN* virus (i.e. *IHNv*) isolated from diseased rainbow trout fry displaying typical signs of the disease. A 100 mL stock of the virus, isolated from diseased rainbow trout in 1989 and used as French reference strain, was produced at 14°C on an *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) cell line (Fijan et al., 1983) in homemade Eagle medium (Glasgow MEM in powder (Pan Biotech), with Tris-HCl 0.19 M and HCO_3Na (pH 7.6) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio), $1 \times$ antibiotics (100 IU mL^{-1} penicillin G, 0.1 mg mL^{-1} streptomycin) and L -glutamine (HyClone). Once the cytopathic effect was complete, cell culture supernatant was centrifuged for 15 min at $2,000 \times g$ and stored at -80°C . The infectious titer of the viral production, determined using the median tissue culture infectious dose (TCID_{50}) endpoint method in 96-microplate wells (Kärber, 1931), was $4 \times 10^7 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$. After approximately 6 months of chemical exposure, 280 F2 fish for each chemical treatment were randomly distributed to four 10 L tanks with constant water renewal (i.e. 70 fish per replicate of a condition). Three of these tanks were infected with *IHNv*, and one was used as the uninfected control. Infection was done by placing fish in a reduced volume of 1 highly oxygenated water with an infectious dose of $10^4 \text{ TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ for 3 h. Non-infected EPC cell supernatant was used for uninfected control tanks.

For 6 weeks after *IHNv* infection, general behavior, the appearance of clinical signs (lethargy, darkening of the skin, exophthalmia), and mortality were recorded twice a day. Dead individuals were stored at -20°C for viral examination.

2.4. Sampling date

Fertility was considered to be the proportion of eggs surviving at 5 days post-fertilization (Contreras-Sánchez et al., 1998). To perform

this measurement, egg survival was assessed daily for each female on a fraction of approximately 200 eggs isolated in plastic breeding boxes.

Larvae for biometric indices and malformation measurements were sampled at 350 DD (S1, see Fig. 1 for graphical illustration) and stored in a 3% glutaraldehyde solution (described by Nikolakakis et al., 2014) at 4 DD until the analysis. Note that condition C/R/C was lost during storage and could not be analyzed.

At 541 DD (S2), invasive sampling was done on 20 larvae exposed to the different conditions. They were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for future analyses.

Eleven days before infection (S4), 96 h post-infection (96 hpi; S5), and 42 days post-infection (42 dpi; S6) to *IHNv*, invasive sampling was done on 20 juvenile rainbow trout aged approximately 6 months, with size and length (mean \pm se) of 5.69 ± 5.69 and 83.83 ± 0.75 , respectively. A blood sample was taken by withdrawing $10 \mu\text{L}$ of blood from the caudal vein with a lithium heparin hematocrit tube (Greiner ref. KG454244), and fish were euthanized. Then, at S4, gills were sampled, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for future analyses. Note that between S3 and S4, condition G/G/G was lost due to an incident during fish maintenance and could not be sampled.

2.5. Biomarkers analyzed

2.5.1. Biometric index measurements and malformation analysis

Biometric index measurements and malformation analysis were done on a picture of larvae taken with a binocular magnifier (Stemi 508) coupled to a camera (Canon DS126431) permitting $40\times$ magnification. Body length (without tail fin), head surface, eye diameter, and yolk sac surface were analyzed using TouPView software, version 3.7 (Fig. 3a) on a total of 30 larvae per condition. Frequencies of malformation were determined on larvae considering jaw malformations (Fig. 3b), yolk sac edema (not observed), and spinal curvature (Fig. 3c).

2.5.2. Swimming behavior analysis

The analysis was done during a time window of seven days with free-swimming larvae (i.e. from 615 to 681 DD, S3 sampling date in Fig. 1) maintained at 11 throughout the experiment.

The protocol for the swimming photomotor assay was adapted from the study by Weeks Santos et al. (2019) and is described in detail in Le Du et al. (submitted). In brief, a DanioVision system was used to record the distance and the speed traveled by larvae individually distributed in six-well cell culture plates during three phases at different light intensities (10 min of darkness, Dark 1; followed by 10 min of light, light 1; finally followed by 10 min of darkness, Dark 2).

2.5.3. Viral examination and immune parameters during the viral challenge

The presence and concentration of *IHNv* were checked individually from 3 dead fish collected at peak mortality, by replicate chemical condition. Extracted organs (kidneys, spleen, heart, and brain) were pooled and crushed using a mortar and pestle, diluted to 10^{-1} with Eagle medium, and centrifuged for 15 min at $2,000 \times g$ at 4°C . The supernatant was then diluted to 10^{-8} , and the virus concentration was determined for each fish, as described in Section 2.3.2. At S5, red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts were performed on a Thoma cell hemocytometer using whole blood diluted to 1/200 in Giemsa solution (Kekic and Ivanc, 1982). At S6, detection and semi-quantification of anti-*IHNv* antibodies in the plasma of surviving fish were performed using a modified procedure following Jorgensen et al. (Jorgensen et al., 1991), according to the repealed standard NF U-47-022 as described by Louboutin et al. (Louboutin et al., 2021).

2.5.4. Methylation

Extraction of total DNA was performed using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Global DNA methylation was then measured on 100 ng of total DNA extracted from whole fish larvae sampled at S2, using a MethylFlash Global DNA

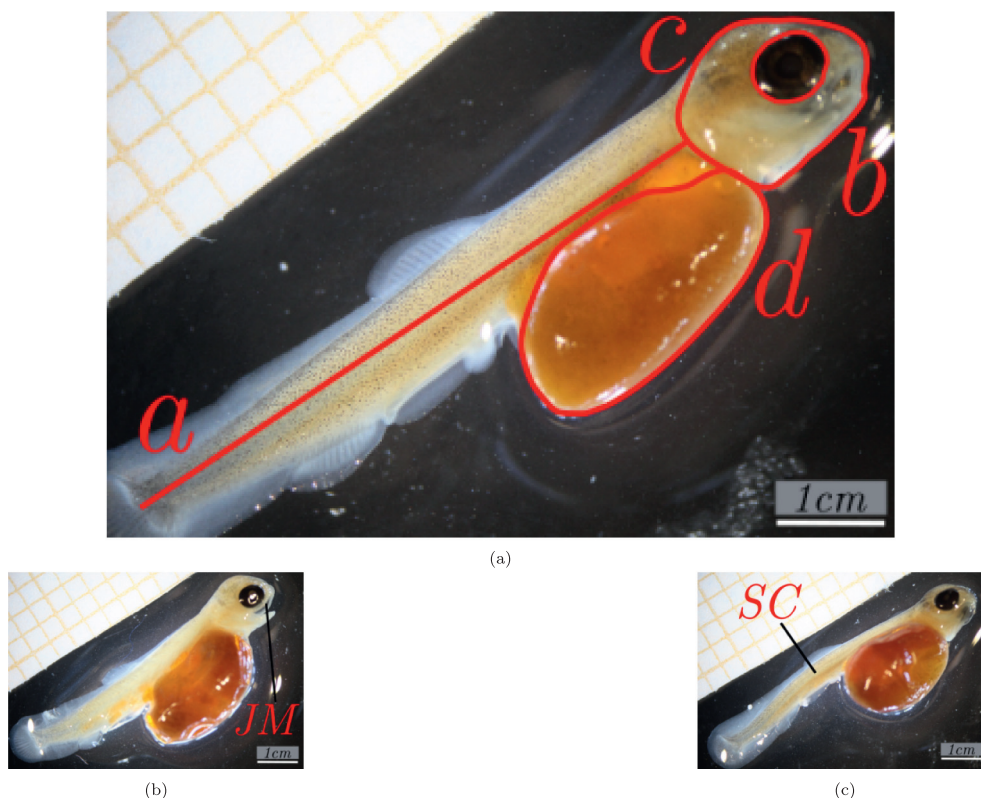


Fig. 3. Type of malformations analyzed. Non-malformed control larvae (panel a) with indication of the different biometric indices measured: a. Body length, b. Head surface, c. Eye diameter and d. Yolk sac surface. Panels b and c, represent directly-exposed larvae with malformations, respectively: jaw malformation (JM, from the G/C/C condition) and spinal curvature (SC, from the G/C/C condition).

Methylation (5-methylCytosine or 5-mC) ELISA Easy Colorimetric Kit (Epigentek), following the manufacturer’s instructions. Absorbance of the products were measured on a TECAN Spark 10 M microplate spectrophotometer at 450 nm. Calculation of the percent methylated DNA for each sample was carried out by reporting the optical density values on the standard curve using the Formula (2) (NC = negative control, A = absorbance, S = amount of total DNA in ng).

$$5\text{-mC}\% = \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{NC}}}{\text{Slope} \times S} \times 100\% \quad (2)$$

2.5.5. Oxidative stress and metabolic parameters

Choline esterases (ChE), oxidative parameters, namely thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), and metabolic parameters, i.e. citrate synthase (CS); cytochrome c oxidase (CCO); lactate dehydrogenase (LDH); and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), were assayed in larvae (sampled at S2) and gills of juvenile (sampled at S4) following the same procedures described in a previous article (Le Du-Carrée et al., 2021a).

2.6. Data processing and statistical analyses

Statistical analyses and data processing were performed with R software (R Core Team, 2018). Figures were generated using the ggplot2 package (Wickham, 2016). Quantitative data sets were tested for normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (test of Levene for parametric data and Fligner-Killeen for non-parametric data). When normal and homoscedastic data were confirmed, one-way ANOVA tests were used to compare means, followed by a post-hoc test of Dunnett (Dunnett, 1955). In the case of normal and heteroscedastic

data, modified one-way ANOVA tests were used to compare means (Welch, 2012), followed by a post-hoc test of Tamhane-Dunnnett (OECD, 2006). In the case of non-normal data, a Kruskal-Wallis test was used to compare means, followed by a post-hoc test of Dunn (Dunn, 1964). Differences between malformation rates were compared using a chi-squared test. Survival rates for the different chemical treatments were compared using the “survival” package (Therneau, 2015). A p-value of 0.05 was used as the threshold for statistical significance. A test of correlations between variables was carried out using the lmrob R function (R package robustbase; (Wilcox, 2016)).

3. Results

3.1. Glyphosate concentrations in exposure tank water

Validation of the experimental chemical contamination procedure for the exposure of F0 and F1 generation trout in 400 L tanks was performed in a previous experiment (see Carrée et al. (Le Du-Carrée et al., 2021a) for methodological details and results). During this experiment, the river water supplying the tanks did not present any detectable concentration of glyphosate. After 1 h of exposure and just before water flow reopening, concentrations of glyphosate of 0.54 and 0.57 μgL^{-1} were quantified in tanks contaminated with glyphosate and Roundup, respectively (Fig. 4). These concentrations were 46 and 43% below the theoretically expected value of 1 μgL^{-1} . One hour after water flow reopening, the concentration of glyphosate in the tanks contaminated with the active substance was close (2% variation) to the expected concentration of 0.71 μgL^{-1} , whereas it was 47% lower in the Roundup contaminated tanks. Two hours after restarting water flow, glyphosate concentrations were 45% below expected values for both tanks (0.28 instead of 0.51 μgL^{-1} theoretically). AMPA, the main metabolite of glyphosate, was not

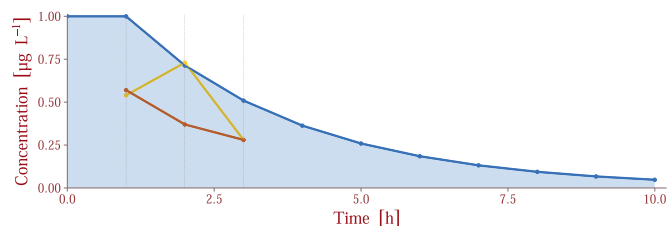


Fig. 4. Mean concentrations of glyphosate in water tanks as a function of time ($\mu\text{g L}^{-1}$). Concentrations obtained by HPLC analysis were compared with theoretical concentrations (in blue, modeled using Eq. (1)) at different kinetic time-points. Water was sampled after approximately three months of contamination for each condition (Glyphosate - G in yellow, Roundup - R in orange), just before, and 1 and 2 h after water flow reopening. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

detected in any of the samples including those artificially contaminated with the active substance or Roundup.

3.2. Fertility and fecundity of the F1 generation

Relative fecundity of the F1 generation aged of two years varied between 1.79 ± 0.61 and 3.05 ± 0.40 eggs g^{-1} , regardless of the condition, with no detectable impact of the chemical contamination (Table 1).

Fertility was calculated for control and intergenerationally contaminated fish of the F2 generation. It was greater than 97% regardless of the condition considered (data not shown). No statistically significant difference was measured.

3.3. Biometric indices and malformations observed on the F2 generation

No differences between control and chemically contaminated F2 larvae sampled at S1 were observed for body length and yolk sac surface (Table 2). Different chemical conditions induced significant changes in other biometric indices, such as an increase in head surface, d.f.=6 and $\chi^2=30.50$, eye surface (p . value<0.0001, d.f.=6 and $\chi^2=43.56$), and eye:head surface ratio (p . value=0.001, d.f.=6 and $\chi^2=26.97$). For head surface, a post-hoc test revealed significant differences for the G/C/C (+10%) and G/G/G (+9%) conditions, compared to the control (p . value<0.05). For eye surface, a post-hoc test revealed a significant increase (+9%) for the multigenerationally exposed G/G/G condition (p . value<0.05). For eye:head surface ratio, a post-hoc test revealed a significant reduction for C/G/C (-5%) and R/R/R (-9%) compared to the control (p . value<0.05).

Spinal curvatures and jaw malformations were detected in F2 larvae (Fig. 5). Low frequencies of jaw malformations were observed for all conditions, with proportions ranging from 0 to 7%. Spinal curvature was the most frequent malformation detected, with frequencies ranging from 0 to 11%. No yolk sac edema was observed. Chemical treatments did not induce statistically significant induction of malformations compared to the non-exposed condition (i.e. the control).

Table 1
Relative fecundity of the F1 generation (expressed in eggs g^{-1} ; mean \pm standard error, se) as a function of the chemical exposure conditions ($2 \leq n \leq 5$; see Fig. 2).

Mode of exposure	Condition	Relative fecundity	
		Mean	se
Control	C/C	2.17	0.44
	Trans.	2.85	0.28
	R/C	2.10	0.33
	V/C	3.05	0.40
Direct	C/G	2.27	0.38
	C/R	1.79	0.61
Multi.	G/G	2.14	0.86
	R/R	2.53	0.44

Table 2
Mean biometric indices measured at 350 (S1) in F2 larvae exposed directly or through their parents to glyphosate or GBHs (see Fig. 2 for details on chemical exposure conditions). Standard errors are given in parentheses under each respective mean ($n=30$). Lengths are expressed in, surfaces in and ratios in %. Numbers in bold with an asterisk indicate conditions significantly different ($p<0.05$) from the control.)

Parameter	Mode of exposure						
	Control	Transgenerational			Inter.	Multigenerational	
	C/C/C	G/C/C	R/C/C	V/C/C	C/G/C	G/G/G	R/R/R
Body length	14.9 (0.121)	15.35 (0.148)	15.01 (0.113)	15.15 (0.117)	15.12 (0.091)	15.42 (0.09)	14.36 (0.186)
Head surface	6.25 (0.089)	6.89* (0.196)	6.32 (0.138)	6.39 (0.129)	6.47 (0.109)	6.82* (0.114)	5.85 (0.179)
Eye surface	1.17 (0.023)	1.34 (0.097)	1.21 (0.022)	1.2 (0.025)	1.15 (0.018)	1.28* (0.03)	1.01 (0.051)
Eye:head surface ratio	18.78 (0.29)	19.11 (0.71)	19.18 (0.27)	18.8 (0.25)	17.89* (0.2)	18.71 (0.4)	17.04 (0.67)

3.4. Metabolic activity

Chemical contamination induced changes in certain enzymatic levels in F2 larvae sampled at S2 (Table 3). While no changes were observed for AChE, LDH, or TBARS regardless of the chemical condition considered, statistically significant reductions in enzymatic activities were detected for CAT, CCO, and CS. CAT activity was affected by chemical exposures (p . value=0.003, d.f.=7 and $f=3.25$), with a significant reduction of 13, 18, 15, and 23% found by a post-hoc test for the G/C/C, G/G/G, R/C/C and V/C/C conditions, respectively, compared to the control ($p<0.05$). CCO and CS activities were also affected by chemical exposure (p . value<0.0001, d.f.=7 and $f=12.30$; p . value=0.04, d.f.=7 and $f=2.14$, respectively), with reductions for G/C/C and V/C/C comprised between 12 and 33%, compared to the control ($p<0.05$). A reduction of 35% in CCO activity was also observed between the control and G/G/G ($p<0.05$). The ratio between CS and CCO activities (CS:CCO ratio), which presented mean values ranging between 138.32 ± 4.38 and , was affected by chemical contamination (p . value<0.0001, d.f.=7 and $\chi^2=53.60$). Increases of 33 and 31% were observed for G/C/C and G/G/G compared to the control, respectively ($p<0.05$). The LDH:CS ratio, comprised between 3683.89 ± 84.00 and 4656.21 ± 127.94 , was also altered by the chemical treatments (p . value<0.0001, d.f.=7 and $f=11.39$). Conditions G/C/C, C/G/C, and V/V/V showed increased values of 19, 24, and 14% compared to the control, respectively ($p<0.05$).

At S4, chemical contamination did not induce changes in LDH and GPx activities nor in CS:CCO and LDH:CS ratios in rainbow trout gills (see Table B.6 in Appendix). However, changes were observed in CCO and CS activities (p . value=0.002, d.f.=6 and $f=3.87$ and p . value=0.003, d.f.=6 and $\chi^2=19.94$), enzymes involved in aerobic metabolism.

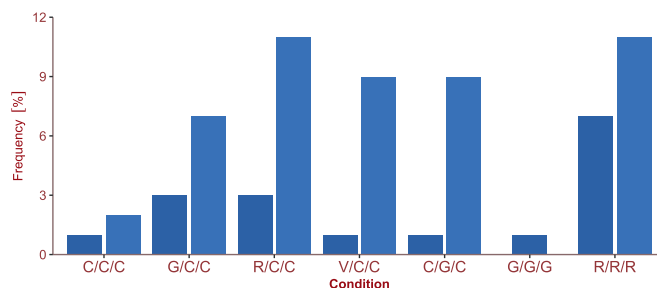


Fig. 5. Malformation frequencies measured in F2 larvae at 350 (S1) according to the different chemical conditions ($89 \leq n \leq 113$; see Fig. 2). Bars represent jaw malformation frequencies (dark blue) and spinal curvature frequencies (pale blue). The analyses were done on a total of 89-113 larvae per condition. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3

Mean specific activities and TBARS levels measured in whole F2 larvae at 541 DD (S2) for the different chemical conditions (see Fig. 2). Specific activities are expressed in IU mg⁻¹ of protein and MDA concentrations in nmol mg⁻¹ of protein. Standard errors are given in parentheses under each respective mean (11 ≤ n ≤ 20). Values in bold with an asterisk are significantly different (p < 0.05) from the control condition.

Parameter	Mode of exposure							
	Control	Transgenerational			Intergenerational		Multigenerational	
	C/C/C	G/C/C	R/C/C	V/C/C	C/G/C	C/R/C	G/G/G	R/R/R
AChE	0.31 (0.0094)	0.29 (0.007)	0.31 (0.0079)	0.28 (0.0099)	0.29 (0.0117)	0.31 (0.0105)	0.3 (0.011)	0.35 (0.0145)
CAT	7.46 (0.21)	6.3* (0.27)	6.32* (0.29)	5.78* (0.25)	6.46 (0.27)	6.31 (0.26)	6.14* (0.33)	6.96 (0.38)
CCO	0.25 (0.0173)	0.16* (0.0089)	0.23 (0.0076)	0.2* (0.0084)	0.23 (0.0113)	0.22 (0.0089)	0.16* (0.007)	0.26 (0.0109)
CS	0.36 (0.0082)	0.32* (0.0098)	0.34 (0.0092)	0.32* (0.0117)	0.32 (0.0128)	0.34 (0.0123)	0.32 (0.0116)	0.35 (0.013)
CS:CCO	1.56 (0.111)	2.07* (0.154)	1.54 (0.047)	1.59 (0.056)	1.47 (0.066)	1.6 (0.066)	2.03* (0.051)	1.38 (0.044)
LDH	13.4 (0.5)	14.05 (0.4)	14.41 (0.52)	13.5 (0.58)	14.89 (0.59)	12.54 (0.47)	12.07 (0.53)	13.03 (0.65)
LDH:CS	37.44 (1.53)	44.65* (1.24)	42.7 (1.34)	42.68* (1)	46.56* (1.28)	36.84 (0.84)	37.53 (0.95)	37.33 (0.87)
TBARS	0.92 (0.284)	0.57 (0.114)	1.18 (0.198)	0.54 (0.064)	1.07 (0.104)	0.97 (0.095)	0.65 (0.077)	0.82 (0.095)

Mean CCO activity ranged between 0.16 ± 0.0089 and 0.26 ± 0.011 IU mg⁻¹, while CS activities ranged between 0.32 ± 0.0098 and 0.36 ± 0.0082 IU mg⁻¹ according to the considered treatment. A post-hoc test revealed that CCO and CS activities were 24% higher in the C/G/C condition compared to the control (p < 0.05) (see Table B.6 in Appendix).

3.5. Global methylation in whole F2 larvae

The proportion of 5-methyl Cytosine (5-mC) measured in total DNA of whole larvae, comprised between 2.68 ± 0.26 and 3.42 ± 0.21 5mc/total DNA, was similar among the different chemical exposure conditions (Fig. 6).

3.6. Swimming behavior

Distances traveled by larvae in darkness were comprised between 4.18 ± 0.64 m and 6.89 ± 1.11 m and between 7.97 ± 0.69 m and 10.16 ± 0.89 m (mean ± se) during the first and second periods, respectively (Fig. 7). A drastic speed reduction was observed under light exposure, with distances traveled comprised between 1.87 ± 0.24 m and 2.65 ± 0.40 m. Chemical exposure did not induce statistically significant changes in the traveled distance for the different light intensity periods considered. However, a peak of swimming activity was observed during the minute following opening of the light (blue area of the Fig. 7, where larvae from the control condition presented the highest speed. Fig. 8 represent the speed of larvae during the minute following the opening of the light. A comparison of this values for the different chemical exposure conditions revealed a statistically significant effect of chemical exposure on the response to light (p. value = 0.004, d.f. = 7 and χ² = 20.35). A post-hoc test showed that control speed was 47, 40 and 42% higher than C/G/C, C/R/C, and V/C/C, respectively (p < 0.05).

3.7. Mortality induced by the viral challenge

Mortality was observed for all conditions following the viral challenge with IHNv (Fig. 9). The lowest cumulative mortality rate was obtained for the non-chemically exposed larvae (i.e. 39.1 ± 5.6%, mean ± se, n = 3), while values ranging from 46.0 ± 1.6% to 83.0 ± 5.7% were obtained for chemically exposed fish, with a significant difference between groups (p. value < 0.0001, d.f. = 6 and χ² = 234). A post-hoc test revealed a significant difference (p. value < 0.05) in mortality between the C/G/C, R/R/R, and C/R/C conditions, which presented restricted mean survival times (RMSTs) of 14.6 ± 2.6, 23.0 ± 3.9, and 25.3 ± 2.5 dpi (mean ± se, n = 3), compared to 32.9 ± 1.1, 33.8 ± 0.5, 33.8 ± 1.1, and 36.6 ± 2.1 dpi for the control, V/C/C, R/C/C and G/C/C conditions, respectively.

Maximum daily mortality (i.e. the mortality peak) was observed 6 to 10 dpi for all conditions (data not shown). On the three pools of dead fish analyzed at the mortality peak, IHNv was detected in 33.3 to 100% of the samples, depending on the exposure condition (Table 4). The mean viral titer of positive pooled fish was between 2.38 × 10⁹ ± 1.97 × 10⁹ and 4.88 × 10³ ± 1.76 × 10³ for the different conditions of chemical contamination, and was not correlated with the cumulative mortality observed.

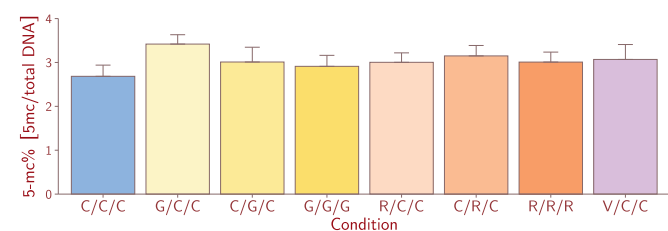


Fig. 6. Mean global DNA methylation expressed in 5-methyl Cytosine % (5mc/total DNA) measured in whole larvae for each chemical condition (8 ≤ n ≤ 9, see Fig. 2).

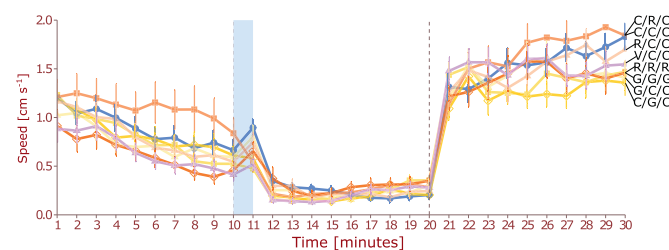


Fig. 7. Mean speed of the F2 larvae for the different phases of light intensities according to the exposure condition (see Fig. 2). Mean speeds, expressed in cm s⁻¹, were analyzed at S3. Standard errors are given at the top of each bar (33 ≤ n ≤ 46). Colors indicate exposure conditions: G (in yellow), R (in orange), V (in pink), and control (in blue). For chemically contaminated groups, solid circle, solid square, and non-solid diamond represent trans, inter, and multigenerational exposure, respectively. The first and second dashed vertical bars represent the opening and extinguishing of the light, respectively. The blue rectangle indicates the minute of peak swimming activity at the start of the light phase, during which the larval speeds under the different conditions are compared in Fig. 8. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

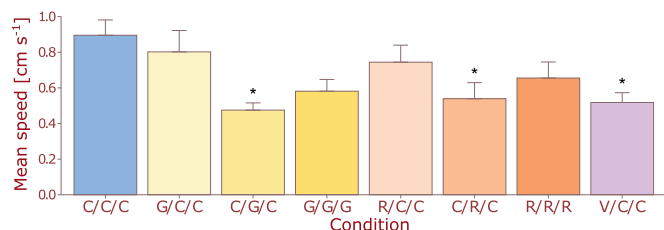


Fig. 8. Mean speed (cm s⁻¹) of F2 larvae during the minute after light opening as a function of exposure conditions. Standard errors are given at the top of each bar (33 ≤ n ≤ 46). Significant differences from the control means are indicated with “*” (p < 0.05).

3.8. Immuno-hematologic parameters

After 96 h of viral infection (S4), no effects of chemical contamination were detected in the RBCCs or WBCCs of the F2 juvenile rainbow trout (see Table A.10 in Appendix). RBCCs ranged between 0.32 ± 0.031 and 0.56 ± 0.11 TL, while WBCCs ranged between 15.69 ± 1.55 and 25.5 ± 3.97 GL.

At 42 dpi (S6), similar proportions of *IHNv* seropositive fish, ranging between 10/15 and 14/15 fish, were detected in the serum of the survivor fish for all exposure conditions (Table 5). However, the control and transgenerationally exposed fish presented higher proportions of highly seropositive fish (comprised between 60 and 85%), compared with fish intergenerationally exposed to glyphosate and Roundup and multigenerationally exposed to Roundup (comprised between 36 and 55%). No statistically significant differences in proportions of highly seropositive fish were found, but the *p*-value was just above the significance threshold (*p* value = 0.10, d.f. = 6 and $\chi^2 = 10.51$). Nevertheless, the highly positive individuals presented mean anti-*IHNv* antibody titers that were not significantly affected by chemical contamination.

4. Discussion

Data on the generational toxicity of glyphosate are still rare, and few authors have reported transmission of deleterious effects from generation to generation in fish (Smith et al., 2019; Webster et al., 2014) and mammals (Kubsad et al., 2019). The complex experimental design of our study made it possible to examine the impact of both pure glyphosate and two GBHs (i.e. co-formulated glyphosate) on an F2 generation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to the contaminants at 1 µg L⁻¹ of active substance either directly or through their parents and/or grandparents. This long-term experimental work provided the opportunity to investigate the effect at low dose of trans and

intergenerational modes of toxicity transmission, but also the potential cumulative effects of multigenerational exposure, which best reflects the environmental reality.

The exposure procedure was validated by glyphosate detection at several timepoints of chemical dilution. Overall results revealed that glyphosate concentrations were approximately 50% below expected values after 1 h of contact and before water flow reopening. These results could be explained by poor homogenization of the chemical solution in the water tanks containing the fish. Concentrations found in tanks exposed to pure glyphosate 2 h after water flow reopening matched well with expected values and appear to confirm this hypothesis. Nevertheless, values obtained after this first hour of exposure in a closed circuit seemed to fluctuate over the following days, as suggested by other assays carried out for the F0 and F1 generations at the same kinetic timepoints (Le Du-Carrée et al., 2021a). Additionally, mean concentrations could be closer to the theoretical values than those observed here.

Glyphosate alone or associated with co-formulants disrupt certain physiological processes linked to reproduction (Armiliato et al., 2014; CA, H., Jr, V.A., AA, M., C, C.L., EG, P., A, B., CD, C, 2013; Jin et al., 2018; Lopes et al., 2014; Peillex and Pelletier, 2020; Sánchez et al., 2017; Soso et al., 2007; Zebal et al., 2018). While these effects are generally detected at high, non-environmentally relevant concentrations, changes in 17β-estradiol levels, increased ovary diameter and disrupted ultrastructure, and induced over-expression of a gene involved in endocrine control of ovarian maturation have also been reported at lower concentrations in male delta smelt (*Hypomesus transpacificus*) (Jin et al., 2018) and female zebrafish (*Danio rerio*) (Armiliato et al., 2014; Davico et al., 2021). The lower dose of 1 µg L⁻¹ used in the present study did not affect the fecundity and the fertility of the F1 generation submitted to direct, inter and multigenerational exposure to the active substance or the two GBHs. This is in phase with (Smith et al., 2019) who showed no evident effects of chronic exposure to 0.5 mg L⁻¹ of pure and co-formulated glyphosate on the fecundity and fertility of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*) but only some changes in the expression of certain genes involved in spermatogenesis. At the same concentration, no impact was detected on female zebrafish, but at a dose 20 times higher, decreased fecundity without an effect on fertility was observed (Webster et al., 2014). Interestingly, in this study, the highest dose tested increased the mortality rate in the F1 generation, but only when this generation was also directly exposed; no effects were found for intergenerational exposure.

Certain studies examining the effect of glyphosate on fish (Smith et al., 2019) or mammal species (Kubsad et al., 2019) have shown that while no effects were observed in the F0 generation, toxicity could be detected in later generations. In our experiment, the malformation occurrence rates in the F2 generation were not increased with statistical significance, regardless of the chemical exposure condition considered. However, spinal curvature frequencies tended to be higher (between +7 and +9% compared to controls) in all transgenerationally contaminated conditions (i.e. G/C/C, R/V/V, and V/C/C), but also in fish exposed intergenerationally to glyphosate (i.e. C/G/C) and multigenerationally to Roundup (i.e. R/R/R). Changes in biometric indices were also detected, particularly for the head surface and for the eye:head surface ratio, which were disrupted in several trans, inter and multigenerational conditions. In common carp (*Cyprinus carpio*) and zebrafish exposed during early development, no effects were observed on zebrafish, but an increase of the malformation rate was detected in common carp with low doses of pure glyphosate (i.e. 5 µg L⁻¹) (Fiorino et al., 2018). During embryo-larval development of zebrafish, only doses of active substance greater than 100 mg L⁻¹ induced decreases in body length and head and eye area (Zhang et al., 2017). In this species, increased biometrics and developmental malformation rates were shown only for concentrations above 8.5 mg L⁻¹ (Lanzarin et al., 2019). No change in the malformation rate was reported in rainbow trout exposed for 3 weeks at the eyed stage to different doses of glyphosate (between 0.1

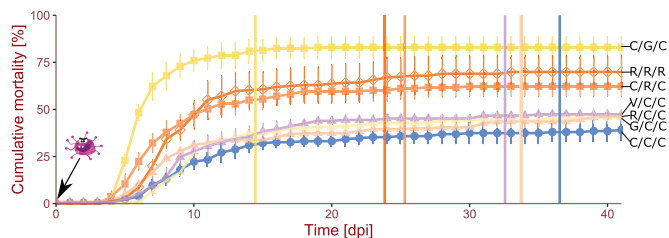


Fig. 9. Cumulative mortality in chemically exposed fish (see Fig. 2 for details on chemical exposure conditions) infected with *IHNv*. Infection time point is marked with a virus symbol. Data are expressed as a function of time in days post-infection (dpi). Colors represent chemical contaminants: G (in yellow), R (in orange), V (in pink) and control (in blue). For chemically contaminated groups, solid circle, solid square, and non-solid diamond represent trans, inter, and multigenerational exposures, respectively. Condition names have been indicated at the end of each respective curve to facilitate reading. Error bars represent standard errors, vertical bars the restricted mean survival time (RMST). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4

Proportion of *IHNv*-positive pools of fish per condition (see Fig. 2) and mean viral titers at the mortality peak. Viral titers are expressed in 50% tissue culture infectious dose per mL (TCID₅₀mL⁻¹) as means ± standard error (n = 3).

Condition	Parameters		
	Proportion of <i>IHNv</i> -positive fish	Mean titer (TCID ₅₀ mL ⁻¹)	se
C/C/C	3/3	2.38 × 10 ⁹	1.14 × 10 ⁹
G/C/C	1/3	6.32 × 10 ³	-
R/C/C	2/3	1.03 × 10 ⁶	6.85 × 10 ⁵
V/C/C	2/3	4.88 × 10 ³	8.31 × 10 ²
C/G/C	2/3	3.26 × 10 ⁵	2.16 × 10 ⁵
C/R/C	3/3	7.40 × 10 ⁷	3.65 × 10 ⁷
R/R/R	3/3	8.84 × 10 ⁴	3.38 × 10 ⁴

and 1 mgL⁻¹), but a decrease in the head:total length ratio of larvae was reported by (Weeks Santos et al., 2019). During the early development of Japanese medaka fish, a 15-day exposure to 0.5 mgL⁻¹ of both pure and co-formulated glyphosate induced embryo-larval malformations (e.g. spinal curvature, yolk sac edema) in the F1 generation, with greater intergenerational effects with pure glyphosate than with a GBH (Smith et al., 2019). Since the sample size in our study may have been too low to detect a significant increase in malformation rates, further investigations are needed to show whether generational glyphosate exposure is able to induce skeletal abnormalities, at environmental concentrations. Moreover, our experiment appears to indicate an effect on head development in the case of trans, inter or multigenerational exposure, depending on the presence and on the nature of co-formulants. Despite statistical significance, the changes observed were subtle (maximum 10% change compared to controls), and further analyses confirming these data are required. In addition, an evaluation of the impact of these developmental defects could reveal the biological significance of our results.

Alongside effects on embryo-larval morphology, behavioral changes have been detected after exposure of fish to pure and formulated glyphosate (Weeks Santos et al., 2019; Zhang et al., 2017). Our analysis of swimming behavior indicates that while no effect of chemical contamination was observed on the speed (or distance traveled) of larvae during the different light phases, the response to light stimulation was disrupted. The light flash induced a considerable stress response characterized by a brief speed increase before larvae considerably decreased their exploratory behavior. This brief momentary speed increase was reduced in all exposure conditions, but particularly in intergenerational exposure to glyphosate and Roundup, and transgenerational exposure to Viaglif. This finding provides evidence that exposure of previous generations of fish could impact escape behavior, and thereby the ability of new generations to survive in the natural environment (e.g. by altering the ability to avoid predators). Similar behavior or conversely increased

Table 5

Proportions of *IHNv*-seropositive and highly seropositive survivors per condition (see Fig. 2) and mean anti-*IHNv* antibody titers (mean ± standard error, n = 15) at 60 dpi (S5). High seropositivity is defined as specific antibody titers greater than ≥640. The proportion of highly seropositive fish per condition corresponds to the ratio between the number of fish with a titer greater than ≥640 and the total number of seropositive fish. Mean antibody titers were calculated for highly seropositive fish only.

Condition	Parameters			se
	Seropositivity	High seropositivity Frequency (%)	Mean anti- <i>IHNv</i> antibody titer	
C/C/C	11/15	73	1360	282
G/C/C	10/15	60	1280	286
R/C/C	12/15	83	1280	165
V/C/C	13/15	85	2153	369
C/G/C	13/15	54	3474	813
C/R/C	11/15	55	2560	859
R/R/R	14/15	36	1280	351

startle response were already reported using similar protocols in rainbow trout larvae exposed chronically or adult zebrafish after acute exposure (Faria et al., 2020; Weeks Santos et al., 2019), with generally a non-monotonic response. This heterogeneity of response could be related with the life stages considered and the condition of exposure (mode, duration, and concentration of chemical exposure). Among the mechanisms associated with these disturbances, an increased anxiety was detected in adult zebrafish exposed to 0.3 and 3 µgL⁻¹ of glyphosate, with a significant increase in dopamine and serotonin levels as well as in the dihydroxyphenylacetic acid/dopamine and homovanillic acid/dopamine turnover ratios in the anterior brain (Faria et al., 2021; Peillex and Pelletier, 2020), and a deregulation of gene pathways directly involved in neuronal physiology and synaptic transmission (glutamate receptor, GABA receptor, cation channels...) (Forner-Piquer et al., 2021) were recently suggested.

The effects reported for the active substance in our study might not be mediated only by epigenetic mechanisms because intergenerational exposure induced a stronger effect than transgenerational exposure, demonstrating that direct chemical contact of the germinal cells could also be involved in the toxicity. Co-formulants, particularly those contained in Viaglif, induced a more accentuated transgenerational effect through potential epigenetic-mediated toxicity, due to their own toxicity or to their interactions with glyphosate.

Epigenetic mutations, including DNA methylation, have appeared in recent decades as a mechanism of non-genetic inheritance that can affect the phenotype of new generations, conferring physiological adaptations to cope with changes in the natural environment (Best et al., 2018; Munday, 2014). Global DNA methylation results for our F2 larvae indicated only a slight trend (i.e. non-statistically significant compared to controls), with an increase for all chemically exposed fish (between +8% and +27% more than the control group). Changes in DNA methylation have been correlated with fish responses to certain stresses (Fan et al., 2020; Li et al., 2016), like environmental contaminants (Fuzinato et al., 2015; Xinwen et al., 2001). Gene-specific methylation could have a significant impact on the phenotype of individuals, even though global methylation is not affected (Bouwmeester et al., 2016; Dorts et al., 2016). When differential DNA methylation patterns are observed, they could be inherited from parents (Gavery et al., 2018) but could also arise from methylation reprogramming during larval development due to the impact of exposure (Dorts et al., 2016). Chronic exposure of Japanese medaka fish during early life stages to 0.5 mgL⁻¹ of glyphosate or a GBH revealed changes in epigenetic-related genes in adult male gametes, and in the intergenerationally exposed F1 larvae (Smith et al., 2019). However, the authors did not demonstrate a direct link between epigenetic changes and toxic effects observed in larvae, nor demonstrate whether these changes could persist in adulthood.

The MoA of glyphosate has not yet been clearly identified but generations of oxidative damages have been suggested to be involved in the induction of toxic effects by the active substance associated or not with its co-formulants (Annett et al., 2014; Peillex and Pelletier, 2020). Thus activated markers of disruption of pro-oxidant anti-oxidant balance could indicate toxic effect of glyphosate at the cellular level. In the case of direct exposure, glyphosate and particularly GBHs generated oxidative stress in fish (Ayanda, 2018; Braz-Mota et al., 2015; Glusczak et al., 2007; Guilherme et al., 2012; Menezes et al., 2010; Modesto and Martinez, 2010a; Modesto and Martinez, 2010b; Sánchez et al., 2017; Sinhorin et al., 2014). Oxidative stress is generally detected at high, non-environmentally relevant doses of the active substance (Persch et al., 2017) (Sinhorin et al., 2014) but a significant increase in the catalase and superoxide dismutase activities, coupled with a concomitant decrease of glutathione stores, was recently reported in the brain of adult zebrafish exposed two weeks with 0.3 and 3 µgL⁻¹ of glyphosate (Faria et al., 2021). Our results on entire larvae confirmed a reduced catalase activity, enzyme involved in the first line of defense against reactive oxygen species (ROS) (Lushchak, 2015), in larvae transgenerationally exposed to glyphosate, Roundup, and Viaglif,

but also multigenerationally exposed to glyphosate. This phenomenon might be associated with epigenetic inherited regulations. Furthermore, the absence of increased TBARS levels, a commonly used biomarker of lipid peroxidation (Faria et al., 2021; Lushchak, 2015), could suggest that no excess ROS levels were generated by direct or generational contamination. The decrease in catalase activity could be an effect inherited from the contaminated F0 generation or a non-specific effect due to general modulation of metabolism. Since the TBARS assay may not be sensitive enough to reveal subtle oxidative damage (Ansarin et al., 2017; Marrocco et al., 2017) and was targeted on entire larvae and not on a specific tissue, further studies on the generation of oxidative stress associated with generational exposure might be useful.

A well-documented effect of glyphosate exposure is its impact on energetic metabolism (Kennedy, 2017). Detecting metabolic modification at the enzymatic levels could reveal a specific effect of glyphosate or its co-formulants at cellular or infra-cellular levels but could also be associated to more global physiological perturbations. In fact, metabolic trade-off are commonly observed during stress events (Sokolova, 2013). Chronic exposure of fish to glyphosate alone or co-formulated glyphosate induced changes in the expression of genes related to energetic metabolism, even at a concentration as low as $1 \mu\text{gL}^{-1}$ (Marchand et al., 2006; Webster and Santos, 2015). Fish exposures to GBHs were also reported to disrupt different biochemical parameters at concentrations ranging from $26.5 \mu\text{gL}^{-1}$ to 298mgL^{-1} (Ayanda et al., 2015; do Carmo Langiano and Martinez, 2008; Dey et al., 2016; Gholami-Seyedkolaei et al., 2013; Glusczak et al., 2011; Glusczak et al., 2006; Glusczak et al., 2007; Li et al., 2017; Li et al., 2016; Loro et al., 2015; Lushchak et al., 2009; Salbego et al., 2010). Our results indicate that aerobic metabolism, represented by the two key enzymes CCO and CS (Norin and Malte, 2012), was reduced in the case of transgenerational exposure to glyphosate and Viaglif, but also multigenerational exposure to glyphosate. While no change in the activity of LDH, an enzyme recognized as a good marker of anaerobic metabolism (Couture and Kumar, 2003), was observed, activation of anaerobic metabolism versus aerobic metabolism was revealed by a higher LDH:CS ratio in larvae exposed transgenerationally to glyphosate and Viaglif, and intergenerationally to glyphosate (Pimentel et al., 2019). The higher CS:CCO ratio detected could indicate mitochondrial dysfunction in F2 larvae exposed through the F0 generation to glyphosate (variation observed in transgenerational and multigenerational modes of exposure). The increase of this ratio could be hypothetically associated with higher anabolic demand of mitochondria (i.e. non-essential amino acids, nucleotides, and fatty acid biosynthesis) (Chang et al., 2019; Windisch et al., 2011). Several authors have shown that GBHs were able to affect mitochondrial function in isolated mitochondria (Peixoto, 2005), cells (Luo et al., 2017), and fish (Davico et al., 2021; Lopes et al., 2014; Pereira et al., 2018). More specifically, inhibition of CCO activity and mitochondrial impairments in the brain of zebrafish were reported after chronic direct exposure to $65 \mu\text{gL}^{-1}$ of a GBH (Pereira et al., 2018). Therefore, the increase in the CS:CCO ratio we observed could also indicate that CCO was more strongly affected than CS by epigenetic regulations inherited from the previous generations of rainbow trout. Analyses of metabolic parameters in our juvenile trout revealed that changes observed during early development were no longer found after several months of life. The only persistent effect was an impact of intergenerational exposure to glyphosate on the two enzymes of aerobic metabolism. No impact was observed on GPx, another enzyme involved in defense against ROS, suggesting that no excess oxidative stress was produced by chemical contamination (Lushchak, 2015).

Our fish were submitted to a viral challenge, a useful tool used to explore the potential toxicity of the different modes of chemical exposure on the immune system (Rehberger et al., 2017). The impact of glyphosate exposure on the ability to survive viral infections has not been well studied. Acute exposure of juvenile silver catfish to a GBH at the concentration of $730 \mu\text{gL}^{-1}$ induced changes in immune cell parameters and a higher susceptibility to a bacterial challenge with *A. hydrophila* (Kreutz et al., 2010). In our study, whereas transgenerational exposure did not alter survival following *IHNv* infection, significant impacts of

intergenerational exposure to glyphosate and Roundup and multigenerational exposure to Roundup were observed. Therefore, toxicity transmission resulting in greater susceptibility of juvenile rainbow trout to virus infection could be associated with an epigenetic variation transmitted from contaminated parents to their descendants, but lost from an F0 to an F2 generation. More likely, the intergenerational effect could result from direct contact at the germinal stage with the contaminants. As the effect of contaminants on energetic metabolism cannot be correlated with the higher susceptibility of exposed rainbow trout, other physiological impacts, such as immune toxicity must be involved. However, no differences in the blood cell counts after 96 of exposure were shown, when comparing the different chemical treatments. The only immuno-hematologic parameter analyzed that could explain this toxic effect was the proportion of highly seropositive fish. In fact, all the intergenerationally exposed fish presented a lower proportion of fish that had developed a strong anti-*IHNv* antibody response. As a result, the higher mortality related to viral infection observed for intergenerationally exposed fish could be associated with their inability to induce an effective antibody response. GBH exposure has been reported to modulate expression of immune-related genes (Li et al., 2019; Ma et al., 2015; Richard et al., 2014; Webster and Santos, 2015; Zheng et al., 2021) in fish, but also to disrupt the immune system (El-Gendy et al., 1998; Kreutz et al., 2011; Kreutz et al., 2010; Li et al., 2019; Ma et al., 2015; Ma and Li, 2015); however, concentrations tested were often higher than ours. At the same concentration we used (i.e. $1 \mu\text{gL}^{-1}$), deregulation of the immune gene *Fucolectin-1* was observed in European flounder (*Platichthys flesus*) after 30 days of exposure (Marchand et al., 2006). Therefore, further studies using a similar experimental design with generational exposure followed by a viral challenge, and integrating more specific immune biomarkers, are needed to investigate more in-depth the mechanisms involved in this higher susceptibility to viral infections.

5. Conclusions

Our complex experimental design was an efficient approach to investigate generational effects on rainbow trout exposed to an environmentally relevant concentration of both pure glyphosate and two GBHs. Although no impact was observed on certain reproductive parameters of the F1 generation, the early development of the F2 generation was affected by chemical exposure of previous generations, with effects observed on metabolism, biometrics, and swimming behavior. The intergenerational effects may be due to direct contact of the F2 organism with contaminants at the stage of germinal cells, while transgenerational effects could reflect epigenetic modifications inherited from the F0 generation. Biochemical parameters appeared to be restored as the fish develop. Intergenerational exposure to pure glyphosate drastically reduced the ability of rainbow trout to face a viral infection, potentially due to the inability of fish to elicit an efficient antibody response. Our results demonstrated that glyphosate exposure induced both inter and transgenerational toxicity, sometimes with different effects depending on the physiologic functions considered. GBHs, particularly during early development, seemed to occasionally modulate the effects of the active substance. Re-exposure to glyphosate (i.e. multigenerational exposure) did not increase the toxicity compared to inter or transgenerational exposures. These results need to be strengthened by integrating more specific parameters allowing for an in-depth investigation of the mechanisms of glyphosate toxicity, the relationship between the active substance and the co-formulants, and also toxicity inheritance through generations, which will be helpful to adopt future regulations for the use of glyphosate.

CRedit authorship contribution statement

Jessy Le Du-Carrée: Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization.

Rania Boukhari: Investigation. **Jérôme Cachot:** Investigation, Validation, Writing – review & editing. **Joëlle Cabon:** Investigation, Validation. **Lénaïg Louboutin:** Investigation, Validation. **Thierry Morin:** Validation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision. **Morgane Danion:** Validation, Writing – review & editing, Visualization, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Blood cells counts in juvenile rainbow trout

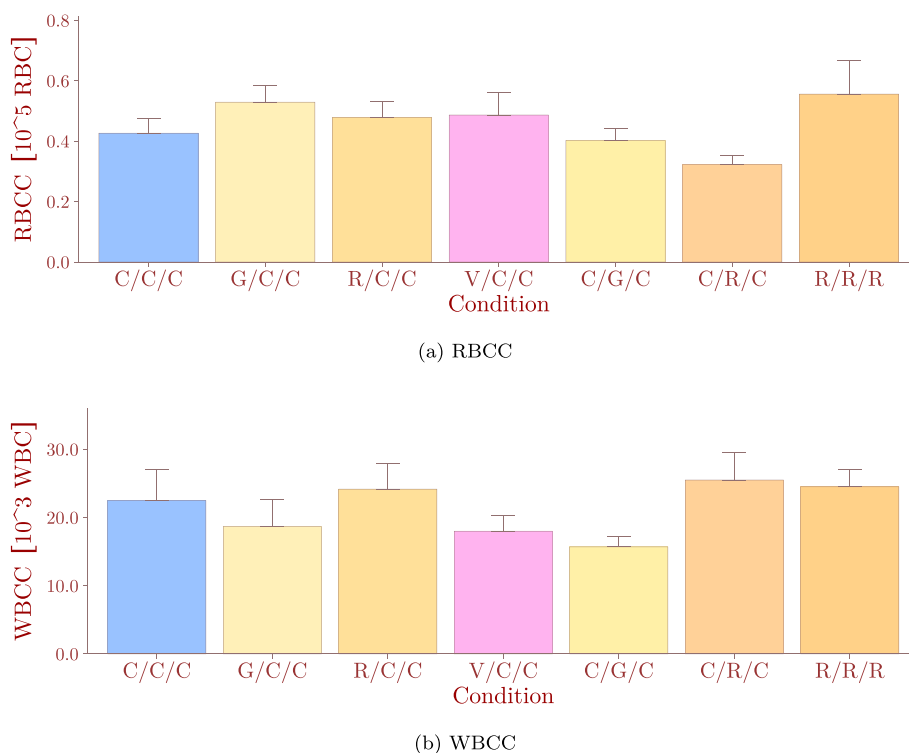


Fig. A.10. Barplot representing mean red blood cell count (RBCC) and mean white blood cell count (WBCC) as a function of exposure conditions (see Fig. 2) 96 h after the viral infection (S4). Standard errors are shown at the top of each bar ($12 \leq n \leq 13$).

Appendix B. Biochemical parameters in juvenile rainbow trout

Table B.6

Mean specific activities measured in gills of F2 juveniles (S4, see Fig. 1 for graphical illustration) for the different chemical conditions (see Fig. 2). Specific activities are expressed in of protein. Standard errors are given in parentheses under each respective mean ($11 \leq n \leq 20$). The numbers in bold with an asterisk are significantly different ($p < 0.05$) from the values obtained for the control condition.

Parameter	Mode of exposure						
	Control	Transgenerational			Intergenerational		Multigenerational
	C/C/C	G/C/C	R/C/C	V/C/C	C/G/C	C/R/C	R/R/R
CCO	1.7 (0.085)	1.8 (0.096)	1.62 (0.083)	1.66 (0.077)	2.11* (0.14)	1.95 (0.062)	1.71 (0.067)
CS	0.42 (0.018)	0.43 (0.014)	0.42 (0.015)	0.43 (0.021)	0.52* (0.026)	0.46 (0.011)	0.44 (0.016)
CS:CCO	0.25 (0.0084)	0.24 (0.0073)	0.26 (0.0085)	0.26 (0.0108)	0.26 (0.0119)	0.24 (0.0073)	0.26 (0.0139)
GPx	0.04 (0.004)	0.046 (0.0029)	0.038 (0.004)	0.045 (0.0035)	0.052 (0.006)	0.044 (0.0044)	0.042 (0.0041)
LDH	27.94 (1.08)	27.49 (1.57)	26.05 (1.07)	27.58 (1.1)	31.21 (1.31)	30.79 (1.09)	27.93 (0.87)
LDH:CS	64.9 (2.65)	66.24 (3.05)	61.67 (2.42)	65.44 (2.61)	61.14 (2.11)	67.36 (2.35)	64 (3.22)

References

- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.
- Ansarin, K., Khoubnasabjafari, M., Jouyban, A., 2017. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Biolimpacts* 5, 123–127. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.20>.
- Anses, 2019. Synthèse des données de surveillance - Appui scientifique et technique numéro 2017-04. Technical Report. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). https://www.anses.fr/fr/system/files/Fiche_PPV_Glyphosate.pdf.
- Armiliato, N., Ammar, D., Nezzi, L., Stralio, M., Muller, Y.M.R., Nazari, E.M., 2014. Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic Factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. *J. Toxic. Environ. Health A* 77, 405–414. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.880393>.
- Ayanda, I.O., 2018. Toxicity of sublethal concentrations of glyphosate and paraquat herbicide in the african catfish *Clarias gariepinus*. *Int. J. Agric. Biol.* 20. <https://doi.org/10.17957/ijab/15.0642>.
- Ayanda, O., Oniye, S., Auta, J., Ajibola, V., Bello, O., 2015. Responses of the african catfish *Clarias gariepinus* to long-term exposure to glyphosate- and paraquat-based herbicides. *Afr. J. Aquat. Sci.* 40, 261–267. <https://doi.org/10.2989/16085914.2015.1074882>.
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
- Best, C., Ikert, H., Kostyniuk, D.J., Craig, P.M., Navarro-Martin, L., Marandel, L., Mennigen, J.A., 2018. Epigenetics in teleost fish: from molecular mechanisms to physiological phenotypes. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 224, 210–244. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.006>.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 463, 33–51. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(00\)00004-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00004-1).
- Bobé, J., Andre, S., Fauconneau, B., 2000. Embryonic muscle development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a scanning electron microscopy and immunohistological study. *J. Exp. Zool.* 286, 379–389. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(20000301\)286:4<379::AID-JEZ6>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(20000301)286:4<379::AID-JEZ6>3.0.CO;2-2).
- Bouwmeester, M.C., Ruiter, S., Lommelaars, T., Sippel, J., Hodemaekers, H.M., van den Brandhof, E.J., Pennings, J.L., Kamstra, J.H., Jelinek, J., Issa, J.P.J., Legler, J., van der Ven, L.T., 2016. Zebrafish embryos as a screen for DNA methylation modifications after compound exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 291, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.012>.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M., 2015. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere* 135, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.042>.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J.B., Reolon, G.K., Bonan, C.D., 2017. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>.
- CA, H., Jr, V.A., AA, M., C, C.L., EG, P., A, B., CD, C., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>.
- Chang, C.H., Liu, Z.Z., Lee, T.H., 2019. Changes in hypothalamic stress-induced hepatic mitochondrial metabolic patterns between fresh water- and seawater-acclimated milkfish, *Chanos chanos*. *Sci. Rep.* 9, 18502. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55055-4>.
- Contreras-Sánchez, W.M., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S., Pereira, C.B., 1998. Effects of stress on the reproductive performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 58, 439–447. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.439>.
- Couture, P., Kumar, P.R., 2003. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.* 64, 107–120. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00028-6).
- Davico, C.E., Pereira, A.G., Nezzi, L., Jaramillo, M.L., de Melo, M.S., Müller, Y.M.R., Nazari, E.M., 2021. Reproductive toxicity of roundup wg® herbicide: impairments in ovarian follicles of model organism *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 15147–15159. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11527-z>.
- Dey, S., Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Kole, D., Ghosh, A.R., 2016. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel mera 71). *Emerging Contam.* 2, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>.
- do Carmo Langiano, V., Martinez, C.B., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 147, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>.
- Dorts, J., Falisse, E., Schoofs, E., Flamion, E., Kestemont, P., Silvestre, F., 2016. DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. *Sci. Rep.* 6, 34254. <https://doi.org/10.1038/srep34254>.
- Duke, S.O., 2020. Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Sci.* 68, 201–207. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.28>.
- Dunn, O.J., 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6, 241–252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>.
- Dunnett, C.W., 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* 50, 1096–1121. <https://doi.org/10.1080/01621459.1955.10501294>.
- EFSA, 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA J.* 13, 4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>.
- El-Gendy, K.S., Aly, N.M., El-Sebae, A.H., 1998. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of bolti fish (*Tilapia nilotica*). *J. Environ. Sci. Health B* 33, 135–149. <https://doi.org/10.1080/036012319809373135>.
- Fan, X., Hou, T., Jia, J., Tang, K., Wei, X., Wang, Z., 2020. Discrepant dose responses of bisphenol A on oxidative stress and DNA methylation in grass carp ovary cells. *Chemosphere* 248, 126110. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126110>.
- Faria, M., Wu, X., Luja-Mondragón, M., Prats, E., Gómez-Oliván, L.M., Piña, B., Raldúa, D., 2020. Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants. *Sci. Total Environ.* 714, 136759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759>.
- Faria, M., Bedrossiantz, J., Ramirez, J.R.R., Mayol, M., Garcia, G.H., Bellot, M., Prats, E., Garcia-Reyero, N., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L.M., Raldúa, D., 2021. Glyphosate targets fish monoaminergic systems leading to oxidative stress and anxiety. *Environ. Int.* 146, 106253. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106253>.
- Fijan, N., Sulimanovic, D., Bearzotti, M., Muzinic, D., Zwillenberg, L., Chilmonczyk, S., Vautherot, J., de Kinkelin, P., 1983. Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus Carpio*. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie* 134, 207–220. [https://doi.org/10.1016/s0769-2617\(83\)80060-4](https://doi.org/10.1016/s0769-2617(83)80060-4).
- Fiorino, E., Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Svobodova, Z., Faggio, C., 2018. Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus Carpio* and *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8542–8549. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1141-5>.
- Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 269–278. <https://doi.org/10.1007/BF01056243>.
- Forner-Piquer, I., Faucherre, A., Byram, J., Blaquierre, M., de Bock, F., Gamet-Payraastre, L., Ellero-Simatos, S., Audinat, E., Jopling, C., Marchi, N., 2021. Differential impact of dose-range glyphosate on locomotor behavior, neuronal activity, gliocerebrovascular structures, and transcript regulations in zebrafish larvae. *Chemosphere* 267, 128986. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128986>.
- Fuzinato, C.F., Flohr, L., Melegari, S.P., Matias, W.G., 2015. Oxidative stress and hypermethylation induced by exposure of *Oreochromis niloticus* to complex environmental mixtures of river water from Cubatão do sul, Brazil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.025>.
- Gavery, M.R., Nichols, K.M., Goetz, G.W., Middleton, M.A., Swanson, P., 2018. Characterization of genetic and epigenetic variation in sperm and red blood cells from adult hatchery and natural-origin steelhead, *Oncorhynchus mykiss*. *G3: Genes Genomes, Genetics* 8, 3723–3736. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200458>.
- Gholami-Seyedkolaei, S.J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Kosari, A.A., 2013. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus Carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.011>.
- Giaquinto, P.C., de Sá, M.B., Sugihara, V.S., Gonçalves, B.B., Delício, H.C., Barki, A., 2017. Effects of glyphosate-based herbicide sub-lethal concentrations on fish feeding behavior. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 98, 460–464. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2037-2>.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167. Springer, New York, pp. 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2.
- 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>.
- Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M.B., de Araújo Pedron, F., Duarte, M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>.
- Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 146, 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.004>.
- Glusczak, L., Loro, V.L., Pretto, A., Moraes, B.S., Raabe, A., Duarte, M.F., da Fonseca, M.B., de Menezes, C.C., de Sousa Valladão, D.M., 2011. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 624–630. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9652-4>.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M., Pacheco, M., 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 743, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>.
- Hanson, M.A., Skinner, M.K., 2016. Developmental origins of epigenetic transgenerational inheritance. *Environ. Epigenet.* 2, dvw002. <https://doi.org/10.1093/eep/dvw002>.
- Hutchinson, T., Shillabeer, N., Winter, M., Pickford, D., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.008>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05003255>.
- Ineris, 2020. Glyphosate et ses principaux composés. Technical Report. Verneuil-en-Halatte : Institut national de l'environnement industriel et des risques (Ineris) - 181229 - v2.0, 27/03/2020. https://www.inrs.fr/dms/ficheTox/FicheFicheTox/FICHETOX_273-1/FicheTox_273.pdf.
- Jin, J., Kurobe, T., Ramirez-Duarte, W.F., Bolotoalo, M.B., Lam, C.H., Pandey, P.K., Hung, T.C., Stillway, M.E., Zweig, L., Caudill, J., Lin, L., Teh, S.J., 2018. Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta smelt (*Hypomesus transpacificus*). *Aquat. Toxicol.* 197, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.019>.
- Jorgensen, P.E., Olesen, N.J., Lorenzen, N., Winton, J.R., Ristow, S.S., 1991. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization,

- immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Aquat. Anim. Health* 3, 100–108. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1991\)003<0100:IHNAV>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1991)003<0100:IHNAV>2.3.CO;2).
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480–483. <https://doi.org/10.1007/bf01863914>.
- Kekic, H., Ivanc, A., 1982. A new direct method for counting fish blood cells. *Ichthyologia* 14, 55–58.
- Kelly, D.W., Poulin, R., Tompkins, D.M., Townsend, C.R., 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J. Appl. Ecol.* 47, 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x>.
- Kennedy, C., 2017. Glyphosate fate and toxicity to fish with special relevance to salmon and steelhead populations in the Skeena River watershed. Technical Report. <https://www.semanticscholar.org/paper/Acute-toxicity-of-copper-hydroxide-and-glyphosate-Kingsley/7b16dc888bec16c942ac536e69e58740c5815e2>.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Marteninghe, A., dos Santos, E.D., Zanatta, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 694–697. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.003>.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., de Faria Valle, S., de Oliveira Silva, T., Anzilero, D., dos Santos, E.D., Pivato, M., Zanatta, R., 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.012>.
- Kubsad, D., Nilsson, E.E., King, S.E., Sadler-Riggelman, I., Beck, D., Skinner, M.K., 2019. Assessment of glyphosate induced epigenetic transgenerational inheritance of pathologies and sperm epimutations: generational toxicology. *Sci. Rep.* 9, 6372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>.
- Lanzarini, G.A., Félix, L.M., Santos, D., Venâncio, C.A., Monteiro, S.M., 2019. Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation – Roundup® UltraMax – on the early zebrafish embryogenesis. *Chemosphere* 223, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.071>.
- Le Du-Carrée, J., Saliou, F., Cachot, J., Morin, T., Danion, M., 2021. Developmental effect of parental or direct chronic exposure to environmental concentration of glyphosate on the larvae of rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 237, 105894. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105894>.
- Le Du-Carrée, J., Morin, T., Danion, M., 2021. Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides. *Aquat. Toxicol.* 230, 105687. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105687>.
- Li, M.H., Xu, H.D., Liu, Y., Chen, T., Jiang, L., Fu, Y.H., Wang, J.S., 2016. Multi-tissue metabolic responses of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to glyphosate-based herbicide. *Toxicol. Res.* 5, 1039–1052. <https://doi.org/10.1039/c6tx00011h>.
- Li, M.H., Ruan, L.Y., Zhou, J.W., Fu, Y.H., Jiang, L., Zhao, H., Wang, J.S., 2017. Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat. Toxicol.* 188, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.004>.
- Li, Y., Ding, W., Li, X., 2019. Acute exposure of glyphosate-based herbicide induced damages on common carp organs via heat shock proteins-related immune response and oxidative stress. *Toxin Rev.*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1621903>.
- Lopes, F.M., Junior, A.S.V., Corcini, C.D., da Silva, A.C., Guazzelli, V.G., Tavares, G., da Rosa, C.E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 155, 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.006>.
- Loro, V.L., Glusczak, L., Moraes, B.S., Leal, C.A.M., Menezes, C., Murussi, C.R., Leitemperger, J., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., 2015. Glyphosate-based Herbicide Affects Biochemical Parameters in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824 and) *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140082>.
- Louboutin, L., Cabon, J., Vigouroux, E., Morin, T., Danion, M., 2021. Comparative analysis of the course of infection and the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with the 5 genotypes of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virology* 552, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.09.003>.
- Luo, L., Wang, F., Zhang, Y., Zeng, M., Zhong, C., Xiao, F., 2017. In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. *J. Environ. Sci. Health B* 52, 410–417. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1293449>.
- Lushchak, V.I., 2015. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 711–747. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932–937. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>.
- Ma, J., Li, X., 2015. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere* 128, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>.
- Ma, J., Bu, Y., Li, X., 2015. Immunological and histopathological responses of the kidney of common carp (*Cyprinus Carpio* L.) sublethally exposed to glyphosate. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.004>.
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E., Laroche, J., 2006. Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the european flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Mar. Biotechnol.* 8, 275–294. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3>.
- Marrocco, I., Altieri, F., Peluso, I., 2017. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2017, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>.
- Menezes, C.C., Fonseca, M.B., Loro, V.L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A., Morsch, V.M., 2010. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 665–671. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9574-6>.
- Mesnage, R., Antoniou, M.N., 2018. Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Front. Public Health* 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>.
- Milner-Gulland, E.J., 2012. Interactions between human behaviour and ecological systems. *Philos. Trans. R. Soc. B* 367, 270–278. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0175>.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B., 2010. Effects of roundup transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781–787. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.005>.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>.
- Munday, P.L., 2014. Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. *F1000Prime Reports* 6, 1–7. <https://doi.org/10.12703/p6-99>.
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health* 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>.
- Nikolakakis, S., Bossier, P., Kanlis, G., Dierckens, K., Adriaens, D., 2014. Protocol for quantitative shape analysis of deformities in early larval european seabass *Dicentrarchus labrax*. *J. Fish Biol.* 84, 206–224. <https://doi.org/10.1111/jfb.12284>.
- Norin, T., Malte, H., 2012. Intraspecific variation in aerobic metabolic rate of fish: relations with organ size and enzyme activity in Brown trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 85, 645–656. <https://doi.org/10.1086/665982>.
- OECD, 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD Environment Health and Safety Publications. 54.
- Peillex, C., Pelletier, M., 2020. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J. Immunotoxicol.* 17, 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691x.2020.1804492>.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044>.
- Pereira, A.G., Jaramillo, M.L., Remor, A.P., Latini, A., Davico, C.E., da Silva, M.L., Müller, Y.M., Ammar, D., Nazari, E.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075>.
- Persch, T.S.P., Weimer, R.N., Freitas, B.S., Oliveira, G.T., 2017. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere* 174, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.092>.
- Pimentel, M.S., Faleiro, F., Machado, J., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., 2019. Seabream larval physiology under ocean warming and acidification. *Fishes* 5, 1. <https://doi.org/10.3390/fishes5010001>.
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., Baumann, L., 2017. 20 years of fish immunotoxicology - what we know and where we are. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 516–542. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024>.
- Richard, S., Prévot-D'Alvise, N., Bunet, R., Simide, R., Couvray, S., Coupé, S., Grillas, J.P., 2014. Effect of a glyphosate-based herbicide on gene expressions of the cytokines interleukin-1 and interleukin-10 and of heme oxygenase-1 in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 294–299. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1180-7>.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes, C.C., Lazzari, R., Neto, J.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 740–745. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9464-y>.
- Sánchez, J.A.A., Varela, A.S., Corcini, C.D., da Silva, J.C., Primel, E.G., Caldas, S., Klein, R.D., Martins, C.D.M.G., 2017. Effects of roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere* 177, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.147>.
- Shaw, J.L., Judy, J.D., Kumar, A., Bertsch, P., Wang, M.B., Kirby, J.K., 2017. Incorporating transgenerational epigenetic inheritance into ecological risk assessment frameworks. *Environ. Sci. Technol.* 51, 9433–9445. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01094>.
- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., dos Santos Teixeira, J.M., Milési, K.M.L., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Kawashita, N.H., Baviera, A.M., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposure to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish *Surubim* (*Pseudoplatystoma* sp.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.040>.
- Smith, C.M., Vera, M.K., Bhandari, R.K., 2019. Developmental and epigenetic effects of roundup and glyphosate exposure on japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 210, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005>.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anzilero, D., Lima, M., da Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female *Jundiá* (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.008>.
- Stenz, L., Schechter, D.S., Serpa, S.R., Paoloni-Giacobino, A., 2018. Intergenerational transmission of DNA methylation signatures associated with early life stress. *Curr. Genomics* 19, 665–675. <https://doi.org/10.2174/1389202919666171229145656>.

- Székács, A., Darvas, B., 2018. Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Front. Environ. Sci.* 6, 78. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00078>.
- Therneau, T.M., 2015. *A Package for Survival Analysis in R*.
- Udeigwe, T.K., Teboh, J.M., Eze, P.N., Stietiya, M.H., Kumar, V., Hendrix, J., Mascagni, H.J., Ying, T., Kandakji, T., 2015. Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. *J. Environ. Manag.* 151, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.11.024>.
- Vandenberg, L.N., Blumberg, B., Antoniou, M.N., Benbrook, C.M., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Myers, J.P., 2017. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J. Epidemiol. Community Health* 71, 613–618. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>.
- Webster, T.M.U., Santos, E.M., 2015. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and roundup. *BMC Genomics* 16, 32. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>.
- Webster, T.M.U., 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>.
- Weeks Santos, S., Cormier, B., Mazzella, N., Bonnaud, B., Morin, S., Clérandeau, C., Morin, B., Cachot, J., 2019. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 216, 105291. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291>.
- Welch, B.Y.B.L., 2012. *Biometrika trust. Biometrika* 38, 330–336.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.
- Wilcox, R., 2016. *Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing*. Elsevier LTD, Oxford. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804733-0.00010-X>.
- Windisch, H.S., Kathöfer, R., Pörtner, H.O., Frickenhaus, S., Lucassen, M., 2011. Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 301, R1453–R1466. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00158.2011>.
- Xinwen, Z., Guonian, Z.J.M., Jinhe, S., 2001. Influence of Cu, Zn, Pb, Cd and their heavy metal mixture on the DNA methylation level of the fish (*Carassius auratus*). *Zhongguo Huanjing Kexue* 21, 549–552.
- Zebal, Y.D., Costa, P.G., de Castro Knopp, B., Lansini, L.R., Zafalon-Silva, B., Bianchini, A., Robaldo, R.B., 2017. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. *Chemosphere* 185, 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.069>.
- Zebal, Y.D., Lansini, L.R., Costa, P.G., Roza, M., Bianchini, A., Robaldo, R.B., 2018. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. *Chemosphere* 196, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.196>.
- Zhang, S., Xu, J., Kuang, X., Li, S., Li, X., Chen, D., Zhao, X., Feng, X., 2017. Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 181, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.094>.
- Zheng, T., Jia, R., Cao, L., Du, J., Gu, Z., He, Q., Xu, P., Yin, G., 2021. Effects of chronic glyphosate exposure on antioxidative status, metabolism and immune response in tilapia (gift, *Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 239, 108878. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108878>.

Chapitre 6

Discussion générale

*« Si vous ne pouvez être des saints
de la connaissance, soyez-en au
moins les guerriers. »*

Friedrich Nietzsche

Une littérature fournie sur le glyphosate, mais présentant certains manques

L'apport des connaissances résumées dans la revue bibliographique du chapitre 1 a permis de mettre en lumière une évidente toxicité du glyphosate seul ou co-formulé chez les poissons téléostéens. En revanche, une majorité d'études se sont concentrées uniquement sur les formulations commerciales (c.-à-d. les GBHs), ne prenant pas en considération la substance active seule, limitant de fait toutes comparaisons. En conséquence, la modulation des effets toxiques du glyphosate par les co-formulants présents dans les GBHs reste donc mal définie. Dans certains cas, aucune modification n'est observée alors que dans d'autres, la modulation engendrée par les co-formulants augmente ou diminue les effets de la substance active [FOLMAR et collab., 1979; ROY et collab., 2016; SMITH et collab., 2019]. Un autre élément est que la plupart des études considèrent des doses de substance active élevées, peu représentatives de la réalité environnementale. Ce qui pousse les auteurs à considérer uniquement de fortes doses de glyphosate, mais également à cibler préférentiellement des co-formulations plutôt que la substance active, n'est pas connu. Ce phénomène pourrait résulter en partie de la pression associée à une demande de valorisation rapide et de qualité des résultats scientifiques, qui complique la publication de résultats non ou moins significatifs qui pourraient être la conséquence de l'utilisation de doses plus faibles. Les auteurs, désireux de maximiser les effets observés, vont alors utiliser de fortes doses de solutions commerciales, au risque de perdre en pertinence environnementale et de rendre particulièrement difficile l'évaluation du risque écotoxicologique associé au glyphosate. Toutefois, certaines études montrent des effets toxiques à des doses plus proches de celles retrouvées dans l'environnement [AYANDA et collab., 2015; FARIA et collab., 2020; MARCHAND et collab., 2006]. Par contre, dans ces cas, les effets observés à de bas niveaux d'organi-

sations biologiques (p. ex. modification de paramètres biochimiques) ont rarement été corrélés à la perturbation de la physiologie globale de l'organisme, voire de sa biologie. Il est donc pour l'instant difficile de définir un mode d'action (MoA) du glyphosate, ce qui représente un frein à la gestion du risque environnemental associé à ce dernier [ASHAUER et JAGER, 2018]. Cette difficulté est d'autant plus accrue que les MoAs identifiés pour de fortes doses pourraient être différents de ceux impactant les organismes aux doses rencontrées dans l'environnement. La toxicité du glyphosate et des GBHs varie également grandement en fonction de différents paramètres biotiques et abiotiques comme l'espèce considérée, le stade de vie ou les conditions expérimentales [FIORINO et collab., 2018; FOLMAR et collab., 1979]. Il est intéressant de noter que certains auteurs ont observé que de faibles doses de substance active engendraient parfois de plus grands effets que des doses supérieures (c.-à-d. une dose-réponse non monotone était retrouvée) [SMITH et collab., 2019; VANDENBERG et collab., 2017]. Ce type de réponse était particulièrement mise en évidence lors des études comportementales [BRIDI et collab., 2017; FARIA et collab., 2020; ZHANG et collab., 2017]. Ceci renforce la nécessité de considérer de faibles doses de substance active car les effets de ces dernières, potentiellement plus marqués que ceux associés à des concentrations médianes, peuvent alors être démontrés. Enfin, tandis que de rares études rapportent que le glyphosate a la capacité de transmettre sa toxicité aux générations venant après celle directement exposée [KUBSAD et collab., 2019; SMITH et collab., 2019; WEBSTER et collab., 2014], les connaissances concernant les effets induits sont peu disponibles, particulièrement chez les poissons. La revue de la bibliographie présentée dans ce document a donc permis de mettre en évidence l'importance de réaliser des études incluant à la fois la substance active seule et les GBHs, tout en possédant des dispositifs expérimentaux permettant de refléter au mieux les conditions du milieu naturel, y compris le caractère générationnel de la contamination chimique.

Des truites exposées à une dose élevée de glyphosate face à un stress multiple

Une des études de la présente thèse s'est concentrée sur l'impact d'une exposition aiguë chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, à une dose non létale de glyphosate ou d'herbicides à base de glyphosate. Ce type d'exposition avait été considéré dans un premier lieu pour obtenir un point de comparaison entre la toxicité aiguë du glyphosate et celle retrouvée lors des expositions chroniques qu'il était prévu de réaliser. Un autre objectif de cette étude était de maximiser la réponse des truites en ciblant une dose 500 fois supérieure à celle utilisée lors des expositions chroniques et ainsi pouvoir valider une partie des outils expérimentaux (p. ex. paramètres biochimiques, challenge viral) qui allaient être utilisés dans la thèse. Cette exposition aiguë a permis de mettre en évidence qu'une dose de substance active sublétale, bien que supérieure à celles communément retrouvées en France dans l'environnement aquatique, induisait peu de perturbations physiologiques à l'issue d'une unique et courte période de contamination chimique. En revanche, quand les truites précédemment exposées chimiquement ont subi une infection virale, de nouvelles perturbations liées aux traitements chimiques ont été révélées. En premier lieu, il faut préciser que la contamination chimique n'a pas in-

duit de différence dans la capacité des truites à survivre à l'infection virale (c.-à-d. les taux de survie étaient similaires). Ce résultat vient en divergence des deux travaux constituant la seule base de référence traitant de l'association d'une contamination au glyphosate et d'une infection par des pathogènes. En effet, [KREUTZ et collab. \[2010\]](#) et [KELLY et collab. \[2010\]](#) avaient mesuré de plus fortes mortalités quand les poissons étaient à la fois exposés à un [GBH](#) à des doses respectives de glyphosate de $0,73 \text{ mgL}^{-1}$ ou $0,36 \text{ mgL}^{-1}$ et infectés par une bactérie ou un parasite. Par contre, dans notre étude, une fois en situation de stress multiples (c.-à-d. stress chimique et infectieux), les paramètres métaboliques qui n'avaient pas été modifiés par une contamination chimique simple ont présenté des variations laissant penser que le glyphosate seul ou co-formulé était capable de générer une perturbation physiologique chez les animaux. Cette toxicité a probablement été bien prise en charge par les poissons dans le cas d'un niveau de stress modéré (c.-à-d. une contamination chimique simple), mais s'est révélée plus complexe à maîtriser dans un contexte de stress multiples. Toutefois, une augmentation du ratio moyen des activités enzymatiques [CS : CCO](#) chez les truites exposées au Roundup avant l'infection virale suggère qu'il pourrait survenir une perturbation de la production d'énergie au niveau de la membrane mitochondriale, comme l'avait également montré [PEREIRA et collab. \[2018\]](#), chez des poissons exposés à une co-formulation de glyphosate. Lorsque, dans le cadre de stress multiples, l'organisme des poissons est plus sollicité, la toxicité du glyphosate, en association ou non avec celle des co-formulants, induirait probablement différentes stratégies vis-à-vis de l'utilisation des ressources énergétiques (p. ex. allocation de l'énergie, utilisation des filières énergétiques). Plusieurs paramètres biochimiques mesurés, notamment liés à la bioénergétique, ont présenté des variations associées aux différents traitements chimiques. L'effet des stressseurs environnementaux sur la bioénergétique est reconnu comme étant l'une des composantes majeures permettant la compréhension de leurs impacts sur les populations naturelles [[SOKOLOVA, 2013](#)]. Peu d'études ont pourtant considéré la bioénergétique pour interpréter l'effet de contaminants chimiques sur la capacité de résistance des poissons infectés par des pathogènes. Cette composante n'a d'ailleurs pas été prise en compte dans les deux seules études existantes associant un challenge infectieux et une contamination au glyphosate [KELLY et collab. \[2010\]](#); [KREUTZ et collab. \[2010\]](#). Dans le cas d'un challenge bactérien, la diminution de la survie induite par la contamination chimique a pu toutefois être associée à un impact sur certains paramètres hémato-immunologiques [[KREUTZ et collab., 2010](#)]. La revue de la littérature présentée dans cette thèse indique que le glyphosate possède la capacité d'influencer certains paramètres immunologiques [[FÉLIX et SARADHAMANI, 2015](#); [KONDERA et collab., 2018](#); [MARCHAND et collab., 2006](#)], mais les études n'associent pas systématiquement ces changements chez les poissons à des conséquences négatives à l'échelle de l'organisme telles qu'une hypersensibilité face aux pathogènes. Quoiqu'il en soit, la réalisation de cette expérience d'exposition aiguë au cours de la thèse a permis de démontrer que ce type de contamination pouvait impacter la physiologie des truites et que les challenges viraux représentaient un outil pertinent pour mettre en évidence une toxicité qui aurait pu rester muette en l'absence d'un stress additionnel. Les marqueurs du métabolisme énergétique utilisés se sont révélés être adaptés à la détection d'une perturbation au niveau de la bioénergétique des poissons et ont ainsi pu être intégrés aux études portant sur la toxicité chronique de l'herbicide. Cette expérimentation a également permis de révéler la nécessité d'intégrer, à

la suite de l'infection virale, des marqueurs plus spécifiques de l'immunité afin de permettre la différenciation des effets purement immunotoxiques d'autres effets plus globaux tels que la perturbation de la bioénergétique, les deux pouvant être à l'origine d'une sensibilité accrue des poissons face aux pathogènes.

Un impact modéré de la contamination chronique au glyphosate à faible dose chez des truites adultes

Une des études majeures du projet glyphoTAC comportait la contamination directe de truites génitrices adultes avec une dose environnementalement pertinente de glyphosate et de deux GBHs pendant 10 mois. Cette expérience a permis, dans un premier temps, de définir la sensibilité à l'âge adulte des truites au glyphosate, mais également d'identifier des paramètres permettant de prédire un impact de la contamination sur les générations futures. Comme lors de l'exposition aiguë, la toxicité directe du glyphosate et des deux GBHs s'est avérée être modérée et seuls certains paramètres hémato-immunologiques ont été impactés. Le suivi des marqueurs du métabolisme énergétique n'a révélé qu'aucune perturbation de la bioénergétique n'était engendrée par la contamination. La concentration de $1 \mu\text{gL}^{-1}$ était donc probablement trop faible pour induire des effets toxiques qui ne pouvaient être pris en charge efficacement par l'organisme des truites. En conséquence, aucun effet reprotoxique n'a été détecté. Ce résultat est cohérent au regard de la plus forte concentration induisant un effet sur la croissance de la truites arc-en-ciel rapportée dans le dossier de l'EFSA, qui était de $9,6 \text{ mgL}^{-1}$ [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015]. En revanche, comme l'indiquaient certains auteurs, même en l'absence d'effets négatifs sur les paramètres reproductifs des géniteurs, une toxicité pouvait être attendue chez les générations futures [SMITH et collab., 2019], ce qui renforçait d'autant plus la volonté d'investiguer les effets inter, trans et multigénérationnels transmis aux descendances F1 et F2. Une des limites détectées au niveau du plan expérimental de cette étude a été le manque de répliquas de bassins contenant les poissons. Cette faiblesse pourrait être responsable de biais liés à un "effet bac", pouvant par exemple engendrer des comportements sociaux différents au sein de chaque bac et ainsi impacter la physiologie des poissons indépendamment de la contamination chimique. L'absence de répliquas peut limiter la discrimination de tels effets par rapport à ceux liés aux différents traitements chimiques. Ce biais expérimental, inhérent à l'expérience, était connu avant de réaliser la manipulation, car certains paramètres méthodologiques (p. ex. espace, temps) ne permettaient pas de s'en prémunir. Différents moyens ont, de fait, été mis en place pour maximiser la robustesse de l'analyse telle qu'une vigilance accrue à maintenir des conditions identiques dans chacun des bacs de l'étude (p. ex. nourriture, température, oxygénation) ainsi que l'utilisation d'un nombre élevé d'individus par bac ($n=12$), permettant de privilégier l'identification de la variabilité inter-individuelle plutôt qu'inter-bac. De plus, les résultats obtenus ont été discutés en prenant en compte ce biais potentiel et les futures études utilisant les générations issues des poissons élevés dans ce même dispositif le seront également.

Des effets toxiques apparaissant chez la génération F1

La toxicité d'une exposition chronique au glyphosate et à ses co-formulants a été considérée au niveau de la génération F1. L'objectif associé à cette étude était d'identifier la possibilité de transmission de la toxicité d'une génération F0 exposée directement au glyphosate à la descendance. La recontamination de la génération F1 aux contaminants parentaux a aussi été prise en considération afin de mieux refléter le milieu naturel (c.-à-d. l'effet multigénérationnel). Ni la contamination des parents ni la contamination de la descendance n'ont induit une augmentation de la mortalité chez les truites F1. En revanche, la contamination directe a généré une modification de certains paramètres biométriques indiquant principalement une réduction de la croissance de la tête indépendamment de la présence des co-formulants. Un impact de l'exposition au glyphosate sur le développement de la tête et des organes associés avait déjà été rapporté chez différentes espèces de poissons par d'autres auteurs, à des concentrations comprises entre $8,5 \mu\text{gL}^{-1}$ et 400mgL^{-1} [LANZARIN et collab., 2019; WEEKS SANTOS et collab., 2019; ZHANG et collab., 2017]. Ces travaux, réalisés en expositions directes, indiquaient une réduction de la croissance du corps et de celle de la tête [LANZARIN et collab., 2019; ZHANG et collab., 2017] tandis que WEEKS SANTOS et collab. [2019] retrouvaient une réduction de la croissance de la tête seule, comme l'a confirmé l'exposition directe prise en compte dans notre étude. Par contre, lorsque dans notre étude l'exposition intergénérationnelle était considérée, les mêmes effets n'étaient pas observés. Dans le cas de l'étude du comportement, en revanche, les larves exposées par l'intermédiaire de leurs parents ont également démontré un comportement natatoire modifié laissant présager une vulnérabilité potentielle de ces dernières face aux prédateurs. Des effets similaires d'une contamination directe peuvent être retrouvés chez certaines espèces de poissons [WEEKS SANTOS et collab., 2019; ZHANG et collab., 2017], mais chez *O. mykiss*, seules des concentrations plus fortes semblaient être actives (effet détecté à 1, mais pas à $0,1 \text{mgL}^{-1}$), laissant donc penser que l'effet intergénérationnel présentait un potentiel toxique plus important. Quel que soit le mode de contamination des truites ou le contaminant considéré, peu de changements ont été détectés au niveau des paramètres enzymatiques mesurés. Toutefois, une augmentation du ratio moyen $\text{CS} : \text{CCO}$ a été mise en évidence chez les truites exposées à une contamination multigénérationnelle au Roundup. Cette augmentation, pouvant indiquer une perturbation de la production de l'énergie au niveau de la membrane mitochondriale, a également été observée chez les truites exposées directement pendant 96 h à $0,5 \text{mgL}^{-1}$ de Roundup dans l'étude précédente (F0). Ce type de résultat a été reporté dans la littérature au niveau de la mitochondrie, de la cellule ou sur une autre espèce de poisson [LUO et collab., 2017; PEIXOTO, 2005; PEREIRA et collab., 2018]. Bien que ces données ne permettent pas de mettre en évidence une synergie entre l'exposition directe et intergénérationnelle, expliquant un effet supérieur de la contamination multigénérationnelle, ce résultat laisse penser que le Roundup, de par l'effet d'un ou de plusieurs de ses co-formulants et en association ou non avec la SA, induirait une perturbation au niveau de l'enzyme CCO, dernier accepteur d'électron de la chaîne respiratoire [CRAIG et collab., 2007]. Ce phénomène pourrait expliquer la part plus importante de l'apport du métabolisme anaérobie dans la production totale d'énergie (témoignée par une augmentation du ratio $\text{LDH} : \text{CS}$) chez les larves exposées au Roundup au travers de leurs parents,

mais aussi dans le cas d'une recontamination à la formulation parentale. L'absence d'effet au niveau de l'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme qui a pourtant été suggérée par de nombreux auteurs comme une cible moléculaire du glyphosate [CATTANEO et collab., 2011; MENÉNDEZ-HELMAN et collab., 2011], indique qu'un autre mode d'action doit probablement exister pour expliquer les effets observés, notamment au niveau du comportement. Une des pistes d'améliorations identifiées au terme de cette étude est la mesure de plusieurs paramètres à différents niveaux d'intégration biologique chez les mêmes individus. Ainsi, après avoir mesuré à l'échelle de l'individu des marqueurs comme le comportement de nage, une mesure à des niveaux enzymatiques ou transcriptomiques de marqueurs liés au métabolisme énergétique ou à l'acétylcholinestérase seraient intéressants à effectuer. Cela permettrait de corrélérer plus précisément les changements physiologiques avec les effets à de plus hauts niveaux d'intégration biologique (p. ex. comportement, vitesse de nage, immunité).

Suite à l'exploration de l'effet de ces différents modes de contamination sur le développement embryon-larvaire, l'étude sur la génération F1 a consisté à évaluer l'impact de la contamination intergénérationnelle sur l'immunité de truites juvéniles soumises à une épreuve virale expérimentale. Après quelques mois de développement, les juvéniles issus de parents contaminés au glyphosate ne présentaient, au vu des marqueurs biochimiques mesurés, aucune différence physiologique induite par la contamination parentale. Pourtant, l'épreuve virale a permis de mettre en évidence une modulation de la capacité de défense face au virus des truites exposées aux deux formulations commerciales. Une survie accrue a été observée pour la condition Roundup, tandis qu'une plus forte mortalité a été induite avec la condition Viaglif. Ce résultat suggère que tout ou partie des co-formulants présents dans les deux GBHs sont soit capables de moduler directement l'effet global du produit, soit d'interagir avec le glyphosate pour en modifier les effets. Ce résultat montrant un effet de l'exposition chimique des truites sur leur susceptibilité à un virus diffère de celui obtenu dans l'étude de la génération F0_2018 décrite au début de ce chapitre. Ceci indique que soit le stade de vie plus précoce des truites lors du challenge de la génération F1_2018 était plus sensible, soit que la contamination chronique intergénérationnelle présente un potentiel toxique plus important que l'exposition aiguë; et ce malgré une dose d'exposition 500 fois inférieure. L'élément intéressant est que pour les deux GBHs choisis dans ce travail, les effets observés ont été opposés, avec le Roundup et le Viaglif qui ont, respectivement, augmenté et diminué la sensibilité des truites face au *vNHI*. Une susceptibilité accrue de poissons juvéniles face à des pathogènes avait déjà été rapportée [KELLY et collab., 2010; KREUTZ et collab., 2010], mais aucune publication ne mentionne une diminution de la sensibilité face à des pathogènes de poissons exposés au glyphosate. Dans leur revue de la littérature sur l'immunoécotoxicité chez le poisson, REHBERGER et collab. [2017] indiquent néanmoins que dans 17% des études considérant le challenge à des pathogènes de poissons exposés à différents contaminants, une diminution de la susceptibilité était observée. Dans notre étude, malgré une diminution du taux d'une des deux cytokines mesurées dans la rate des truites exposées au glyphosate, l'interleukine-1 β , aucun des paramètres hémato-immunologiques caractérisés après l'infection n'a pu être corrélé aux différences de susceptibilité observées face au virus en fonction du traitement chimique des parents. En conséquence, l'une des améliorations possibles de cette étude serait la prise en compte d'un plus grand nombre de paramètres immunologiques permettant d'identifier les causes de la toxicité du

glyphosate observée au niveau de l'individu. Une approche sans *a priori*, comme le séquençage ARN (RNAseq), effectué au niveau de la génération F1, permettrait d'apporter des éléments d'identification des principales fonctions physiologiques affectées par la contamination chimique de la génération précédente, et ainsi d'ouvrir de futurs axes de recherche.

En conclusion, cette étude portant sur la génération F1 a permis de mettre en évidence des effets des contaminations directe et intergénérationnelle des truites, mais aussi de la re-contamination aux composés parentaux (c.-à-d. des effets multigénérationnels), sur le développement embryo-larvaire. Un impact de la contamination intergénérationnelle sur le comportement larvaire et sur les défenses immunitaires au stade juvénile, indiquant une persistance des effets transmis au travers de la génération parentale, a également été démontré. Toutefois, une des caractéristiques de ce dernier mode de contamination chimique est l'exposition directe au stade de cellule germinale de la génération F1 dans l'organisme des parents [STENZ et collab., 2018]. Avant donc de pouvoir conclure sur l'existence de mécanismes d'hérédité non génétiques de la toxicité du glyphosate et des co-formulations associées, une étude sur une génération F2 issue d'une contamination transgénérationnelle était nécessaire afin que les organismes considérés n'aient jamais été exposés de façon directe aux contaminants étudiés [BLANC et collab., 2020].

Un impact transgénérationnel de la contamination au glyphosate chez la génération F2

L'étude de la toxicité induite par le glyphosate sur une génération F2 de truites arc-en-ciel exposées directement, mais aussi au travers de plusieurs générations antérieures a constitué l'élément novateur majeur du projet GlyphoTAC. Cette étude avait pour principal objectif d'évaluer l'impact transgénérationnel du glyphosate et de ses co-formulants, et de le comparer à l'impact observé dans le cas d'une exposition intergénérationnelle et ainsi pouvoir mettre en cause des mécanismes non génétiques de la transmission de la toxicité tels que les modifications épigénétiques. Dans le but de confirmer les résultats sur la génération F1 obtenus dans l'étude précédente, la contamination parentale a aussi été considérée dans cette étude. Enfin, afin de représenter au mieux le milieu naturel, la contamination de l'ensemble des générations de la F0 jusqu'à la F2 (c.-à-d. l'exposition multigénérationnelle) a également été prise en considération.

Cette étude a tout d'abord montré que les paramètres reproductifs de la F1 exposée directement aux contaminants n'étaient pas sensiblement affectés, confirmant ainsi les résultats obtenus pour la génération F0. Ensuite, comme dans le cas de l'exposition directe, aucun effet intergénérationnel n'a été détecté sur la reproduction de la F1_2017 ayant donné naissance aux truites F2 transgénérationnellement exposées. Ainsi, le glyphosate, qu'il soit co-formulé ou non, ne semble affecter ni la fécondité ni la fertilité des géniteurs de truites arc-en-ciel à la concentration de $1 \mu\text{gL}^{-1}$. Certains auteurs, qui ont considéré plus de trois générations successives d'une espèce de rongeur, ont observé l'apparition d'effets sur la génération F3 [KUBSAD et collab., 2019]. Étant donné que le projet glyphoTAC était ciblé sur les générations F0 à F2, ce qui a déjà représenté une charge de travail importante, les effets

transgénérationnels du glyphosate sur les paramètres reproductifs n'ont pu être évalués que jusqu'à la génération F1 et d'autres études, considérant éventuellement des espèces au temps de génération plus court, sont requises pour analyser les potentiels effets sur des générations ultérieures. En effet, des modifications phénotypiques liées à certains contaminants environnementaux, et pouvant être associés à des mécanismes transgénérationnels, ont déjà été mis en évidence, par exemple avec les espèces *Menidia beryllina* [MAJOR et collab., 2020] ou *Danio rerio* [KAMSTRA et collab., 2017].

Le développement embryo-larvaire de la génération F2 a ensuite été caractérisé. Aucune augmentation significative du taux de malformations n'a été induite, quel que soit le mode d'exposition ou le contaminant considéré. Cependant, une perturbation de certains paramètres biométriques liés au développement de la tête a été mesurée pour les expositions inter et transgénérationnelles à la substance active seule. Ces résultats, dans le cas de l'exposition intergénérationnelle, n'avaient pas été observés lors de l'étude sur la F1_2018. Toutefois, les différences étant inférieures à 10% en comparaison des larves non-exposées et tous les indices biométriques liés à la croissance de la tête n'étant pas systématiquement perturbés, ces résultats doivent être confirmés par d'autres études corrélant, si possible, l'impact des perturbations biométriques sur la biologie des poissons. À ce niveau, SMITH et collab. [2019] ont mis en évidence un effet du glyphosate, qu'il soit co-formulé ou non, sur la descendance F1 de parents contaminés à $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ durant 15 jours.

À l'identique de la F1, des effets comportementaux ont été détectés chez la génération F2. En revanche, aucune augmentation de l'activité de nage dans les phases de lumière n'a été observée, quelle que soit la condition d'exposition considérée. Il s'agit là d'une différence majeure avec les résultats obtenus pour la F1 contaminée intergénérationnellement. Potentiellement, cette différence pourrait être expliquée par le stade de développement auquel ont été faites les mesures comportementales sur la F1 et la F2 (855 vs 615 degrés-jours, respectivement). Les larves de la F2 étant moins développées que celles de la F1 lors de l'analyse, elles ont potentiellement eu un comportement exploratoire plus inhibé, ce qui a pu limiter la détection d'une toxicité intergénérationnelle. En revanche, les larves de la génération F2 ont présenté une réaction diminuée lors de l'allumage de la lumière, réaction particulièrement marquée pour les larves exposées de façon intergénérationnelle au glyphosate et au Roundup et transgénérationnelle au Viaglif. Ce résultat indique que, comme pour la F1, l'exposition intergénérationnelle au glyphosate et au Roundup affecte le comportement des larves. Une autre étude a rapporté une perturbation de la réaction de truites arc-en-ciel exposées directement à un GBH à la concentration de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de glyphosate, l'effet étant toutefois inversé, avec une vitesse accrue des larves exposées WEEKS SANTOS et collab. [2019]. Cette différence pourrait être associée à la concentration plus forte utilisée par les auteurs, un mode d'exposition différent ou le stade de développement plus avancé considéré dans notre étude. Notre expérience apporte aussi une information concernant l'effet transgénérationnel. Le Viaglif, qui pour la F1 n'a engendré aucun effet, a induit un effet transgénérationnel sur la F2 pouvant être lié à des modifications épigénétiques, comme suggéré par SMITH et collab. [2019]. Aussi, bien qu'une légère diminution de la réponse ait été observée chez les larves exposées transgénérationnellement au glyphosate et au Roundup, les effets étaient non-significatifs et moins important que ceux engendrés par la contamination transgénérationnelle au Viaglif ou par la contamination intergénérationnelle au glyphosate et au Roundup. La contamination

directe des larves au stade de cellules germinales dans l'organisme des parents a donc probablement un rôle majeur dans la toxicité observée chez les descendants. Au niveau de la réaction des truites face au stress lumineux, l'effet multigénérationnel a été plus faible que l'effet intergénérationnel, ce qui suppose que la contamination des parents, voire des grands-parents, a engendré des effets antagonistes impliquant une forme d'adaptation physiologique (transmise par des mécanismes héréditaires non génétiques). Étant donné le caractère assez peu naturel du dispositif expérimental (c.-à-d. comportement évalué dans de petits puits en plastique), cette hypothèse doit néanmoins être confirmée à la fois par une évaluation des mécanismes moléculaires de transmission (p. ex. méthylation de l'ADN, transmission d'ARN parental, microARN), mais également par d'autres analyses présentant une plus grande pertinence écologique à l'échelle de l'individu (p. ex. évitement d'un prédateur).

Dans cette étude, aucun des paramètres biochimiques ou liés à la méthylation de l'ADN mesurés n'a permis d'identifier la cause des perturbations du développement observées à l'échelle de l'organisme. En revanche, certains paramètres ont tout de même été impactés par la contamination chimique, bien que peut corrélés aux effets observés à un plus haut niveau d'intégration biologique. Alors qu'aucun stress oxydant n'a été détecté dans les larves, l'inhibition d'une enzyme impliquée dans les défenses antioxydantes, la catalase, observée pour la contamination transgénérationnelle au glyphosate, a probablement été liée à un phénomène indirect plutôt qu'à une réponse de l'organisme face à la production de ROS. L'absence de sensibilité du test utilisé pour doser la peroxydation lipidique a été identifiée comme un frein dans cette étude et de futures recherches utilisant de plus nombreux marqueurs du stress oxydatif (p. ex. dose directe des ROS) seront nécessaires avant d'exclure l'implication du stress oxydant dans la toxicité générationnelle engendrée par la contamination du glyphosate chez les larves, suspectée dans le cadre de la contamination directe, particulièrement dans le cas des formulations commerciales de glyphosate [PERSCH et collab. \[2017\]](#); [SÁNCHEZ et collab. \[2017\]](#); [SULUKAN et collab. \[2017\]](#). Les effets observés au niveau des marqueurs du métabolisme énergétique ont été plus évidents et suggèrent un impact à la fois inter et multigénérationnel de la contamination au glyphosate, qui peut être modulé par la présence et la nature des co-formulants. La réponse générale des poissons a indiqué une perturbation de la production de l'énergie par le métabolisme aérobie, principalement au niveau de la membrane mitochondriale. Ce résultat semble cohérent avec la contribution supérieure du métabolisme anaérobie dans la production de l'énergie totale observée (ratio LDH : CS augmenté) pour les larves exposées transgénérationnellement au glyphosate. Dans le cas d'expositions directes au glyphosate seul ou co-formulé, les résultats de certains auteurs laissent suspecter que le glyphosate perturbe le métabolisme énergétique et, plus particulièrement, la production d'ATP via la chaîne de transport d'électrons des mitochondries [[KENNEDY, 2017](#); [LUO et collab., 2017](#); [MARCHAND et collab., 2006](#); [PEIXOTO, 2005](#); [PEREIRA et collab., 2018](#)]. Dans notre étude sur la F2, une augmentation du ratio LDH : CS, pouvant indiquer une plus forte participation du métabolisme anaérobie dans la production d'énergie, a été observée pour les larves exposées inter et transgénérationnellement au glyphosate. Une augmentation de l'activité absolue de la LDH avait déjà été rapportée dans la littérature sur des poissons exposés à un GBH à de faibles concentrations de glyphosate (c.-à-d. entre 26.5 et 106 µg L⁻¹), effet pouvant être associé à une demande énergétique supérieure liée à la toxicité de la formulation [[AYANDA et collab., 2015](#)]. Dans notre étude,

L'activité absolue de la LDH n'étant pas modifiée, il est possible que cette augmentation du ratio LDH : CS reflète plus particulièrement une diminution du métabolisme aérobie, comme la baisse de l'activité absolue des enzymes CS et CCO ainsi que l'augmentation du ratio CS : CCO le laissent supposer. Quoiqu'il en soit, l'étude des générations F1 et F2 suggère fortement que le glyphosate, qu'il soit associé ou non à des co-formulants, pourrait impacter le métabolisme énergétique au stade larvaire. Le mode de contamination, mais également la présence et la nature des co-formulants, semblent clairement avoir une action sur les effets observés. Leur contribution reste néanmoins difficilement prévisible en fonction du paramètre considéré, et des études ultérieures visant à identifier les mécanismes de transmission seront nécessaires. Étant donné qu'aucune différence significative de méthylation globale n'a pu être mise en évidence dans cette étude sur la génération F2, une analyse de gènes spécifiques pourrait révéler des mécanismes de méthylation dirigés sur des gènes particuliers. Des approches globales d'identification des régions méthylées ou de modification d'expression de gènes (p. ex. par séquençage ARN) pourraient également permettre l'identification des voies métaboliques particulièrement impactées par la contamination au glyphosate.

Comme pour la génération F1, l'étude de différents paramètres biochimiques a montré que les effets toxiques du glyphosate observés au stade larvaire semblaient être résorbés au stade juvénile. Ceci pourrait indiquer que les mécanismes de transmission non génétiques de la toxicité, et notamment les mécanismes épigénétiques, ne sont plus actifs après quelques mois de développement. Toutefois, les perturbations, principalement métaboliques, observées chez les larves transgénérationnellement exposées au glyphosate suggèrent que des transformations, par exemple épigénétiques, subsistent, mais ne sont pas exprimées aux stades de vies plus avancés. Une capacité d'adaptation physiologique plus élevée à ces stades de vie, permettant ainsi une compensation de la toxicité, pourrait expliquer l'absence de perturbations des paramètres biochimiques étudiés. Quoiqu'il en soit, afin de vérifier que la transmission des effets toxiques perdure bien au cours des générations successives, le prolongement des investigations jusqu'à la génération F3 serait nécessaire. Les perturbations observées au niveau du métabolisme aérobie des truites juvéniles exposées intergénérationnellement au glyphosate laissent tout de même penser que certains effets transmis par les parents ou que l'exposition directe au stade de cellule germinale entraînent des modifications perdurant après plusieurs mois de développement. Le challenge infectieux réalisé sur les truites juvéniles confirme d'ailleurs le maintien d'une toxicité intergénérationnelle à ce stade de vie. En effet, bien qu'aucun paramètre lié au métabolisme ou à l'immunité ne laissait présager une susceptibilité virale accrue des truites exposées, l'exposition intergénérationnelle au glyphosate et au Roundup a induit une augmentation drastique de la mortalité des truites juvéniles infectées par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse. De plus, la recontamination des truites au Roundup (c.-à-d. l'exposition multigénérationnelle) n'a pas modifié cet effet. En revanche, aucun impact transgénérationnel n'a été observé. La principale différence entre les modes d'expositions inter et transgénérationnels est une exposition directe de la descendance au stade de cellule germinale dans le cas de l'exposition intergénérationnelle [STENZ et collab., 2018]. Il est donc possible que cette exposition directe de la descendance joue un rôle prépondérant dans la toxicité observée. À noter que dans l'étude réalisée sur la génération F1, le Roundup avait engendré, à l'inverse, une diminution de la sensibilité des poissons. Cet effet

pourrait potentiellement être expliqué par un stade de vie différent entre les deux générations lors du challenge viral. L'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la toxicité du glyphosate sur l'immunité des truites F2 n'ont probablement pas été identifiés en totalité dans cette expérience. En revanche, une plus faible proportion de poissons hautement séropositifs a été observée ce qui pourrait en partie expliquer l'augmentation de la susceptibilité virale observée. Il est intéressant de noter que ce constat sur l'immunité spécifique antivirale des truites, bien que les différences étaient non statistiquement significatives, avait déjà été fait lors du challenge suivant l'exposition aiguë des juvéniles au glyphosate co-formulé. La littérature scientifique indique un impact direct du glyphosate, seul ou co-formulé, à différents niveaux d'intégration biologique sur l'immunité des poissons comme au niveau moléculaire [MARCHAND et collab., 2006], cellulaire [FÉLIX et SARADHAMANI, 2015; KONDERA et collab., 2018], ou à l'échelle de l'individu KELLY et collab. [2010]; KREUTZ et collab. [2010]. Les liens de causalité entre ces différents effets n'ont toutefois pas été démontrés et ces derniers n'ont, de plus, pas été considérés dans le cadre de la toxicité générationnelle. Une analyse des mécanismes immunitaires et physiologiques responsables de l'hypersensibilité des truites soumises à une exposition intergénérationnelle au glyphosate sera donc à mener dans de futures expérimentations.

En résumé, l'étude de la génération F2 a permis de confirmer certains résultats obtenus pour la génération F1, mais a également montré que des effets transgénérationnels pouvaient exister. Une implication de phénomènes épigénétiques est donc probable, mais n'a toutefois pas pu être mise en évidence. Certains effets, comme ceux observés sur le comportement pour le glyphosate et le Roundup, semblent par contre être associés à la contamination intergénérationnelle. Un effet générationnel d'une contamination chimique à une dose de glyphosate environnementalement pertinente a donc pu être démontré, même si les phénomènes impliqués dans cette transmission restent à déterminer pour permettre une meilleure compréhension de l'impact potentiel de cette substance active sur les populations naturelles.

Partenariat et poursuites du projet GlyphoTAC

Le projet GlyphoTAC mené au cours de cette thèse nous a donné l'occasion de monter une collaboration pour valoriser le matériel biologique précieux disponible en intégrant un volet supplémentaire portant sur l'étude de l'impact de l'exposition au glyphosate sur le microbiote de la truite arc-en-ciel. Ce volet a été coordonné par la Dr Laure Bellec, enseignante-chercheuse au sein du laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux de l'université de Bordeaux. La caractérisation des différents taxons présents au niveau intestinal et branchial ainsi que l'analyse des variations engendrées par la contamination chimique chronique directe ont été réalisées par une approche de métagénomique via le séquençage de l'ARN 16S sur une génération F0 de truites adultes. Outre la réalisation des expositions chroniques, j'ai participé aux prélèvements des échantillons de branchies et d'intestins et apporté ma contribution pour l'interprétation des résultats. Les

résultats obtenus, qui feront l'objet d'une publication très prochainement, permettront d'améliorer les connaissances sur la toxicité du glyphosate sur le microbiote des poissons, phénomène encore peu considéré à ce jour.

Une poursuite des investigations concernant le projet GlyphoTAC va être également permise grâce à une analyse transcriptomique des truites de la génération F2 (cf chapitre précédent) qui a pour objectif d'évaluer, par une approche **RNAseq** sans *a priori*, les perturbations potentielles de l'expression de certains gènes quelques jours avant l'épreuve infectieuse au vNHI et 96h après. L'analyse bioinformatique de ces données devrait permettre de déterminer les principales voies métaboliques impactées par l'exposition chimique seule, mais également après l'application d'un stress infectieux supplémentaire. Le potentiel immunotoxique du glyphosate sera tout particulièrement examiné à ce niveau.

Références

- ASHAUER, R. et T. JAGER. 2018, «Physiological modes of action across species and toxicants : the key to predictive ecotoxicology», *Environmental Science : Processes & Impacts*, vol. 20, n° 1, doi: [10.1039/c7em00328e](https://doi.org/10.1039/c7em00328e), p. 48–57, ISSN 2050-7887. 180
- AYANDA, O., S. ONIYE, J. AUTA, V. AJIBOLA et O. BELLO. 2015, «Responses of the African catfish *Clarias gariepinus* to long-term exposure to glyphosate- and paraquat-based herbicides», *African Journal of Aquatic Science*, vol. 40, n° 3, doi: [10.2989/16085914.2015.1074882](https://doi.org/10.2989/16085914.2015.1074882), p. 261–267, ISSN 1608-5914. 179, 187
- BLANC, M., B. CORMIER, T. HYÖTYLÄINEN, M. KRAUSS, N. SCHERBAK, X. COUSIN et S. H. KEITER. 2020, «Multi- and transgenerational effects following early-life exposure of zebrafish to permethrin and coumarin 47 : Impact on growth, fertility, behavior and lipid metabolism», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 205, doi: [10.1016/j.ecoenv.2020.111348](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111348), p. 111 348, ISSN 0147-6513. 185
- BRIDI, D., S. ALTENHOFEN, J. B. GONZALEZ, G. K. REOLON et C. D. BONAN. 2017, «Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish», *Toxicology*, vol. 392, doi: [10.1016/j.tox.2017.10.007](https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007), p. 32–39, ISSN 0300-483X. 180
- CATTANEO, R., B. CLASEN, V. L. LORO, C. C. DE MENEZES, A. PRETTO, B. BALDISSEROTTO, A. SANTI et L. A. DE AVILA. 2011, «Toxicological Responses of *Cyprinus carpio* Exposed to a Commercial Formulation Containing Glyphosate», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 87, n° 6, doi: [10.1007/s00128-011-0396-7](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0396-7), p. 597–602, ISSN 0007-4861. 184
- CRAIG, P. M., C. M. WOOD et G. B. MCCLELLAND. 2007, «Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*)», *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 293, n° 5, doi: [10.1152/ajpregu.00383.2007](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00383.2007), p. R1882–R1892, ISSN 0363-6119. 183

- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2015, «Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate», *EFSA Journal*, vol. 13, n° 11, doi: [10.2903/j.efsa.2015.4302](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302), p. 4302, ISSN 18314732, 18314732. 182
- FARIA, M., X. WU, M. LUJA-MONDRAGÓN, E. PRATS, L. M. GÓMEZ-OLIVÁN, B. PIÑA et D. RALDÚA. 2020, «Screening anti-predator behaviour in fish larvae exposed to environmental pollutants», *Science of the Total Environment*, vol. 714, doi: [10.1016/j.scitotenv.2020.136759](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136759), p. 136 759, ISSN 0048-9697. 179, 180
- FÉLIX, F. J. et N. SARADHAMANI. 2015, «Impact of the Herbicide Glyphosate Roundup (41 %) On The Haematology of the Freshwater Fish, Catla Catla (Hamilton)», *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, vol. 9, n° 4, p. 56–60, ISSN 2319-2399. URL <https://iosrjournals.org/iosr-jestft/papers/vol9-issue4/Version-3/H09435660.pdf>. 181, 189
- FIORINO, E., P. SEHONOVA, L. PLHALOVA, J. BLAHOVA, Z. SVOBODOVA et C. FAGGIO. 2018, «Effects of glyphosate on early life stages : comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio* », *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, n° 9, doi: [10.1007/s11356-017-1141-5](https://doi.org/10.1007/s11356-017-1141-5), p. 8542–8549, ISSN 0944-1344. 180
- FOLMAR, L. C., H. O. SANDERS et A. M. JULIN. 1979, «Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 8, n° 3, doi: [10.1007/BF01056243](https://doi.org/10.1007/BF01056243), p. 269–278, ISSN 0090-4341. 179, 180
- KAMSTRA, J. H., L. B. SALES, P. ALESTRÖM et J. LEGLER. 2017, «Differential DNA methylation at conserved non-genic elements and evidence for transgenerational inheritance following developmental exposure to mono(2-ethylhexyl) phthalate and 5-azacytidine in zebrafish», *Epigenetics & Chromatin*, vol. 10, n° 1, doi: [10.1186/s13072-017-0126-4](https://doi.org/10.1186/s13072-017-0126-4), p. 20, ISSN 1756-8935. 186
- KELLY, D. W., R. POULIN, D. M. TOMPKINS et C. R. TOWNSEND. 2010, «Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival», *Journal of Applied Ecology*, vol. 47, n° 2, doi: [10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x), p. 498–504, ISSN 0021-8901. 181, 184, 189
- KENNEDY, C. 2017, «Glyphosate fate and toxicity to fish with special relevance to salmon and steelhead populations in the Skeena River watershed», cahier de recherche. URL <https://www.semanticscholar.org/paper/Acute-toxicity-of-copper-hydroxide-and-glyphosate-Kingsley/7b16dc888bec16c942acb536e69e58740c5815e2>. 187
- KONDERA, E., B. TEODORCZUK, K. ŁUGOWSKA et M. WITESKA. 2018, «Effect of glyphosate-based herbicide on hematological and hemopoietic parameters in common carp *Cyprinus carpio*», *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 44, n° 3, doi: [10.1007/s10695-018-0489-x](https://doi.org/10.1007/s10695-018-0489-x), p. 1011–1018, ISSN 1573-5168. 181, 189

- KREUTZ, L. C., L. J. G. BARCELLOS, A. MARTENINGHE, E. D. DOS SANTOS et R. ZANATTA. 2010, «Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge», *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 29, n° 4, doi: [10.1016/j.fsi.2010.06.003](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.003), p. 694–697, ISSN 1050-4648. 181, 184, 189
- KUBSAD, D., E. E. NILSSON, S. E. KING, I. SADLER-RIGGLEMAN, D. BECK et M. K. SKINNER. 2019, «Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations : Generational Toxicology», *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, doi: [10.1038/s41598-019-42860-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0), p. 6372, ISSN 2045-2322. 180, 185
- LANZARIN, G. A., L. M. FÉLIX, D. SANTOS, C. A. VENÂNCIO et S. M. MONTEIRO. 2019, «Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation - Roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis», *Chemosphere*, vol. 223, doi: [10.1016/j.chemosphere.2019.02.071](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.071), p. 514–522, ISSN 0045-6535. 183
- LUO, L., F. WANG, Y. ZHANG, M. ZENG, C. ZHONG et F. XIAO. 2017, « *In vitro* cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes», *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 52, n° 6, doi: [10.1080/03601234.2017.1293449](https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1293449), p. 410–417, ISSN 1532-4109. 183, 187
- MAJOR, K. M., B. M. DECOURTEN, J. LI, M. BRITTON, M. L. SETTLES, A. C. MEHINTO, R. E. CONNON et S. M. BRANDER. 2020, «Early Life Exposure to Environmentally Relevant Levels of Endocrine Disruptors Drive Multigenerational and Transgenerational Epigenetic Changes in a Fish Model», *Frontiers in Marine Science*, vol. 7, n° June, doi: [10.3389/fmars.2020.00471](https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00471), p. 1–17, ISSN 2296-7745. 186
- MARCHAND, J., A. TANGUY, G. CHARRIER, L. QUINIOU, E. PLEE-GAUTHIER et J. LAROCHE. 2006, «Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder, *Platichthys flesus*, Submitted to Pesticide Exposure», *Marine Biotechnology*, vol. 8, n° 3, doi: [10.1007/s10126-005-0099-3](https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3), p. 275–294, ISSN 1436-2228. 179, 181, 187, 189
- MENÉNDEZ-HELMAN, R. J., G. V. FERREYROA, M. DOS SANTOS AFONSO et A. SALIBIÁN. 2011, «Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *cnesterodon decemmaculatus*», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 88, n° 1, doi: [10.1007/s00128-011-0423-8](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8), p. 6–9, ISSN 0007-4861. 184
- PEIXOTO, F. 2005, «Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation», *Chemosphere*, vol. 61, n° 8, doi: [10.1016/j.chemosphere.2005.03.044](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044), p. 1115–1122, ISSN 0045-6535. 183, 187

- PEREIRA, A. G., M. L. JARAMILLO, A. P. REMOR, A. LATINI, C. E. DAVICO, M. L. DA SILVA, Y. M. MÜLLER, D. AMMAR et 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*, vol. 209, doi: [10.1016/j.chemosphere.2018.06.075](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.075), p. 353–362, ISSN 0045-6535. 181, 183, 187
- PERSCH, T. S. P., R. N. WEIMER, B. S. FREITAS et G. T. OLIVEIRA. 2017, «Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides : Roundup®, Primoleo®, and Facet®», *Chemosphere*, vol. 174, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.01.092](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.092), p. 98–109, ISSN 1879-1298. 187
- REHBERGER, K., I. WERNER, B. HITZFELD, H. SEGNER et L. BAUMANN. 2017, «20 Years of fish immunotoxicology - what we know and where we are», *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 47, n° 6, doi: [10.1080/10408444.2017.1288024](https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024), p. 516–542, ISSN 1040-8444. 184
- ROY, N. M., B. CARNEIRO et J. OCHS. 2016, «Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 42, doi: [10.1016/j.etap.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.003), p. 45–54, ISSN 1382-6689. 179
- SÁNCHEZ, J. A. A., A. S. VARELA, C. D. CORCINI, J. C. DA SILVA, E. G. PRIMEL, S. CALDAS, R. D. KLEIN et C. D. M. G. MARTINS. 2017, «Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*», *Chemosphere*, vol. 177, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.02.147](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.147), p. 200–210, ISSN 0045-6535. 187
- SMITH, C. M., M. K. VERA et R. K. BHANDARI. 2019, «Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)», *Aquatic Toxicology*, vol. 210, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005), p. 215–226, ISSN 0166-445X. 179, 180, 182, 186
- SOKOLOVA, I. M. 2013, «Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors», *Integrative and Comparative Biology*, vol. 53, n° 4, doi: [10.1093/icb/ict028](https://doi.org/10.1093/icb/ict028), p. 597–608, ISSN 1540-7063. 181
- STENZ, L., D. S. SCHECHTER, S. R. SERPA et A. PAOLONI-GIACOBINO. 2018, «Intergenerational Transmission of DNA Methylation Signatures Associated with Early Life Stress», *Current Genomics*, vol. 19, n° 8, doi: [10.2174/1389202919666171229145656](https://doi.org/10.2174/1389202919666171229145656), p. 665–675, ISSN 1389-2029. 185, 188
- SULUKAN, E., M. KÖKTÜRK, H. CEYLAN, Ş. BEYDEMİR, M. IŞIK, M. ATAMANALP et S. B. CEYHUN. 2017, «An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)», *Chemosphere*, vol. 180, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.04.018](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018), p. 77–85, ISSN 0045-6535. 187

- VANDENBERG, L. N., B. BLUMBERG, M. N. ANTONIOU, C. M. BENBROOK, L. CARROLL, T. COLBORN, L. G. EVERETT, M. HANSEN, P. J. LANDRIGAN, B. P. LANPHEAR, R. MESNAGE, F. S. VOM SAAL, W. V. WELSHONS et J. P. MYERS. 2017, «Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides?», *Journal of Epidemiology and Community Health*, vol. 71, n° 6, doi: [10.1136/jech-2016-208463](https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463), p. 613–618, ISSN 0143-005X. 180
- WEBSTER, T. M. U., L. V. LAING, H. FLORANCE et E. M. SANTOS. 2014, «Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*)», *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 2, doi: [10.1021/es404258h](https://doi.org/10.1021/es404258h), p. 1271–1279, ISSN 0013-936X. 180
- WEEKS SANTOS, S., B. CORMIER, N. MAZZELLA, B. BONNAUD, S. MORIN, C. CLÉRANDÉAU, B. MORIN et J. CACHOT. 2019, «A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*», *Aquatic Toxicology*, vol. 216, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.105291](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291), p. 105 291, ISSN 0166-445X. 183, 186
- ZHANG, S., J. XU, X. KUANG, S. LI, X. LI, D. CHEN, X. ZHAO et X. FENG. 2017, «Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*)», *Chemosphere*, vol. 181, doi: [10.1016/j.chemosphere.2017.04.094](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.094), p. 270–280, ISSN 0045-6535. 180, 183

Conclusions et perspectives

« La connaissance scientifique possède en quelque sorte des propriétés fractales : nous aurons beau accroître notre savoir, le reste - si infime soit-il - sera toujours aussi infiniment complexe que l'ensemble de départ. »

Isaac Asimov

Le glyphosate— une (éco)toxicité difficile à évaluer

L'étude de la littérature indique que le glyphosate possède une toxicité chez les animaux, notamment dans le milieu aquatique, mais que cette dernière est influencée par le stade de vie et l'espèce considérés et qu'elle peut-être augmentée par la présence de co-formulants [ANNETT et collab., 2014]. La toxicité associée au glyphosate et à ses formulations commerciales est, en complément, particulièrement modulée par les différents paramètres biotiques et abiotiques du milieu [FOLMAR et collab., 1979; GIESY et collab., 2000; WAN et collab., 1989]. La capacité de transmission de cette toxicité au travers des générations semble possible, mais reste très largement sous-étudiée [KUBSAD et collab., 2019; SMITH et collab., 2019; WEBSTER et collab., 2014]. Dans les études disponibles, les concentrations utilisées, tous modes d'expositions chimiques confondus, sont généralement bien au-dessus de la concentration maximale de $104,8 \mu\text{gL}^{-1}$ prédite par l'EFSA dans le scénario "pire-cas" d'exposition [EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015] (tendance confirmée par les mesures de concentrations dans le milieu aquatique rapportées par l'Anses [ANSES, 2019] qui, en dix ans, n'ont jamais dépassées ce seuil).

Le projet GlyphoTAC— les apports majeurs

Les études menées au cours du projet GlyphoTAC ont été faites avec une concentration en glyphosate environ 100 fois inférieure en exposition chronique et 5 fois supérieure en exposition aiguë à la valeur maximale de ce scénario "pire-cas". Les résultats obtenus vont globalement dans le sens des

résultats retrouvés dans la littérature. Lors des expositions aiguës et chroniques, quel que soit le stade de vie considéré, aucune mortalité induite par la contamination au glyphosate seul ou co-formulé n'a été observée. Les paramètres de reproduction des truites génitrices exposées chroniquement à une dose de $1\ \mu\text{gL}^{-1}$ selon un mode direct, inter et multigénérationnel n'ont pas été perturbés. Chez les géniteurs, seuls certains paramètres hémato-immunologiques ont été modifiés par l'exposition aux formulations commerciales (GBHs; c.-à-d. soit par les co-formulants directement ou par des effets d'association de ces co-formulants avec le glyphosate). Ces données sont plutôt en faveur d'une innocuité du glyphosate dans les conditions étudiées, mais indiquent tout de même que les GBHs pouvaient présenter une toxicité au niveau cellulaire chez les truites adultes. La contamination aiguë des truites juvéniles à une dose de glyphosate de $500\ \mu\text{gL}^{-1}$ a également montré qu'aucun changement physiologique profond n'était engendré, mais que, sans toutefois augmenter la susceptibilité des poissons au virus, le stress supplémentaire ajouté par l'infection avait provoqué des perturbations, principalement au niveau métabolique, chez les poissons exposés chimiquement au glyphosate. De plus, ces perturbations étaient modulées à la hausse ou à la baisse par les co-formulants, en fonction du GBH considéré. L'étude de l'impact du glyphosate sur le développement embryo-larvaire a montré que ce stade de vie était particulièrement vulnérable à l'exposition à la substance active, qu'elle soit seule ou associée à des co-formulants qui peuvent modifier la toxicité observée. Des perturbations au niveau du développement du corps, du comportement et du métabolisme énergétique des larves étaient observées. La diminution de la réaction des larves face à un stress lumineux ou l'augmentation de leur comportement exploratoire pourraient notamment augmenter la vulnérabilité des truites vis-à-vis des prédateurs. Les expositions directes, intergénérationnelles, transgénérationnelles et multigénérationnelles se sont toutes révélées pouvoir induire une toxicité au niveau des stades embryo-larvaires. Au stade juvénile, la quasi-totalité des paramètres biochimiques étudiés ne révélait pas de perturbations comme celles qui étaient observées aux stades embryo-larvaires. En revanche, les épreuves d'infections virales ont mis en lumière une modification, principalement une augmentation, de la susceptibilité à l'infection virale des poissons. Dépendamment du stade de croissance des juvéniles, cette immunotoxicité a été observée à la fois pour la substance active pure, mais aussi en présence de co-formulants, qui une fois encore se sont révélés pouvoir moduler les effets observés. Dans l'ensemble, ces études indiquent donc que le glyphosate, co-formulé ou non, présente une toxicité par exposition directe pouvant également se transmettre aux générations futures, probablement via des mécanismes d'hérédité non génétiques. Toutefois, le contact direct de la descendance au stade germinal dans l'organisme des parents (c.-à-d. lors d'expositions intergénérationnelles uniquement) joue probablement un rôle principal dans la transmission de la toxicité.

Le projet GlyphoTAC— de nouvelles questions

Lors de ces études, une des difficultés majeures ayant été rencontrées est le manque de corrélation entre les effets observés aux niveaux moléculaire, enzymatique et cellulaire avec ceux observés au niveau de l'individu. Ceci ne permet pas d'identifier un ou plusieurs modes d'action (MoA) de la substance active, modes d'action éventuellement modulés par la présence de co-formulants. Ce

manque de connaissance quant aux MoA du glyphosate et des formulations associées représente aujourd'hui un des freins majeurs dans l'évaluation du risque associé à ces contaminants [ASHAUER et JAGER, 2018]. Des études seront donc nécessaires pour remédier à ce fossé dans la connaissance scientifique. Des méthodes sans *a priori* tel que l'analyse RNAseq, proposée comme poursuite du projet GlyphoTAC, pourront certainement permettre d'identifier des pistes allant dans ce sens. Un autre point clef restant à élucider à la suite du présent projet est lié à l'identification des mécanismes moléculaires expliquant la transmission des effets toxiques au travers des générations. L'analyse de l'épigénome (p.ex. microARN, méthylation) grâce à des techniques de séquençage nouvelle génération semble être une bonne voie d'exploration de ces mécanismes. Aussi, l'ensemble des pistes évoquées permettront peut-être l'exploration de l'impact de la recontamination aux contaminants parentaux (c.-à-d. exposition multigénérationnelle). Le projet GlyphoTAC a détecté plusieurs effets possibles de ce mode d'exposition, sans toutefois les caractériser précisément. Une modulation de la toxicité à la hausse mais également à la baisse, a par exemple été observée suite à la recontamination des individus en comparaison à celle observée lorsqu'uniquement la génération F0 ou F1 avait été contaminée. Ce mode d'exposition étant celui qui dans le cas des contaminants ubiquistes est le plus rencontré dans le milieu naturel, il apparaît donc nécessaire d'apporter une attention particulière quand à la compréhension de son influence sur la toxicité du glyphosate chez les organismes aquatiques.

Les co-formulants— une part importante dans l'évaluation du risque associé aux herbicides à base de glyphosate

Les travaux issus de la littérature scientifique ainsi que ceux rapportés dans ce projet GlyphoTAC montrent clairement une contribution importante des co-formulants dans la toxicité des GBHs [ANNETT et collab., 2014]. Même si dans la majorité des cas, une toxicité supérieure est détectée en présence des co-formulants, la situation inverse est néanmoins aussi retrouvée. Ces modulations de la toxicité des GBHs sont liées à la nature et à la concentration des co-formulants en mélange, mais aussi à la concentration d'exposition à la substance active. En expérimentation, la dose d'exposition aux co-formulants et probablement bien corrélée à celle de la substance active (par simple principe de dilution). En revanche, la biodisponibilité de ces composés chimiques, du fait de leurs propriétés physico-chimiques propres, peut très bien être différente de celle du glyphosate. Le problème est posé dans l'environnement où des différences de persistance ainsi que des phénomènes de biomagnification peuvent modifier les concentrations d'exposition des organismes aquatiques aux co-formulants. Les modes d'action toxiques associés au glyphosate varient également probablement par rapport à ceux de co-formulants isolés ou en mélanges (comme lors d'exposition à des GBHs).

Formulations commerciales et secret industriel— un frein majeur pour l'évaluation du risque environnemental

Le secret industriel permettant aux fabricants de GBHs de garder leurs formulations détaillées secrètes représente un frein important pour les recherches visant à évaluer le risque associé aux produits co-formulés à base de glyphosate [ANNETT et collab., 2014; MESNAGE et collab., 2015]. Il faut néanmoins noter que les agences en charge de l'examen des dossiers de demandes d'autorisation de mise sur le marché de GBHs disposent de la nature de ces co-formulants et des études toxicologiques et écotoxicologiques associées. Au niveau des recherches comme celles menées dans le cadre de ce travail, la comparaison des effets induits par différents GBHs se fait par contre à l'aveugle, car il est impossible de savoir quels co-formulants varient en qualité et en quantité. Il est également impossible de tester de façon séparée le glyphosate et chaque co-formulant un à un. Cela serait pourtant la manière la plus efficace pour déterminer la réalité de la toxicité potentiellement associée à chaque molécule et comprendre les mécanismes sous-jacents à la modulation de certains effets du glyphosate par les co-formulants (effets additif, synergique ou antagoniste). Compte tenu de la grande diversité de formulations disponibles, de leur vitesse de renouvellement et du nombre de co-formulants qu'elles peuvent contenir, il apparaît de toute manière illusoire de pouvoir tester l'ensemble des combinaisons possibles et leurs effets respectifs sur l'environnement. Ces difficultés liées à la caractérisation de la toxicité, mais aussi des doses d'exposition dans l'environnement de ces différents composés chimiques, compliquent l'évaluation du risque associé aux formulations à base de glyphosate. En outre, des choix politico-économiques restreignent certaines investigations au cadre réglementaire et limitent de plus la valorisation de ces recherches auprès du monde académique et du grand public.

Le glyphosate— une des parties immergées de l'iceberg

Les systèmes de production alimentaire retrouvés majoritairement dans les pays développés sont basés sur une utilisation massive d'intrants chimiques. Parmi ces composés, le glyphosate fait tout spécialement l'objet d'une controverse scientifique et socio-économique [VAN STRAALEN et LEGLER, 2018]. Pourtant, il n'est pas, contrairement à d'autres, un pesticide considéré comme possédant un niveau de risque élevé [JEPSON et collab., 2020]. Mais la controverse sociale qu'il engendre, associée en majeure partie à sa popularité, est probablement aussi révélatrice d'une volonté grandissante de la population de diminuer la dépendance de l'agriculture face aux composés chimiques synthétiques. Dans le futur, les sociétés devront probablement se tourner vers des stratégies durables, en améliorant les pratiques de l'agriculture conventionnelle et en se tournant vers d'autres, telles que l'agriculture biologique [GOMIERO et collab., 2011; TAL, 2018], tout en maintenant la démographie à un niveau acceptable [ENGELMAN, 2009]. Quoiqu'il en soit, à l'heure actuelle, la substance active "glyphosate" n'est pas la seule molécule impliquée dans la toxicité des herbicides à base de glyphosate. Aussi, une multitude d'autres produits utilisés en agriculture conventionnelle interrogent également quant au risque sanitaire pour l'homme et l'environnement associé à leur utilisation.

Références

- ANNETT, R., H. R. HABIBI et A. HONTELA. 2014, «Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment», *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, n° 5, doi: [10.1002/jat.2997](https://doi.org/10.1002/jat.2997), p. 458–479, ISSN 0260-437X. 195, 197, 198
- ANSES. 2019, «Synthèse des données de surveillance - Appui scientifique et technique N° 2017-04», cahier de recherche, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). URL https://www.anses.fr/fr/system/files/Fiche_PPV_Glyphosate.pdf. 195
- ASHAUER, R. et T. JAGER. 2018, «Physiological modes of action across species and toxicants : the key to predictive ecotoxicology», *Environmental Science : Processes & Impacts*, vol. 20, n° 1, doi: [10.1039/c7em00328e](https://doi.org/10.1039/c7em00328e), p. 48–57, ISSN 2050-7887. 197
- ENGELMAN, R. 2009, «Population & Sustainability», *Scientific American*, vol. 19, n° 2, doi: [10.1038/scientificamericanearth0609-22](https://doi.org/10.1038/scientificamericanearth0609-22), p. 22–29, ISSN 0036-8733. 198
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2015, «Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate», *EFSA Journal*, vol. 13, n° 11, doi: [10.2903/j.efsa.2015.4302](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302), p. 4302, ISSN 18314732, 18314732. 195
- FOLMAR, L. C., H. O. SANDERS et A. M. JULIN. 1979, «Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 8, n° 3, doi: [10.1007/BF01056243](https://doi.org/10.1007/BF01056243), p. 269–278, ISSN 0090-4341. 195
- GIESY, J. P., S. DOBSON et K. R. SOLOMON. 2000, «Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide», dans *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 167, Springer New York, p. 35–120, doi: [10.1007/978-1-4612-1156-3_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2). 195
- GOMIERO, T., D. PIMENTEL et M. G. PAOLETTI. 2011, «Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices : Conventional vs. Organic Agriculture», *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 30, n° 1-2, doi: [10.1080/07352689.2011.554355](https://doi.org/10.1080/07352689.2011.554355), p. 95–124, ISSN 0735-2689. 198
- JEPSON, P. C., K. MURRAY, O. BACH, M. A. BONILLA et L. NEUMEISTER. 2020, «Selection of pesticides to reduce human and environmental health risks : a global guideline and minimum pesticides list», *The Lancet Planetary Health*, vol. 4, n° 2, doi: [10.1016/S2542-5196\(19\)30266-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(19)30266-9), p. e56–e63, ISSN 2542-5196. 198
- KUBSAD, D., E. E. NILSSON, S. E. KING, I. SADLER-RIGGLEMAN, D. BECK et M. K. SKINNER. 2019, «Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations : Generational Toxicology», *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, doi: [10.1038/s41598-019-42860-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0), p. 6372, ISSN 2045-2322. 195

- MESNAGE, R., N. DEFARGE, J. S. DE VENDÔMOIS et G. SÉRALINI. 2015, «Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits», *Food and Chemical Toxicology*, vol. 84, doi: [10.1016/j.fct.2015.08.012](https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012), p. 133–153, ISSN 0278-6915. 198
- SMITH, C. M., M. K. VERA et R. K. BHANDARI. 2019, «Developmental and epigenetic effects of Roundup and glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*)», *Aquatic Toxicology*, vol. 210, doi: [10.1016/j.aquatox.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005), p. 215–226, ISSN 0166-445X. 195
- VAN STRAALLEN, N. M. et J. LEGLER. 2018, «Decision-making in a storm of discontent», *Science*, vol. 360, n° 6392, doi: [10.1126/science.aat0567](https://doi.org/10.1126/science.aat0567), p. 958–960, ISSN 0036-8075. 198
- TAL, A. 2018, «Making Conventional Agriculture Environmentally Friendly : Moving beyond the Glorification of Organic Agriculture and the Demonization of Conventional Agriculture», *Sustainability*, vol. 10, n° 4, doi: [10.3390/su10041078](https://doi.org/10.3390/su10041078), p. 1078, ISSN 2071-1050. 198
- WAN, M. T., R. G. WATTS et D. J. MOUL. 1989, «Effects of different dilution water types on the acute toxicity to juvenile pacific salmonids and rainbow trout of glyphosate and its formulated products», *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, vol. 43, n° 3, doi: [10.1007/bf01701872](https://doi.org/10.1007/bf01701872), p. 378–385, ISSN 0007-4861. 195
- WEBSTER, T. M. U., L. V. LAING, H. FLORANCE et E. M. SANTOS. 2014, «Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*)», *Environmental Science & Technology*, vol. 48, n° 2, doi: [10.1021/es404258h](https://doi.org/10.1021/es404258h), p. 1271–1279, ISSN 0013-936X. 195

Annexe A

Management de la qualité de la thèse GlyphoTAC

L'attestation de management qualité de la thèse, signée par le chef du Service de Management Qualité, ainsi que le plan de management qualité de la thèse (PMQ, dont seule la forme a été modifiée pour correspondre à celle du présent manuscrit) sont disponibles dans les pages suivantes.

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Service Management Qualité

Thèse préparée par Jessy LE DU

« Ecotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) :
Reproduction, immunité et défenses antioxydantes »

Attestation de management qualité de la thèse
Par Eric CHORIN, chef du Service de Management Qualité

Les travaux de thèse conduits par Jessy LE DU se sont déroulés sous management de la qualité, dans l'unité « Pathologies Virales des Poissons » (U PVP) à compter de Janvier 2018. Cela s'est concrétisé par la rédaction, dès le début des travaux et par le doctorant, d'un Plan de Management Qualité (PMQ) signé par lui-même, l'encadrante de la thèse et le Responsable qualité du Laboratoire.

Véritable engagement pour le management de la thèse, ce PMQ a deux normes pour référence :

- la norme NF EN ISO/CEI 17025 (Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais), appliquée dans ce projet pour la gestion des ressources au sein de l'unité PVP ;
- la norme ISO 10006 (Systèmes de management de la qualité – lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets), mise en œuvre pour la conduite du projet de thèse.

Le PMQ fait systématiquement le lien entre le sujet de la thèse, sa mise en œuvre et la formalisation de son déroulement. Avec ce document, ce sont des éléments d'organisation et de gestion des travaux de thèse qui ont été réfléchis, décidés et formalisés. Ce plan comprend notamment l'identification des « points critiques » dans le projet de thèse, les données de sortie attendues à chaque étape identifiée et des « revues de projet » conformément à la norme ISO 10006.

La mise en œuvre du PMQ

Comme pour toute démarche de management qualité, la conduite de la thèse s'est traduite par

un suivi régulier de l'encadrement avec validation des travaux du doctorant. De nombreuses données ont été enregistrées conformément aux engagements en termes de traçabilité.

Le management de projet a donné lieu à des vérifications de l'application des dispositions d'organisation formalisées dans le PMQ. Cela s'est notamment traduit par deux audits internes de management de projet conduits par le Chef du Service Management Qualité les 22 Octobre 2019 et 09 Décembre 2020. Les documents examinés lors de ces audits sont listés en annexe de cette attestation. Au cours de ces audits, aucune fiche de non-conformité n'a été notifiée : les dispositions du PMQ ont donc été parfaitement suivies par le doctorant.

Les exercices de traçabilité faits par l'auditeur se sont révélés conformes aux engagements de l'équipe de thèse. Plusieurs cahiers de laboratoires normalisés ont été utilisés, y compris pour les réunions de l'équipe de thèse. Les cahiers examinés sont extrêmement bien tenus et visés régulièrement par l'encadrement. Le doctorant a aussi stocké ses nombreuses données dans un dossier électronique très bien structuré permettant de retrouver aisément l'ensemble des données brutes et des données analysées.

Les réunions prévues d'avancement du projet et de suivi du doctorant ont effectivement été réalisées, les comptes rendus sont disponibles et permettent d'identifier le but de la réunion, les données d'entrée et de sortie, la validation des différentes étapes du projet, les éventuels besoins de réorientation des recherches, ...

Les audits ont permis d'identifier :

- l'important travail réalisé par l'équipe, et en particulier par le doctorant, avec 5 publications parues ou à paraître ;
- la qualité de la traçabilité des travaux conduits ;
- la rigueur du cheminement intellectuel du doctorant dans la conduite de son projet.

Bilan du management qualité de la thèse

Le déroulement de la thèse sous management qualité a d'abord permis à Jessy LE DU de découvrir deux référentiels qualité qui, dans l'esprit au moins, lui seront nécessaires pour sa carrière professionnelle et directement bénéfiques pour des fonctions éventuelles au sein d'un laboratoire ou dans le management d'un projet.

En second lieu, ce management qualité a dû lui être utile sur plusieurs points :

- la formalisation la plus complète possible du projet scientifique, en particulier au démarrage ;
- l'importance de clarifier les rôles respectifs des différents acteurs du projet mais aussi de s'intégrer dans leurs agendas respectifs ;
- l'intérêt de réfléchir, au moins au début du projet, aux éventuels points critiques et aux actions préventives nécessaires pour les maîtriser. Dans le cas présent, cet aspect « point critique » a été parfaitement géré ;
- la nécessité de mettre en œuvre la traçabilité des ressources (équipements principaux suivis et vérifiés) afin de pouvoir analyser dans les meilleures conditions tout résultat inattendu ;
- l'importance de formaliser tous les résultats et les cheminements intellectuels.

Au final, je suis convaincu que Jessy LE DU a su mener avec une grande rigueur son projet scientifique en ayant partagé dès le début de sa thèse avec son encadrement la démarche de management qualité.

Fait à Ploufragan le 07 Janvier 2021



Eric CHORIN
Chef du Service Management Qualité

Annexe :

Principaux documents examinés lors de l'audit du 22 Octobre 2019 :

Examen du plan qualité : le programme prévisionnel du projet de thèse devra être révisé en fonction de l'avancée des travaux. La synthèse bibliographique sera intégrée à la thèse et ne sera pas publiée sous forme d'article. 4 articles devraient être publiés. Soutenance prévue en Décembre 2020.

Les fiches d'enregistrement des données brutes lors des autopsies sont des formulaires non reliés au « SMQ » et leurs noms ne sont pas nomenclaturés de façon lisible : il faudra donc les intégrer au SMQ. Les feuilles de manip devront être toutes collées dans le cahier de laboratoire. Examen du cahier de laboratoire C 60094 entamé le 11/02/2019.

Traçabilité des réunions : Vu compte-rendu de la réunion du 26/03/2019 avec Thierry Morin. Le CR est complet.

Examen des données relatives à l'étude du comportement des larves F1 nées en 2018 réalisée en 2019 : les données sont stockées informatiquement (fichiers CSV, logiciel R). Le comportement des larves est analysé à différentes températures (11 et 16 degrés : l'équipement gérant les températures est contrôlé). Le cahier de laboratoire du stagiaire (Florient SALIOU) est bien tenu et visé régulièrement par son encadrant (Jessy LE DU).

Examen des documents du CSID : second CSID le 17 septembre 2019 (rapport non disponible au jour de l'audit).

Examen des formations dispensées par l'Anses et l'école doctorale : vu les attestations de formation notamment habilitation expérimentation animale et les formations à l'utilisation des logiciels statistiques. Jessy estime que les formations obtenues à ce jour répondent à ses besoins de formation.

Vu protocoles d'activités enzymatiques rédigés par Jessy. Ces protocoles seront à intégrer dans le SMQ afin d'en conserver l'historique. Les fichiers de calculs Excel sont vérifiés (ex : calcul des dilutions) mais les traces de vérification sont non conservées.

Au jour de l'audit, le doctorant n'a pas eu à enregistrer de non-conformité lors de la réalisation des travaux. Les travaux avancent selon le rythme défini dans le plan de management de qualité de la thèse. Il n'a pas été notifié de non-conformité au cours de cet audit.

Principaux documents examinés lors de l'audit du 09 Décembre 2020 :

Examen des travaux réalisés en 2020 sur la génération F2.

Dossiers de manipulations très bien classés sur le réseau.

Examen des manip réalisées au stade larvaire :

Prélèvements réalisés sur la F2 / 2019 et consignés dans le cahier de laboratoire C (débuté le 11/02/2019) pages 103/104, 118/119 et 122. Le cahier de laboratoire est régulièrement signé et contresigné. Il faudra prévoir un état des stocks de prélèvements restants avant le départ de Jessy


LE DU. Prélèvements pour enzymologie du 06/01/2020 : prélèvement de 20*3 larves par condition avec 8 conditions. Examen du fichier nomenclature_extraction_prot_larves_20200526. Echantillon 129 condition G/C/C/ : examen de l'extraction. Vu fichier pesée_extraction_prot_larves. Examen du plan de plaque du 11/06/2020 et des résultats sur RStudio. La traçabilité est très satisfaisante. La validation de la programmation du logiciel a été réalisée mais non tracée dans le cahier de laboratoire.

Examen des participations aux colloques : en 2020, du 3 au 7 mai 2020, Congrès SETAC et 8 septembre 2020, journées scientifiques et doctorales de l'ANSES.

Il n'a pas été notifié de non-conformité au cours de cet audit.

Éléments de sortie de la thèse :

- Rapport de thèse en cours de rédaction.
- Publications :
 - P1: Impact of chronic exposure of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to low doses of glyphosate or glyphosate-based herbicides --> publié chez Aquatic toxicology
 - P2: Immunological and metabolic effects of acute sublethal exposure to glyphosate or glyphosate-based herbicides on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* --> soumis chez Science of the Total Environment (en cours de correction de la 1ère révision)
 - P3: Developmental effect of parental or direct chronic low doses of glyphosate on the larvae of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* --> près pour soumission chez Aquatic toxicology
 - P4: Modifications of the defense capacity to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout intergenerationally exposed to glyphosate --> soumission prévue chez Fish and shellfish immunology
 - P5: Generational effects of a chronic low, environmentally relevant, dose of glyphosate on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* --> soumission prévue chez Chemosphere

 <p>anses agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail</p> <p><i>Connaître, évaluer, protéger</i></p> <p>Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort Site : www.anses.fr</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">UPVP</p>	<p>Plan management qualité de la thèse : Écotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) : Reproduction, immunité et défenses antioxydantes</p>		
		<p>Code entité : PPN/MM/0002</p>	<p>Code Ennov : P_REF</p>	<p>Révision : 0</p>

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Laboratoire de Ploufragan/Plouzané
Unité Pathologies Virales des Poissons

Date d'application

06 Novembre 2018

Rédaction (si nécessaire)

Jessy Le Du

Site de Ploufragan
Zoopôle BP 53
22440 Ploufragan
Tel : 02.96.01.62.22

Approbation

Morgane Danion

Site de Plouzané
BP 70
29280 Plouzané
Tel : 02.98.05.51.65

Validation

Eric Chorin

Site de Niort
60, rue de Pied de Fond
CS 28440
79024 Niort Cedex
Tel : 05.49.79.61.28

A.1 Introduction

La qualité Le management de la qualité désigne l'ensemble des processus mis en place par une entreprise ou une organisation afin d'optimiser son activité, d'améliorer ses performances, de maîtriser ses coûts et de satisfaire ses clients. La notion d'amélioration continue est un élément central du management de la qualité. Elle s'exprime au travers d'une démarche cyclique symbolisée par la roue de Deming (ou PDCA), qui comprend quatre étapes clefs essentielles applicables à toute activité :

1. « Plan » : préparer et programmer ce que l'on veut réaliser (p. ex. définir un cahier des charges, identifier les étapes, budgétiser, établir un rétroplanning).
2. « Do » : réaliser au niveau opérationnel.
3. « Check » : contrôler que les ressources mises en œuvre dans l'étape précédente (Do) et les résultats obtenus correspondent bien à ce qui était prévu (Plan).
4. « Act » : ajuster les écarts et identifier des points d'améliorations. Un nouveau cycle peut alors recommencer.

Ces 4 points sont présentés sous forme d'un schéma conceptuel dans la figure A.1.

Les objectifs d'un système de management de la qualité sont de fiabiliser les activités, de générer des gains de productivité, et d'introduire une logique de progrès permanent. Les deux piliers incontournables pour un système efficace sont i) une déclaration de politique qualité claire de la Direction, qui va définir l'objectif collectif de la structure, la stratégie à suivre et garantir la mise à disposition des moyens nécessaires; ii) une documentation qualité adaptée et bien pensée qui permet d'organiser le fonctionnement au quotidien en s'assurant de l'intégration des améliorations apportées au fil du temps.

L'Anses en quelques mots L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été créée le 1er juillet 2010. L'Anses est un établissement public à caractère administratif placé sous la tutelle des ministères chargés de la Santé, de l'Agriculture, de l'Environnement, du Travail et de la Consommation. Ses missions consistent à évaluer les risques sanitaires en santé humaine, animale et végétale, en vue de fournir aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise scientifique et technique nécessaire à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion des risques. Elle exerce des activités principales :

- d'expertise en évaluation des risques sanitaires,
- de laboratoire national, européen et international de référence pour les analyses, la surveillance et la conduite de travaux de recherche,
- de programmation de recherche,
- d'autorisation des médicaments vétérinaires et des établissements pharmaceutiques vétérinaires,

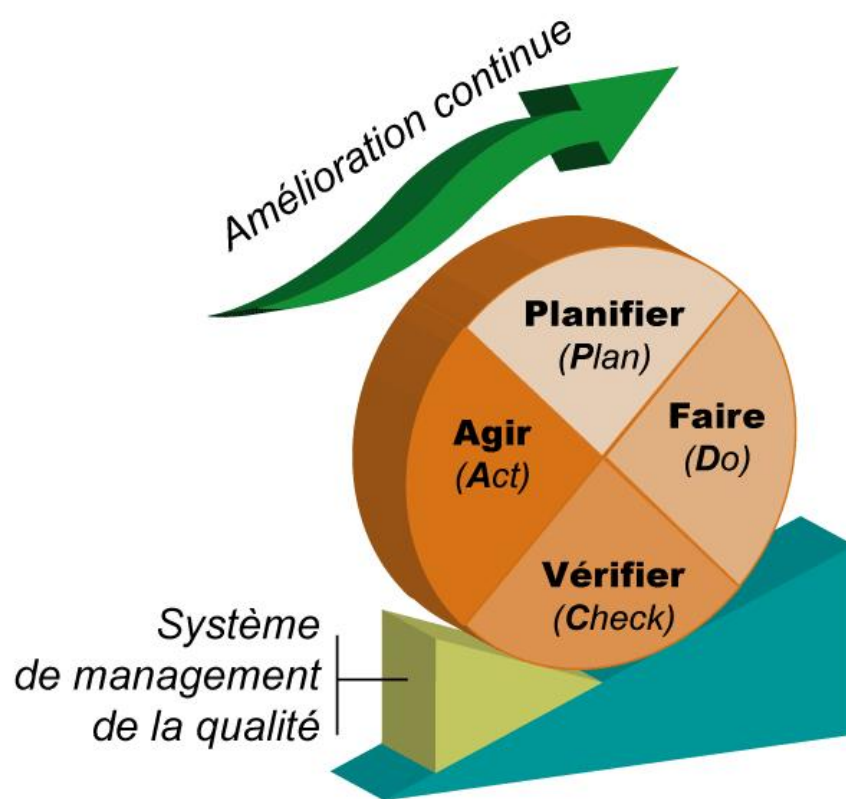


FIGURE A.1 – La roue de Deming. Source : <http://www.kaizen-skills.ma/pdca-la-roue-de-deming/>

- d'expertise dans le domaine des médicaments vétérinaires et de contrôle des médicaments vétérinaires mis sur le marché,
- d'autorisation et de contrôle des intrants du végétal,
- de coordination de dispositifs de vigilance,
- de formation et d'information.

Le management de la qualité à l'Anses « Connaître, évaluer, protéger » sont les termes qui ont été choisis par l'Anses pour résumer son action :

- **connaître**, par l'accès à des informations scientifiques et la réalisation de travaux de recherche appropriés, par la mobilisation de compétences et de ressources de haut niveau et par une forte implication dans les réseaux nationaux, européens et internationaux;
- **évaluer**, en utilisant des méthodes et des référentiels scientifiques valides et reconnus, mis en œuvre de façon objective et documentée, dans le respect des exigences déontologiques;
- **protéger**, en contribuant avec réactivité et indépendance à la mise en place de mesures de gestion de la sécurité sanitaire et en fournissant des informations scientifiques fiables aux décideurs et aux citoyens.

L'Agence organise son fonctionnement en s'appuyant sur un système de management de la qualité, fondé sur une approche par processus, afin d'assurer la réalisation de ses différentes activités dans une organisation d'ensemble cohérente et efficace. Ce système de management de la qualité intègre l'ensemble des activités de réalisation, de support et de management. Il s'appuie sur la norme ISO 9001, complétée par les différents référentiels métiers auxquels l'Agence fait appel. Il s'agit :

- pour la réalisation des expertises, de la norme NF X 50-110,
- pour les essais et analyses, de la norme NF EN ISO/CEI 17025,
- pour la gestion des projets, de la norme NF EN ISO 10006,
- pour l'organisation des essais inter laboratoires, de la norme NF EN ISO/CEI 17043,
- pour les activités d'inspection, de la norme NF EN ISO/CEI 17020.

Le projet qui fait l'objet de ce plan de management de qualité est la thèse GlyphoTAC, thèse qui va se dérouler sur une durée de trois ans dans l'Unité de Pathologies Virales des Poissons (UPVP) du laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané. La problématique de GlyphoTAC s'intègre complètement dans l'axe stratégique « Immuno-écotoxicologie » de l'UPVP qui vise à évaluer l'impact de polluants anthropiques comme des pesticides sur la santé des poissons. Une thèse est un processus unique délimité dans le temps (dates de début et de fin) et entrepris dans le but d'atteindre un objectif. Elle comprend plusieurs éléments de sorties, qui sont notamment la production d'un mémoire de thèse, mais aussi des actions de communication sur les résultats des travaux menés (congrès, journaux à comités de lecture) qui valoriseront le travail à la fois du doctorant et du laboratoire d'accueil. Sur cette

base et en lien avec la politique qualité en place à l'Anses, ce projet sera mené en suivant les recommandations de la norme ISO 17025 (exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais) pour la gestion des ressources et de la norme ISO 10006 (Lignes directrices pour le management de la qualité dans les projets) pour la gestion des projets.

Mots clefs : Projet de thèse, Management qualité, Amélioration continue, Procédures, Normes ISO 17025 et 10006

A.2 Le champ du Plan de Management Qualité de la thèse

Genèse du projet Pour assurer sa productivité, l'agriculture moderne s'est tournée ces dernières décennies vers un usage massif de composés chimiques qui sont désormais omniprésents dans notre environnement. Le glyphosate, substance active (SA) co-formulée dans des herbicides tels que le Roundup, est l'un des composés pesticides les plus fréquemment retrouvés dans le milieu aquatique au niveau mondial. Un débat existe autour du maintien de son autorisation de mise sur le marché en Europe du fait de résultats scientifiques en apparence contradictoires sur sa toxicité vis-à-vis des espèces "non- cibles". Ce débat est à l'origine des difficultés récentes des états membres de l'Union à trouver une position commune quant à la régulation de son usage tant au niveau des particuliers que des professionnels. Le point majeur de discussion tient sur le fait que seule la substance active est intégrée dans les études d'évaluation du risque environnemental de l'usage de cette substance alors que de nombreux composés adjuvants lui sont associés dans les formulations commerciales. La littérature scientifique suggère que certaines de ces substances adjuvantes présenteraient une toxicité plus élevée que la SA. Face à ce constat, le projet GlyphoTAC propose, au travers d'un plan expérimental complexe visant à produire un matériel biologique unique, d'apporter des éléments de réponse concernant une éventuelle toxicité différentielle et transgénérationnelle entre la SA seule ou co-formulée. Les infrastructures expérimentales à disposition au sein de l'UPVP ainsi que son expertise pour l'élevage de la truite arc-en-ciel (TAC) font de cette unité un lieu idéal pour conduire une étude de contamination chimique chronique sur cette espèce sentinelle.

Management de la qualité du projet GlyphoTAC L'UPVP gère depuis de très nombreuses années un mandat de laboratoire national de référence (LNR) pour les maladies réglementées des poissons. Cette activité de référence est menée sous management de la qualité en suivant les exigences de la norme ISO 17025. L'unité est accréditée par le COFRAC Essais sous le numéro 1-2251 pour la réalisation de diagnostics en virologie et sérologie (programme LAB GTA 32) et en biologie moléculaire (programme BIO MOL SA). Le management qualité, initialement instauré pour cette activité spécifique, est appliqué à l'ensemble des activités de l'Unité. Le projet GlyphoTAC va ainsi pouvoir profiter de cette gestion en matière de moyens matériels et humains.

D'autres analyses pourront être réalisées dans d'autres unités du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, notamment l'unité Génétique Virale et Biosécurité (UGVB; RNAseq, épigénétique), qui héberge la plateforme de séquençage haut débit de l'Anses. Bien que non accréditée, cette unité dispose d'un système de management de la qualité permettant d'assurer la fiabilité des analyses et des traitements bio-informatiques qui y sont menés.

Des analyses pourront être sous-traitées à différents laboratoires comme le CEDRE de Brest ou EPOC à l'Université de Bordeaux. Afin d'assurer une couverture complète des travaux menés dans le cadre de cette thèse, il sera demandé à ces partenaires externes de prendre connaissance de ce plan qualité et de s'engager à assurer une traçabilité des résultats des essais qui seront menés dans leurs locaux.

A.3 La Politique de Management Qualité du Laboratoire et de l'unité

La politique qualité est mise en œuvre, sous l'autorité du Directeur du Laboratoire, par le Service de Management de la Qualité (SMQ) qui mène une activité transversale sur l'ensemble des unités et services expérimentaux du laboratoire en s'appuyant notamment sur des correspondants qualité et métrologie. L'accréditation par le COFRAC Essais de six unités vaut pour leur application du référentiel NF ISO 17025. L'équipe du SMQ est composée par un responsable qualité, un responsable métrologie et une secrétaire. Pour l'UPVP, les correspondants qualité et métrologie qui font le lien avec le SMQ localisé sur le site de Ploufragan sont respectivement Lénaïg Louboutin et Fabrice Almeras.

La documentation qualité du laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort s'organise en une file de documents reliés entre eux et allant du plus général au plus précis. En tête de la documentation se trouve le manuel qualité (MQ). Viennent ensuite des procédures qui décrivent précisément des tâches spécifiques (Quoi faire). Ces dernières sont associées à des modes opératoires qui permettent de décrire la réalisation pratique de tâches (Comment le faire). Les étapes y sont décrites par ordre chronologique, permettant à n'importe quel utilisateur de réaliser l'opération, et l'ensemble des éléments (p. ex. réactifs, matériel) nécessaires y sont listés. Enfin, des supports d'enregistrement permettent d'apporter la preuve de la réalisation d'opérations (p. ex. fiche personnelle, plan d'intégration, traçabilité des analyses avec équipements et réactifs utilisés, suivi des stocks) et des listes viennent compléter le système (p.ex. organigramme, liste des réactifs critiques). Le plan de management de la qualité de la thèse est lui-même intégré dans cette documentation qualité. Pour le laboratoire la procédure qui gère la gestion de projet selon la norme ISO 10006 est dénommée P.ESS.P1 (PLOU/PG/0022).

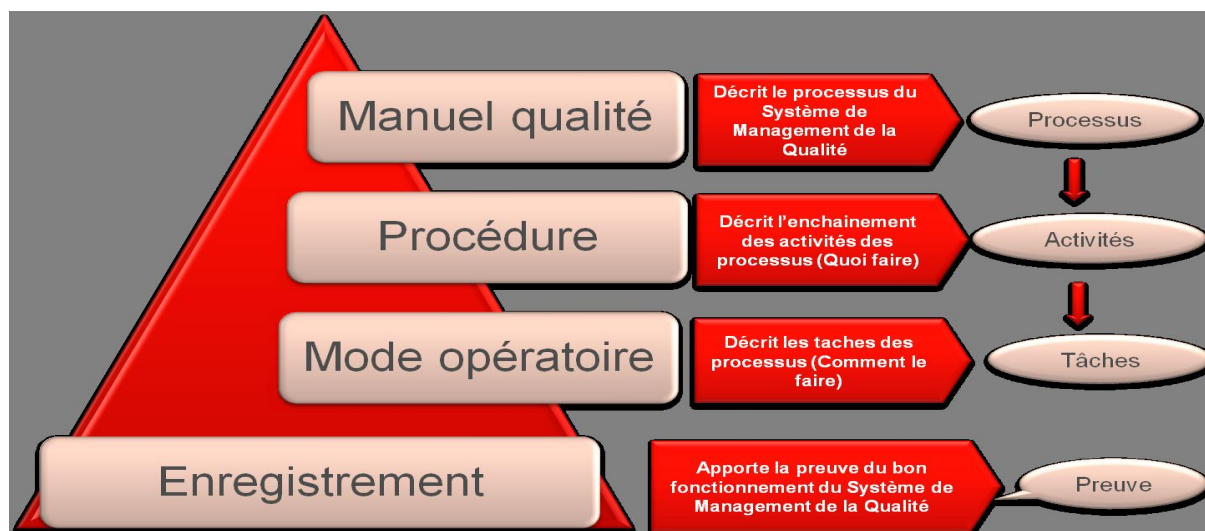


FIGURE A.2 – Structuration de la documentation qualité. Source : http://qualite.master.utc.fr/site_public/travaux/2011/qpo/ST02/aissat/index.htm

A.4 Les acteurs du projet

Le directeur de thèse Il s'assure, en amont du démarrage du projet, que les objectifs scientifiques soient clairs et pertinents et que les étapes du projet permettent d'apporter des réponses. Il nomme le chef de projet et participe aux comités de suivi individuel réguliers.

Le chef de projet Le chef du projet GlyphoTAC est Morgane Danion, Chargée de projets de recherche en charge de la thématique Immuno-Ecotoxicologie au sein de l'UPVP. Elle a pour rôle de veiller au bon déroulement du projet (p. ex. acquisition des outils, réalisation technique, planification, soutien à la valorisation), de coordonner les différents acteurs internes et externes, et de mettre en place le comité de suivi individuel de la thèse.

Le chef d'unité En relation avec la chef de projet, Thierry Morin i) gère l'accueil du Doctorant, en accord avec les procédures qualité en place (p. ex. découverte du laboratoire et du personnel, entretiens d'accueil tracés dans une fiche dédiée, élaboration d'une fiche personnelle et d'un plan d'intégration, fiche de tutorat pour le volet expérimentation animale) ; ii) s'assure, tout au long de la thèse, que l'environnement du projet (p. ex. crédits de fonctionnement, support technique, équipements) est favorable. Il réalise, avec la chef de projet, un entretien annuel d'évaluation (EAE) du doctorant où sont abordés les réalisations scientifiques de l'année écoulée, les objectifs de l'année à venir (dont les actions de communication) et où sont discutées les actions de formation.

A noter que dans le cadre de Glyphotac, Morgane Danion et Thierry Morin assurent un co-encadrement de la thèse en appui de Daniel Dory.

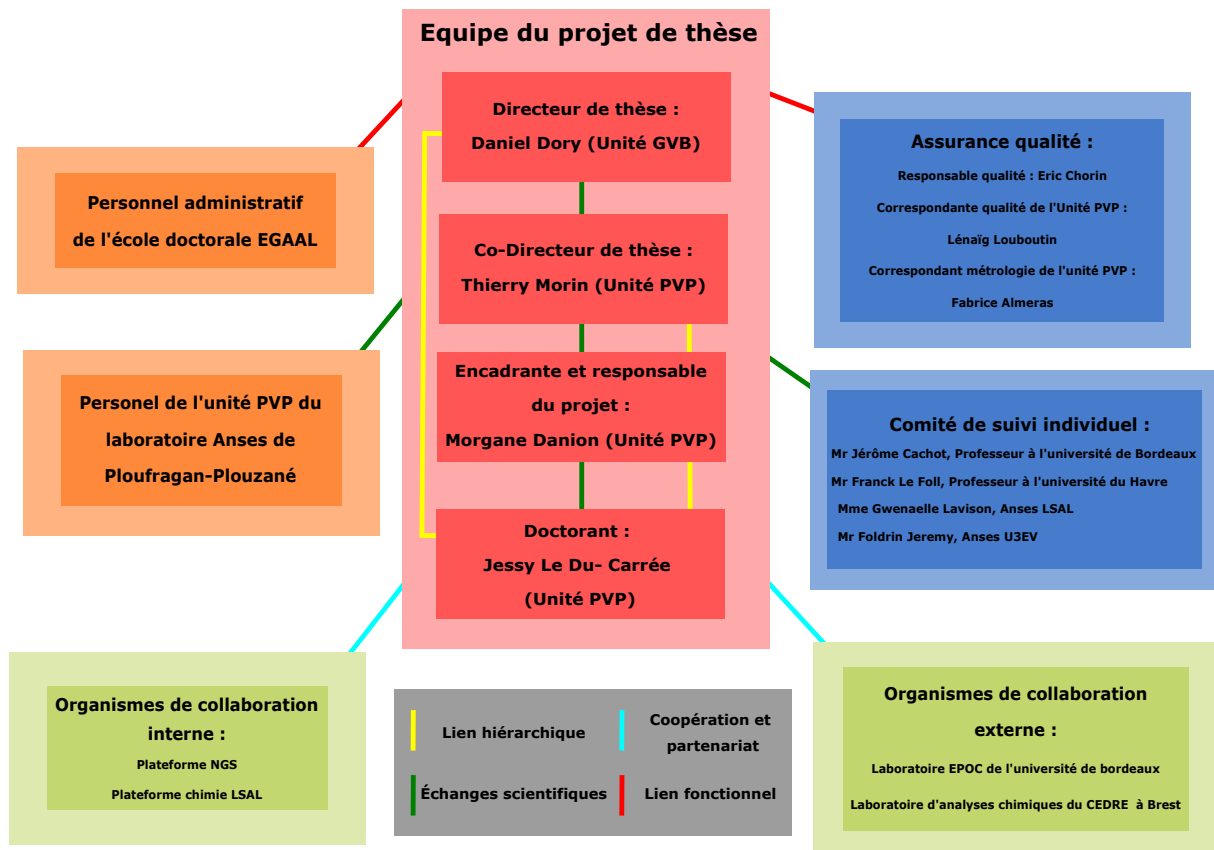


FIGURE A.3 – Organigramme du projet de thèse

Structuration des acteurs de la décision Ce projet de thèse est dirigé par Daniel Dory, chargé de projets Recherche en immunologie dans l'unité GVB localisée à Ploufragan. La codirection de ce projet est assurée par Morgane Danion et Thierry Morin, de l'UPVP.

Organigramme du projet de thèse L'organigramme du projet de thèse, décrivant les interactions entre les différents intervenants externes et internes du projet, est présenté dans la figure A.3.

Comité de suivi individuel Le comité de suivi individuel de la thèse a pour objectif de s'assurer du bon avancement du projet. La réunion annuelle entre l'équipe d'encadrement et ce comité conditionne la réinscription du doctorant pour une nouvelle année. Le rôle de ce comité est d'apporter un appui scientifique, car il peut recadrer le travail si la voie empruntée éloigne le projet de son but initial ou si des difficultés techniques sont rencontrées. Il peut aussi intervenir pour gérer différents conflits ou désaccords entre le doctorant et son équipe encadrante. Les membres de ce comité sont :

- Mr Jérôme Cachot, Professeur à l'université de Bordeaux
- Mr Franck Le Foll, Professeur à l'université du Havre
- Mme Gwenaëlle Lavison, Anses LSAL
- Mr Foldrin Jeremy, Anses U3EV

Formations Deux formations sont apparues prioritaires durant la première année de la thèse : i) la formation à l'expérimentation animale de niveau 1, nécessaire afin de permettre une gestion autonome des expérimentations animales ; ii) la formation au management de qualité, permettant de comprendre le système en place au sein du laboratoire et son organisation. D'autres formations pourront être planifiées au fil du projet telles que l'utilisation d'équipements spécifiques du laboratoire, les outils d'analyse statistique ou encore la valorisation scientifique.

Prise en charge du suivi qualité de la thèse Éric Chorin, responsable du SMQ, est chargé de la mise en œuvre et du suivi du management qualité de la thèse. Au cours d'un premier rendez-vous, il a exposé les objectifs de la réalisation d'une thèse sous un management qualité ainsi que la marche à suivre pour la rédaction de ce document. Par la suite, il sera chargé de valider ce plan, mais également d'en évaluer la bonne mise en application et ce à différents temps du projet. Si les éléments d'organisation indiqués dans ce document sont correctement appliqués, il pourra certifier, au terme du projet, que celui-ci a bien été mené sous management qualité.

A.5 La conduite du projet

A.5.1 Un projet formalisé

Descriptif succinct du projet de thèse Le projet GlyphoTAC propose d'évaluer comparativement les impacts liés à une pollution simple (SA seule) versus une pollution complexe (produit commercial avec co-formulants). Les effets directs et transgénérationnels d'une exposition chronique in vivo au glyphosate seront mesurés sur des géniteurs de truite arc-en-ciel (TAC) et leur descendance. Cette approche intègre l'étude des perturbations induites sur les défenses immunitaires et antioxydantes et le succès à la reproduction à l'échelle moléculaire et cellulaire, ou encore sur le potentiel global de défense d'un organisme contaminé face à une maladie infectieuse. La quantification du glyphosate dans les chairs de poisson permettra d'estimer le risque de bioconcentration et d'émettre des recommandations sur la détermination des doses maximales sans effet prévisible pour mieux protéger l'environnement et l'homme.

Les différentes tâches du projet Le programme prévisionnel du projet a été réalisé avant le début de la thèse par l'équipe d'encadrement. Il est divisé en six tâches opérationnelles : T1 - État de l'art bibliographique ; T2 - Développement de nouveaux outils diagnostiques en biologie cellulaire et moléculaire ; T3 - Expérimentations animales (contamination chimique, épreuves virales, reproduction) ; T4-T5 - Évaluation des effets du glyphosate sur les géniteurs et la descendance ; T6 - Valorisation des résultats obtenus. Le calendrier prévisionnel du travail et les livrables sont détaillés dans la figure A.4. Il intègre les objectifs en termes de valorisation (écriture d'une revue de synthèse proposant un état de l'art sur la problématique de l'impact du glyphosate, de plusieurs articles et du manuscrit de thèse).

	janv-18	juil-18	janv-19	juil-19	janv-20	juil-20
	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4	Semestre 5	Semestre 6
Tâche 1				REVUE		
Tâche 2						
Tâche 3						
Tâche 4				ART 1	ART 2	
Tâche 5-a						ART 3
Tâche 5-b						ART 4
Tâche 6						THESE

FIGURE A.4 – Programme prévisionnel du projet de thèse

Documentation liée au projet Toutes les informations liées au projet sont stockées dans le dossier personnel de l'étudiant sur le réseau intranet de l'unité. De plus, toutes les actions associées au projet (expérimentations, manipulations en laboratoire et cheminements intellectuels) sont consignées dans le cahier de laboratoire dédié au projet.

A.5.2 Des étapes de revue

Tous les ans, une réunion avec le comité de suivi individuel de la thèse est organisée afin de faire le point sur les avancées du projet ainsi que sur les éventuels problèmes rencontrés.

Le comité de suivi individuel peut alors proposer de réorienter tout ou partie du projet, en mesurant l'impact sur les objectifs initialement fixés et en s'assurant que le travail global fournit au terme des 3 ans sera qualitativement et quantitativement satisfaisant. Cette réunion est impérative pour permettre la réinscription annuelle du doctorant à l'école doctorale.

Des réunions informelles quotidiennes avec la chef de projet permettent de remettre en perspectives les actions à réaliser et de s'assurer du suivi des directives nécessaires à l'accomplissement des différentes tâches. L'objectif est qu'au fil du temps, une autonomie dans la gestion quotidienne des tâches se fasse et que le doctorant s'approprie son sujet et soit source de propositions. Des échanges complémentaires quand nécessaire avec le codirecteur de thèse permettent un appui à la fois scientifique, dans le cas d'incertitudes sur le déroulement des analyses et expérimentations, mais aussi administratif. Des échanges trimestriels avec le directeur de la thèse permettent un appui scientifique sur les grandes prises de décisions du projet, mais aussi un suivi du bon déroulement de la thèse.

Au niveau de l'unité, des réunions régulières regroupant tout le personnel permettent de diffuser des informations diverses (p. ex. points administratifs, financiers, expérimentations animales planifiées, projets déposés, points sur les activités du LNR) et de présenter / discuter des projets de recherche en cours. En complément, des réunions mensuelles hygiène et sécurité permettent à l'équipe

d'aborder différentes questions liées au bien-être au travail et de discuter d'améliorations fonctionnelles. Au niveau du laboratoire de Ploufragan-Plouzané, une animation scientifique est en place. Elle est généralement réalisée une fois par semaine, entre 12 et 14h. Le personnel de l'UPVP peut y contribuer et y participer, soit de manière présentielle (notamment si une présentation est prévue), soit par visioconférence.

Le projet peut être révisé si les revues périodiques susmentionnées mettent en avant une telle nécessité. Dans ce cas, il y aura une concertation en premier lieu avec le doctorant, la chef de projet et le reste de l'équipe du projet. Le comité de suivi individuel peut en dernier recours trancher face à un désaccord persistant au sein de l'équipe projet.

A.5.3 Traçabilité

L'ensemble des actions et des cheminements intellectuels sont consignés dans le cahier de laboratoire dédié au projet. Ce dernier est examiné tous les mois par la chef de projet qui, après validation, contresigne en bas de page (possibilité à ce niveau d'indiquer « vu de la page xx à yy »). En complément, tous les résultats et documents associés au projet sont stockés sur le serveur de l'unité. Une nomenclature explicite comprenant notamment les noms des différentes expérimentations, permet à n'importe quel utilisateur de pouvoir remonter jusqu'au dossier voulu. Ce projet devant générer énormément d'échantillons, un système d'identification spécifique a été mis en place, pour chaque événement de prélèvement. Il est expliqué sur une fiche disponible sur le serveur de stockage de l'unité dans le dossier (lui-même placé dans le dossier personnel de l'étudiant) portant le nom de la manipulation en cours (voir un exemple en annexe A.11.1)). En complément, le cahier de laboratoire reprend l'explication du codage des échantillons et la date d'échantillonnage. Il précise également le mode et le lieu de stockage des prélèvements.

A.5.4 Revues du système de management de la qualité

Un audit interne est programmé à l'issue de la première année de thèse. Il est réalisé par le responsable du SMQ et a pour objet de vérifier la bonne application des directives inscrites dans le présent document. À la suite de ce premier audit, un rapport est réalisé puis transmis aux membres du comité de suivi individuel de thèse. Ce rapport décrit le contrôle de l'efficacité et de l'application des mesures prises, il peut aussi mentionner d'éventuelles actions d'amélioration à mettre en œuvre. Un deuxième audit peut avoir lieu sur l'avis du responsable qualité lors de la deuxième ou troisième année de thèse. La mise en évidence d'un éventuel écart, lors de ces différents audits, peut amener à une révision du plan management qualité de la thèse.

A.5.5 Contrôles pour la qualité du résultat final

Au cours des réunions annuelles du comité de suivi individuel ainsi que lors des différentes réunions périodiques organisées au sein de l'équipe du projet, la vérification de l'avancement du projet sera menée grâce au contrôle de :

- la bonne réalisation ou de l'achèvement des différentes expérimentations prévues (T3) ;
- l'obtention des différents livrables identifiés dans le planning de thèse (confère figure A.4).

Des ajustements des livrables / objectifs pourront être réalisés en fonction de l'avancement général et des éventuelles difficultés rencontrées. Ils sont actés par l'équipe du projet après avis du comité de suivi.

Au cours du projet, il est nécessaire d'inclure des témoins positifs et négatifs dans chaque essai. Ces contrôles permettent d'assurer la fiabilité et de valider les résultats finaux. Les témoins négatifs permettent d'analyser à partir des commémoratifs tout écart non prévisible. Des témoins positifs et négatifs sont inclus dans tous les essais réalisés au sein de l'unité PVP tels que des poissons non contaminés ou uniquement contaminés à la substance active lors des expositions chimiques, des poissons non infectés et infectés au virus lors des épreuves infectieuses, mais également des échantillons témoins lors de la réalisation des analyses en cytométrie de flux, spectrométrie ou encore pour les qPCR. Pour les analyses d'activités enzymatiques en microplaques, si une gamme étalon n'est pas réalisée, un même mélange de plusieurs échantillons est systématiquement déposé sur chaque microplaques afin de valider les différents cycles de mesures.

A.5.6 Processus de management des risques

Les principaux risques associés au projet et les mesures mises en place pour en limiter les impacts sont :

- La perte d'une partie ou de la totalité de lots de poissons. En effet, l'étude portant sur une exposition de longue durée (2 ans) de truites arc-en-ciel, la perte de poissons en expérimentation peut mettre en péril tout ou partie du projet. Un soin et une rigueur particuliers seront donc mis dans la maintenance des lots ainsi que la surveillance des paramètres abiotiques d'élevage. Le doctorant sera formé dès son arrivée aux principales tâches en lien avec l'élevage et l'expérimentation puis accompagné d'un tuteur durant ses premiers mois dans l'unité. Il sera également formé, dès qu'une session sera planifiée, au niveau I en expérimentation animale. Un risque majeur de perte de lot, outre un problème zootechnique, peut être une infection. L'UPVP réalise, dans des salles dédiées, de nombreuses contaminations expérimentales avec différents agents pathogènes (virus en particulier). Une contamination croisée peut avoir lieu, même si des mesures d'hygiène drastiques (pédiluve, changement systématique de blouse et désinfection des mains en entrée et sortie de chaque salle expérimentale) ainsi qu'une marche en avant sont mises en place.
- L'arrêt de la contamination chimique chronique. La contamination chimique sera réalisée chaque jour ouvré. Une interruption de cette dernière pourrait perturber le plan expérimental du projet. Plusieurs personnes de l'équipe ont été formées pour pouvoir assurer la contamination pendant les absences du doctorant (déplacement professionnel, congé, formation, arrêt maladie). La maintenance du charbon actif, élément nécessaire pour traiter les effluents contaminés

chimiquement en amont de leur rejet, est assurée et suivie par le personnel de l'unité, ce qui permet une certaine réactivité d'intervention et une maintenance rapide n'impactant que peu le programme de contamination.

- Des problèmes techniques dans la réalisation des analyses. Une partie des techniques utilisées pour mesurer l'impact du glyphosate sont en place au sein du laboratoire et ne poseront pas de problème pour leur réalisation (sachant qu'une phase de formation est systématiquement prévue). Pour les méthodes / approches plus novatrices comme l'étude de la méthylation de l'ADN ou le RNAseq, il est prévu de s'appuyer sur des protocoles publiés et/ou des structures expertes.
- Un problème de financement qui impacterait l'achat de réactifs ou la réalisation d'une partie des expérimentations. Le Chef d'Unité s'est assuré, en amont du démarrage de la thèse, que les financements acquis et les projections sur les 3 ans à venir permettraient d'assurer sans difficulté les frais de fonctionnement ainsi que des missions (congrès, formations). Des demandes de financements complémentaires pourront néanmoins être faites durant le déroulé du projet pour appuyer un déplacement (bourse à la mobilité) ou financer des analyses complémentaires.
- Une absence de résultats. Le travail étant axé sur l'expérimentation *in vivo* et le rôle supposé du glyphosate seul ou co-formulé sur différents biomarqueurs de la truite, il est possible que les résultats générés ne permettent pas de mettre en évidence un/des impacts significatifs. Pour garantir l'obtention de résultats de qualité et innovants, des approches multiples et des outils divers seront utilisés. Quels que soient les résultats, ceux-ci pourront faire l'objet d'une valorisation.
- Une difficulté à mener l'ensemble des actions prévues. Celles-ci sont en effet multiples et le programme de travail ambitieux. Si nécessaire, des choix stratégiques seront faits par l'équipe du projet en cours de thèse pour prioriser certains axes, en concertation avec le comité de suivi.

Revue complète des résultats lors de la clôture du projet

L'aboutissement du projet sera concrétisé par la rédaction du mémoire de thèse. Ce document sera évalué par un jury de thèse qui pourra mettre en évidence les résultats les plus pertinents obtenus au cours du projet. L'écriture de plusieurs publications scientifiques permettra également de valoriser devant la communauté scientifique les résultats originaux obtenus tout au long du projet. Ce projet devrait permettre d'améliorer la définition du risque écotoxicologique associée au glyphosate, et plus particulièrement à une exposition prolongée. La conception du plan expérimental permettra de mettre en évidence les effets toxiques de la substance active seule comparée aux effets observés en présence d'adjuvants. Les résultats obtenus seront d'intérêt quant à l'éventuelle prise en compte des adjuvants pour l'évaluation du risque associé à des produits phytosanitaires à base de glyphosate. La quantification de la substance active ainsi que de ses métabolites dans les tissus des poissons, par analyse chimique, permettra d'obtenir une première estimation du risque potentiel pour le consom-

mateur. Enfin, les différents biomarqueurs qui auront été mis au point durant le projet, et dont les méthodes seront décrites en détail dans le mémoire de thèse, pourront être réutilisés par l'équipe du laboratoire pour d'autres projets d'écotoxicologie.

A.6 Les équipements

La norme ISO 17025 régit la gestion de l'inventaire et du suivi du matériel utilisé au sein de l'UPVP. Ainsi, chacun des matériels se voit attribuer un code, permettant son identification et son suivi. Des fiches d'inventaire et de suivi des interventions menées, la documentation technique fournie par le fabricant ainsi qu'un éventuel mode opératoire leurs sont également associés. Pour chaque appareil du laboratoire est identifié un responsable et un suppléant qui sont les personnes référentes pour la gestion des opérations de maintenance ou la résolution de problèmes.

Contrôle métrologique Le correspondant qualité de l'unité a la charge du contrôle des équipements de mesures et d'essais. En fonction de la nature de ces équipements, ces contrôles sont initiaux, périodiques et/ou routiniers. Une station de suivi des températures utilisant des sondes sans-fil est présente dans l'unité et permet de réaliser un suivi en continu des enceintes thermostatées, des surgélateurs, des réfrigérateurs et des eaux alimentant la zone d'élevage extérieure et les salles expérimentales. A noter que sur cette centrale sont également rapportées les valeurs redox du système d'ozonation des effluents.

Installations expérimentales L'UPVP dispose d'un élevage de TAC au statut sanitaire contrôlé et de 6 salles d'expérimentation qui peuvent être alimentées en eau douce et en eau de mer. Des échangeurs permettent de réguler la température de l'eau et de réaliser des essais en eau réchauffée ou réfrigérée selon les exigences des protocoles expérimentaux. Dans ces salles, les essais sont réalisés selon la taille des poissons, en bacs de 200 litres, 50 litres ou en aquariums de 15 litres. L'oxygénation de l'eau se fait grâce à des conduites d'air comprimé qui alimentent chacun des bacs. Les animaux font l'objet d'une visite à minima journalière, et ce 7 jours/7.

L'unité a reçu un agrément de la Préfecture du Finistère pour ses activités expérimentales poissons (n° D 29-212-03 de mai 2014). Tous les protocoles réalisés au sein de l'unité sont soumis pour avis au ministère de la Recherche via le Comité d'Éthique n° 16 selon la procédure P.BEA.S1.

A.7 Les consommables

Les consommables utilisés dans le laboratoire de Ploufragan- Plouzané sont gérés selon les directives de la norme ISO 17025. Au niveau de l'UPVP, la gestion des consommables fait l'objet d'une procédure spécifique dénommée PLOU/PS/0062. Cette procédure précise la définition et la nature des produits consommables, les modalités de commande, de réception, d'identification, de stockage et

de gestion des stocks. Pour chaque produit, l'utilisateur renseigne la fiche ENR001 – PLOU/FSE/0307 « produits consommables » ou il devra indiquer son nom, la quantité de produit retirée, la date ainsi que la quantité restante.

A.8 Les locaux

L'UPVP est localisée sur le site Ifremer de Plouzané, à l'adresse suivante : Technopôle Brest Iroise, CS 10070, 29 280 Plouzané, France, Bâtiment numéro 811. L'entrée sur le site de l'Ifremer se fait via un poste de garde dès 7h le matin jusqu'à 20h30 le soir. Le personnel de l'unité est autorisé (via une déclaration à la Direction de l'Ifremer et un paramétrage du logiciel de contrôle des accès au site du chef d'unité) à se rendre sur site le samedi et le dimanche afin de réaliser les gardes. Le bâtiment où est localisée l'unité dispose de trois portes d'accès. Toutes sont fermées en permanence et possèdent un contrôle d'accès par carte magnétique individuelle, ce qui permet de tracer les entrées et sorties du personnel Anses et de la société de maintenance.

Circulation dans le bâtiment Le circuit des échantillons et des personnes dans l'unité est décrit par la procédure PLOU/PS/0075. Dans les couloirs, bureaux et laboratoires du bâtiment, le personnel circule avec une blouse et des chaussures de laboratoire, excepté pour le laboratoire de virologie qui nécessite un nouveau changement vestimentaire (blouse + chaussures). Des blouses vertes sont portées au niveau des salles où sont manipulés des poissons non infectés, et des blouses rouges dans les salles dédiées aux expérimentations infectieuses. Les échantillons contaminés doivent être maintenus dans des containers fermés pendant leur transport dans les couloirs du bâtiment. Aucune restriction n'est faite pour le matériel et les produits non contaminés.

Élimination des déchets Les déchets présentant un risque biologique sont placés dans deux types de containers adaptés en fonction de leurs natures :

- Poubelle de risque biologique en carton : Pour les objets mous ou ne présentant aucun risque de coupure ou de perforation (p. ex. cônes de micropipette, papier, parafilm)
- Poubelle de risque biologique en plastique rigide : Animaux morts et autres déchets issus des salles expérimentales ainsi que déchets coupants ou tranchants (métaux, verres). L'ensemble de ces déchets est ensuite pris en charge par une entreprise spécialisée dans la gestion des produits à risque biologique.

Gestion des effluents La totalité des effluents issus des salles expérimentales est traitée par un système d'ozonation permettant la dégradation de tout agent microbiologique avant rejet dans la nature. Les effluents qui ont été en contact avec des produits chimiques subissent, en amont de leur ozonation, une dépollution via un passage sur un filtre à charbon actif. Le charbon actif est renouvelé régulièrement (contrôles effectués pour vérifier ses capacités de rétention et détecter un début de

saturation). Le charbon actif usagé est décontaminé à la javel puis évacué et traité par une entreprise spécialisée qui se charge de sa décontamination chimique. La procédure PLOU/PS/0074 décrit les modalités d'élimination des déchets de l'unité PVP.

A.9 La gestion des écarts

A.9.1 Les non-conformités

Une non-conformité doit être vue, selon la norme ISO 9000, comme une non-satisfaction des exigences prédéfinies dans un référentiel qualité ou du produit final par rapport à ce qui était convenu avec un client. Elle est généralement la conséquence d'une dérive qui peut avoir plusieurs origines : erreurs du personnel, non-maîtrise du matériel ou encore difficultés de management. La procédure générale définissant la gestion des non-conformités au laboratoire de Ploufragan-Plouzané est nommée PLOU/PG/0001. Cette procédure précise les modalités à suivre face à la détection d'une non-conformité ou d'un risque de non-conformité. La détection est l'affaire de tous et tous les membres de l'unité, le doctorant bien évidemment inclus, peut ouvrir une fiche de non-conformité (ENR1007 – PLOU/FGE/0008 « Fiche de progrès ») suite à l'observation d'un problème. Le gestionnaire de cette fiche (désigné en fonction de la nature de la non-conformité) y indique les actions curatives prises pour résoudre le problème, ainsi que les éventuelles mesures correctives ou préventives à mettre en place. Il s'agit là l'un élément important du processus d'amélioration continue de l'unité et du laboratoire.

A.9.2 Les non-confirmations

Une non-confirmation consiste à fournir des preuves tangibles permettant d'infirmer des hypothèses émises *a priori*. Toute non-confirmation doit être considérée comme un résultat à part entière et est donc consignée dans le cahier de laboratoire associé au projet. Les causes de la non-confirmation peuvent faire l'objet d'investigations et amènent potentiellement à une modification de la planification initiale du projet.

A.10 La communication

Mémoire de thèse L'aboutissement du projet de thèse sera concrétisé par la rédaction d'un mémoire rédigé selon les exigences décrites dans le règlement intérieur de l'École Doctorale (ED) EGAAL.

Communications orales et écrites Durant la thèse, plusieurs présentations orales et écrites (posters) lors de congrès (nationaux et internationaux) sont prévues. L'exigence minimale de l'ED EGAAL pour permettre la soutenance de thèse est la réalisation d'une présentation orale et écrite dans un congrès international.

Publications dans des revues scientifiques Les différents résultats obtenus durant la thèse seront valorisés via la publication d'articles soumis à des revues scientifiques à comité de lecture, si possible de rang A et A+.

A.11 Annexe

A.11.1 Exemple de nomenclature des tubes pour les prélèvements : manipulation "Exposition aiguë"

Pour identifier la condition d'exposition chimique (code de lettre) :

Les lettres de part et d'autre du signe "/" désignent le traitement chimique subi : "C" pour "Témoin", soit pas de contamination chimique; "G" pour le glyphosate pur; "R" pour "Roundup®" soit le produit phytosanitaire N° 1; "V" pour "Viaglif®" soit le produit phytosanitaire N° 2. À gauche du signe "/", l'exposition des parents (transgénérationnelle (via la contamination des parents) et à droite du signe "/", l'exposition directe.

- C/C : A
- G/C : B
- R/C : C
- V/C : D
- C/G : E
- G/G : F
- C/R : G
- R/R : H
- C/V : I
- V/V : J

Pour identifier les répliquas de condition : Numéro du répliqua de condition : Exemple pour les poissons du 2^{ème} bac C/C : A2

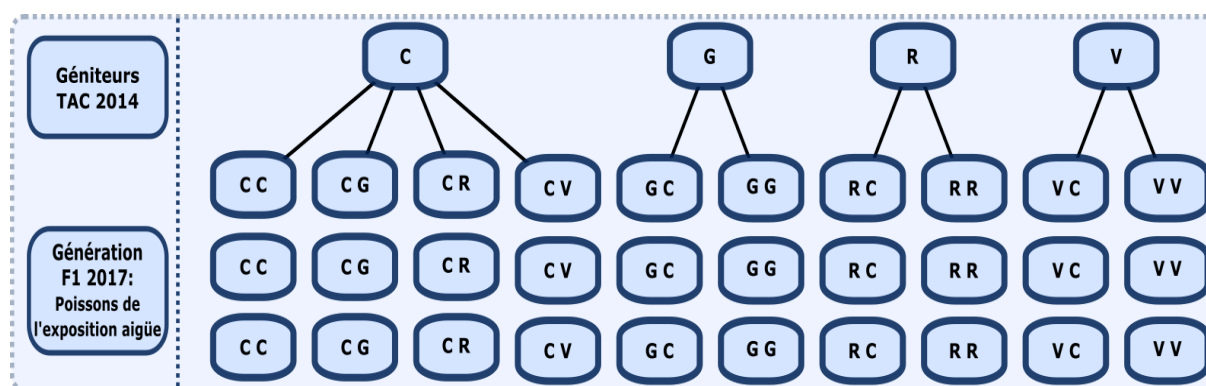


FIGURE A.5 – Schéma des différentes conditions de la manipulation "Exposition aiguë".

Pour identifier le type de prélèvement : F pour le foie, C pour le cerveau, B pour branchie et P pour le poisson sans la tête, la queue, les viscères et le sang Exemple pour les échantillons de cerveau des poissons du 2e bac C/C : A2C

Pour identifier le numéro d'échantillon : Les organes cibles de trois poissons sont "poolés" par ordre d'échantillonnage : Numérotation de 1 à 3 pour les trois pools par répliqua par condition. Exemple pour les poissons prélevés en 4e, 5e et 6e position, composant le deuxième pool de cerveau des poissons du 2e bac C/C : A2C2 Les échantillons de sang sont numérotés de 1 à 90 en sachant que les prélèvements seront réalisés dans l'ordre des conditions : A, B, C, D, E, F, G, H, I et J et des répliquas de bacs : 1, 2 et 3

Les échantillons sont rangés par type d'organes et l'ensemble est placé dans une boîte annotée du nom de l'expérimentation, de la date du prélèvement et de l'événement du prélèvement : Exemple pour le premier prélèvement de l'exposition aiguë : Acute-02/04/18-96h.

Annexe B

Formations doctorales et pédagogie

J'ai suivi au cours de ma thèse différentes formations, qui sont présentées dans le tableau B.1.

Ce projet m'a donné l'opportunité de superviser l'encadrement de deux stagiaires de Master 2 :

- Mr Florian SALIOU (Master 2 Biologie Santé, mention Physiologie des Régulations, Université de Bretagne Occidentale, 1er semestre 2019) : "Étude comparative des effets d'une exposition intergénérationnelle ou directe au glyphosate seul ou à deux herbicides à base de glyphosate (Roundup Innovert[®] et le Viaglif Jardin[®]) sur la physiologie de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) au stade larvaire"
- Mme Rania BOUKHARI (Master 2 Gestion de l'environnement parcours Écotoxicologie, Université de Lorraine, 1er semestre 2020) : "Étude comparative des effets d'une exposition inter-, trans- et multigénérationnelle au glyphosate seul ou à deux herbicides à base de glyphosate (Roundup Innovert[®] et Viaglif Jardin[®]) sur différents stades de développement de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)"

Cet encadrement m'a permis de renforcer mon sens de la pédagogie, en les accompagnant dans les expérimentations à mener au laboratoire, mais aussi dans la rédaction de leurs mémoires de fin d'études.

Enfin, j'ai pu dispenser un total de 6 heures de cours magistraux sur le thème "Virus pathogènes des poissons d'élevage : diversité, moyens d'étude et de diagnostic, stratégies de contrôle" à des étudiants du Master 2 Microbiologie Rennes-Brest, dans le cadre de l'unité d'enseignement de Virologie de l'UBO.

TABLEAU B.1 – Tableau récapitulatif des différentes formations suivies au cours de la thèse.

Formation	Date	Durée (h)	Lieu	Classe
QuantStudio5	09 et 11/01/18	8,0	ANSES, site Ifremer	Disciplinaire
Publication scientifique	13/03/2018	2,0	BLP site Ifremer	Transdisciplinaire
Formation expérimentation animale	04 au 12/06/2018	61,5	Oniris, Nantes	Disciplinaire
Cytométrie en flux et ses applications au LEMAR	24/09/2018	3,0	IUEM, Brest	Disciplinaire
Latex	04/10/2018	9,5	IUEM, Brest	Transdisciplinaire
Initiation à Unix et à la gestion des big data	21 et 22/01/2019	14,0	Agrocampus, Rennes	Transdisciplinaire
Rna-seq : Analyse bio-informatique sous UNIX	29 et 30/01/2019	15,0	Agrocampus, Rennes	Disciplinaire
Rna-seq : Analyse statistique	07 et 08/02/2019	15,0	Agrocampus, Rennes	Disciplinaire
Introduction à l'Intégrité scientifique	17/05/2019	3,0	UFR Sciences, Brest	Transdisciplinaire
Introduction à Python	15 et 16/04/2019, et 06/06/2019	11,0	IUEM, Brest	Transdisciplinaire

Annexe C

Valorisation du projet GlyphoTAC dans les congrès

J'ai au cours de ma thèse, également pu présenter le projet GlyphoTAC et ses principaux résultats dans différents congrès nationaux et internationaux détaillés dans le tableau [C.1](#).

TABLEAU C.1 – Tableau récapitulatif des congrès dans lesquels le projet a été présenté au cours de la thèse.

Congrès	Date	Lieu
Le Du - Carrée, J. Cabon, J. Louboutin, L. Dory, D. Morin, T. et Danion, M., “Évaluation des effets directs et transgénérationnels d’une exposition prolongée au glyphosate, seul ou co-formulé dans un produit phytosanitaire, chez la truite arc-en-ciel.” Affiche.	5-6 Décembre 2018	Journées Scientifiques et Doctorales de l’Anses, Maisons-Alfort, France
Le Du-Carrée, J. Danion, M. Dory, D. et Morin T., “Objectifs et plan expérimental de la thèse GlyphoTAC (2018-2021) : Évaluation des effets directs et transgénérationnels d’une exposition prolongée au glyphosate, seul ou co-formulé dans un produit phytosanitaire, chez la truite arc-en-ciel. “ Affiche.	23-24 Mai 2018	Colloque Franco-Québécois ECOBIM, Bordeaux, France
Le Du-Carrée, J. Saliou, F. Weeks, S. Cachot, J. Cabon, J. Danion, M. et Morin, T., "Impacts d’une exposition intergénérationnelle au glyphosate, seul ou co-formulé, sur la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)." Communication orale.	4-5 juillet 2019	Journées scientifique ED EGAAL, Rennes
Le Du-Carré, J. Saliou, F. Weeks, S. Cachot, J. Danion, M. et Morin T., "Impact sur la descendance d’une exposition chronique au glyphosate seul ou co-formulé de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)." Communication orale.	1-4 Mai 2019	Colloque ECOBIM, Sousse, Tunisie
Le Du-Carrée, J.* Saliou, F. Cabon, J. Louboutin, L. Weeks, S. Cachot, J. Dory, D. Morin, T. et Danion, M., "Multilevel effects of intergenerational exposure to glyphosate and glyphosate based herbicides on rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)." Communication orale.	3-7 Mai 2020	SETAC Europe, en ligne
Le Du-Carrée, J.*, "Multilevel effects of trans/ inter and multigenerational exposure to glyphosate and glyphosate-based herbicides on rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). Equivalent MT180.	September 8, 2020	Journées Scientifiques et Doctorales de l’Anses, en ligne

Titre : Écotoxicité directe et transgénérationnelle du glyphosate seul ou associé à des co-formulants sur la santé de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : reproduction, immunité et défenses antioxydantes

Mots clés : Écotoxicité, glyphosate, transmission générationnelle, physiologie des poissons, immunité

Résumé : Le glyphosate, substance active herbicide (SA) la plus utilisée dans le monde, est omniprésent dans les eaux de surface. L'évaluation de son écotoxicité et de celle des herbicides commerciaux à base de glyphosate (GBHs) est complexe et controversée. Le glyphosate et ses co-formulants peuvent être toxiques pour les poissons et leurs interactions ainsi que la transmission verticale de cette toxicité sont relativement peu étudiées. La toxicité directe et générationnelle d'une dose environnementale de glyphosate a été évaluée sur plusieurs générations de truites arc-en-ciel exposées chroniquement à la SA et à deux GBHs. L'état de santé des poissons a été déterminé via la mesure de paramètres biométriques, comportementaux et reproducteurs. L'immunité a été appréhendée lors d'infections virales expérimentales. Le métabolisme énergétique et le système antioxydant

ont été suivis avec des marqueurs biochimiques. L'exposition directe aux contaminants n'a pas impacté la physiologie et la reproduction de la génération F0. Des perturbations du développement embryon-larvaire des descendances F1 et F2 ont été induites par les expositions directes, inter et transgénérationnelles; avec un effet suggéré de la réexposition aux composés parentaux. Les modifications observées chez les stades précoces n'ont pas été détectées chez les truites juvéniles, bien que leur susceptibilité virale ait été affectée. La comparaison des effets du glyphosate et des GBHs semble montrer un rôle des co-formulants dans la modulation de la toxicité de la SA. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour approfondir la compréhension liée aux mécanismes complexes de transmission de la toxicité du glyphosate.

Title : Direct and transgenerational toxicity of glyphosate alone or associated to co-formulants on the health status of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : reproduction, immunity and antioxidant defenses

Keywords : Ecotoxicity, glyphosate, generational transmission, fish physiology, immunity

Abstract : Glyphosate is the most used herbicidal active substance (AS) worldwide and is ubiquitous in surface waters. Evaluation of the ecotoxicity of this AS and its commercial formulations called "Glyphosate-based herbicides" (GBHs) is complex and controversial. Glyphosate and its co-formulants could be toxic for fish and little is known about their interactions. The vertical transmission of this toxicity among generations is also poorly studied. We investigated the direct and generational toxicity of environmentally relevant concentrations of glyphosate on several generations of rainbow trout chronically exposed to the AS or two GBHs. Fish health status was evaluated by measuring biometric, compartmental and reproductive parameters. Immunity was considered during experimental viral infections. Energetic metabolism

and antioxidant system were followed up using different biochemical markers. Direct exposure of F0 generation to contaminants did not impact fish physiology or reproduction. F1 and F2 offsprings showed a disturbed embryo-larval development associated to direct, inter and transgenerational exposures; with a suggested effect of a re-exposure to parental compounds. Even if most of the changes observed on early stages were not detected on juveniles trout, their viral susceptibility was significantly affected. Comparisons between glyphosate and GBHs seems to demonstrate a role of the co-formulants in the modulation of the toxicity of the AS. However, further studies will be required to better understand the complex mechanism of glyphosate toxicity transmission and its modulation by co-formulants.