





https://matheo.uliege.be

Travail de fin d'études

Auteur : Vinankpon, Zinhoue Sabine Promoteur(s) : 8790; 8794 Faculté : Faculté des Sciences Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture Année académique : 2021-2022 URI/URL : http://hdl.handle.net/2268.2/16044

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative" (BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



UNIVERSITÉ DE LIÈGE



UNIVERSITÉ DE NAMUR

Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture (GeRAA)

Travail de fin d'étude

Etudes des mécanismes physiologiques et comportementaux altérés par l'exposition à des nanoplastiques lors du développement de l'embryon chez le poisson zèbre (*Danio rerio*)

Réalisé par

VINANKPON Zinhoué Sabine

Promoteurs :

- Professeur Patrick KESTEMONT (UNamur-URBE),
- Docteur Valérie CORNET (UNamur-URBE)

Encadrante :

Mathilde OGER (UNamur-URBE)

Année Académique : 2022-2023

Remerciements

Je remercie le Seigneur pour sa protection sur moi durant tout le séjour d'étude dans le cadre de ce master de spécialisation.

Je voudrais exprimer mes sincères reconnaissances à tous ceux qui m'ont accompagnée d'une manière ou d'une autre pendant ma formation et particulièrement lors de mes travaux de fin d'études. Je pense spécialement à :

- mes promoteurs, le Professeur Patrick KESTEMONT et le Docteur Valérie CORNET de l'Université de Namur pour leur encadrement et leur intérêt accordé à cette étude ;
- mon encadrante Mathilde OGER, pour toutes les connaissances acquises auprès d'elle à travers cette étude dans le laboratoire ;
- l'équipe de l'URBE/UNamur pour leurs aides et leurs orientations tout au long de cette étude ;
- mes collègues du Master GeRAA 2021-2022 ;
- l'équipe de Microplastiques pour l'encadrement ;
- l'ARES-CDD pour l'opportunité offerte

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de tous ceux qui m'ont accompagné depuis mon pays d'origine le Bénin avant et pendant la formation. Je voudrais nommer :

- les professeurs YOUSSAO ABDOU KARIM Issaka (Université d'Abomey-Calavi, Bénin) et Ibrahim IMOROU TOKO (Université de Parakou, Bénin) ;
- Dr Serge AHOUNOU (Université d'Abomey-Calavi)
- mes parents Etienne VINAKPON et Henriette AGBANTCHI;
- mon époux Pascal S. KIKI et notre fille Marie-Honorine D. KIKI

Merci de tout cœur !

Résumé

Les nanoplastiques sont des particules de petite taille présent dans l'environnement. Leur effet sur le développement embryonnaire chez les poissons-zèbre est encore peu connu et nécessite plus de recherche. Notre étude a pour objectif d'élucider les mécanismes physiologiques altérés par l'exposition des nanoplastiques de polystyrène (NPPs) chez le poisson-zèbre au cours du développement embryonnaire. Pour cela, deux types de traitement ont constitué le désign expérimental : exposition des œufs au NPPs (de 2 à 96 hpf) et contrôle (pas d'exposition). Les nanoplastiques utilisés étaient des microbilles avant un diamètre de 250 nm et à une concentration de 1000µg/l. Les paramètres mesurés sur les embryons de 22 à 96 hpf étaient le mouvement des embryons, la fréquence cardiaque et la morphologie des embryons et des larves. A 48 hpf, l'apoptose a été déterminée sur des larves déchorionnées. La consommation de l'oxygène a été évaluée avant (48 hpf) et après (72 hpf) l'éclosion. Enfin, à 96 hpf, le comportement et le tapping ont été observés chez les larves. Il ressort de nos résultats que les NPPs (250 nm ; 1000µg/l) ont induit une faible mortalité sur les embryons à 24 et 48 hpf. Ils n'ont pas eu d'effet sur le métabolisme énergétique des larves avant et après l'éclosion. En fin, les NPPs ont induit une bradycardie chez les larves exposées à 48 et 96 hpf. Cette étude a permis de mieux comprendre l'effet des nanoplastiques sur le développement embryonnaire du poisson-zèbre.

Mots-clés : nanoplastiques, développement embryonnaire de poisson-zèbre, traitement, durée d'exposition.

Abstract

Nanoplastics are small particles present in the environment. Their effect on embryonic development in zebrafish is still poorly understood and requires further research. The objective of our study is to elucidate the physiological mechanisms altered by polystyrene nanoplastics (NPPs) exposure in zebrafish during embrvonic development. For this purpose, two types of treatment constituted the experimental design: exposure of eggs to NPPs from 2-96 hpf and control (no exposure). The nanoplastics used were microbeads with a diameter of 250 nm and a concentration of 1000µg/l. The parameters measured on embryos from 22-96 hpf were embryo activity, heart rate and the morphology of the embryos and larvae. At 48 hpf, apoptosis was determined on dechorionated larvae. Oxygen consumption was assessed before (48 hpf) and after (72 hpf) hatching. Finally, at 96 hpf, behavior and tapping were observed in the larvae. From our results, it appears that NPPs (250 nm; 1000µg/l) induced low mortality on embryos at 24 and 48 hpf. They had no effect on the energy metabolism of the larvae before and after hatching. Finally, NPPs induced bradycardia in exposed larvae at 48 and 96 hpf. This study provided a better understanding of the effect of nanoplastics on zebrafish embryonic development.

Keywords: nanoplastics, zebrafish embryonic development, treatment, exposure time.

Liste des abréviations et acronymes

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- **AO** : Acridine Orange
- **Bpm** : Battement par minute
- hpf : Heure post-fécondation
- **MBT :** Midblastula
- MS 222 : Tricaine méthanosulfonate
- Na2 SO3 : Sulfite de sodium
- **NPPs :** Nanoplastiques de polystyrène
- **PBDE :** Polybromodiphényléther

Table des matières

Remer	ciements ii
Résum	éiii
Abstrac	stiii
Liste de	es abréviations et acronymes iv
Table c	les matièresv
Liste de	es tableauxviii
Liste de	es figuresix
1 Intr	oduction bibliographique1
1.1 C	Contexte et justification1
1.2 G	Sénéralités sur les microplastiques et les nanoplastiques2
1.2.1	Définition et origine des microplastiques2
1.2.2	Le devenir des microplastiques4
1.2.3	Les nanoplastiques4
1.3 G	Sénéralités sur le poisson-zèbre (<i>Dario rerio</i>)10
1.3.1	Classification et importance de poisson-zèbre en expérimentation animale
1.3.2	Développement embryonnaire de Dario rerio11
1.3.3	Stade zygote11
1.3.4	Stade clivage 12
1.3.5	Stade de blastula12
1.3.6	Stade gastrula
1.3.7	Stade de segmentation14
1.3.8	Stade pharyngula14
1.3.9	La Stade de l'éclosion14
1.4 C	Dbjectif du travail
2 Ma	tériels et méthodes15

2.1	Cadre d'étude	15
2.2	Matériels	15
2.2.1	Matériels biologiques	15
2.2.2	Matériel expérimental	16
2.3	Méthode	17
2.3.1	Elevage et reproduction des géniteurs.	17
2.3.2	Constitution de la solution de travail de nanoplastiques de polystyrène.	18
2.4	Dispositif expérimental	18
2.4.1	Mesure de l'activité, de la fréquence cardiaque, de la taille de vitellus et o	de
la lon	gueur de la larve	19
2.4.2	Identification des cellules apoptotiques	19
2.4.3	Evaluation de la respirométrie	20
2.4.4	Analyse des comportements des larves	20
2.4.5	Analyses statistiques	21
3 R	Résultats	22
3.1	Mortalité et taux d'éclosion	22
3.2	Activité des embryons de 22 à 30 hpf	22
3.1	Cellules apoptotiques au niveau de l'œil à 48 hpf	24
3.2	Morphologie des larves de poisson-zèbre	24
3.2.1	Longueur des poissons	24
3.2.2	Surface de l'œil et du sac vitellin à 24, 72 et 96 hpf	25
3.3	Comportement des larves	25
3.4	Consommation d'oxygène	28
3.5	Fréquence cardiaque	28
4 D	Discussions	29
4.1	Rappel des objectifs	29
4.1	Cellules apoptotiques au niveau de l'œil à 48 hpf	30
		vi

4.2	Activité embryonnaire et comportements des larves	31
4.3	Fréquence cardiaque et consommation d'oxygène	32
5	Conclusion	33
Réf	érence bibliographique	34

Liste des tableaux

Tableau 1: Moyennes ± écart type (n=15) de burst count/min des embryons à 22,
24, 26, 28 et 30 hpf23
Tableau 2: Moyennes \pm déviation standard (n=15) de la longueur (µm) des larves
à 24, 72 et 96 hpf 24
Tableau 3: Moyennes ± déviation standard (n=30) de la thigmotaxie (% de la
distance totale parcourue dans la zone périphérique du puits) à 96 hpf27
Tableau 4: Moyennes ± déviation standard (n=9) de la consommation d'oxygène
(nmole/larves) à 48 et 72 hpf 28
Tableau 5: Moyennes ± déviation standard (n=15) de la fréquence cardiaque (bpm)
à 48 et 72 hpf 28

Liste des figures

Figure 1: Rejet des microplastiques dans les océans par source
Figure 2: Distribution des NPPS fluorescents sur la surface du chorion
embryonnaire du poisson-zèbre à 10 hpf(A), 32 hpf (B) et 48 hpf (C) (Duan et al.,
2020)
Figure 3: Bioaccumulation des nanoplastiques à l'intérieur des larves du poisson-
zèbre8
Figure 4: Modifications morphologiques du zygote du poisson-zèbre (Kimmel et al.,
1995)
Figure 5: Etapes du stade clivage d'un embryon de poisson-zèbre (Kimmel et al.,
1995)
Figure 6: Matériel de laboratoire utilisé17
Figure 7: Schéma expérimental18
Figure 8: Paramètres morphométriques mesurés sur la larve à 96 hpf 19
Figure 9: Mortalité embryonnaire (A) à 24 et 48 hpf et taux d'éclosion des œufs à
48, 72 et 96 hpf (B)22
Figure 10: Burst activity des embryons de 22 hpf à 30 hpf 23
Figure 11: Cellules apoptotiques à 48 hpf24
Figure 12: Surface de l'œil (A) et du sac vitellin (B) à 24, 72 et 96 hpf 25
Figure 13: Distance (mm) parcourue par les larves (n=15) pendant les phases jour
et nuit
Figure 14: Distance parcourue en fonction du temps pendant le test de tapping 27

1 Introduction bibliographique

1.1 Contexte et justification

Le terme «plastique » est utilisé dès le début du 17^e siècle, pour désigner une substance pouvant être moulée ou façonnée à chaud ou sous pression (Jacob, 2020). L'utilisation de ces plastiques a pris beaucoup d'ampleur de nos jours que ce soit en usage domestique ou industriel à cause de sa légèreté, son faible coût et sa durabilité (Jacquin, 2020). En effet, des plastiques sont utilisés dans plusieurs filières. Leurs utilisations les plus répandues sont les emballages, bouteilles, gobelets, etc. (Klemeš et al., 2021). Aujourd'hui, près de 40% de la production plastique est utilisée pour l'emballage, mais aussi dans les vêtements, véhicules, smartphones, masques, gants, matériaux de construction, appareils médicaux, etc. (Jacquin, 2020). Or, lors du processus de fabrication du plastique, plusieurs produits chimiques tels que les alkylphénols, les phtalates, le bisphénol A, les organophosphates, les polybromodiphényléther (PBDE) sont utilisés comme additifs dans le but de lui conférer des propriétés particulières comme la durabilité, la résistance, la flexibilité, la légèreté et l'inhibition de l'inflammation (Lahens et al., 2018). La quantité de plastique ne cesse d'augmenter depuis sa création. En 2020, la production mondiale est estimée à 367 millions, dont 15% (soit 55 millions de tonnes) en Europe (PlasticsEurope, 2022). L'utilisation du plastique génère par an plusieurs millions de tonnes de déchets qui sont jetés dans la nature (Parker, 2017). Faute d'une bonne gestion des déchets plastiques, ces derniers polluent l'environnement et causent d'énormes dégâts au niveau des animaux terrestres et aquatiques, mais aussi chez les humains. De grandes quantités de ces déchets non dégradables (8 à 18 millions de tonnes) finissent dans les océans où ils s'accumulent, se décomposent en des polymères semi-synthétiques appelés « microplastiques » (Renault, 2022). Par ailleurs, les microplastiques sont également fabriqués en quantité industrielle et sont utilisés dans de nombreux domaines comme les cosmétiques, la pharmacie et l'agriculture (Assoumani et al., 2019). En dehors des microplastiques, il existe d'autres contaminants plus petits (de taille nanoscopique) qui peuvent être issus des produits contenant les nanoparticules pendant leur fabrication ou formés au cours de l'utilisation de ces produits. Par ailleurs, ils proviennent aussi de dégradation des microplastiques. Il

s'agit des nanoplastiques (NPPs) qui constituent aujourd'hui un défi majeur pour plusieurs écosystèmes notamment les écosystèmes aquatiques (Mitrano *et al.*, 2021). Les NPPs sont classés parmi les contaminants émergents (Richardson et Kimura, 2020). Grâce à leur taille nanoscopique (< 1 μ m), ils peuvent passer à travers la membrane lipidique des organismes marins et affecter leur fonctionnement (Koelmans *et al.*, 2015).Toutefois, les mécanismes d'action de ces NPPs sur les organismes aquatiques notamment les stades précoces de développement des poissons sont encore peu connus et constituent un nouvel axe de recherche à explorer.

1.2 Généralités sur les microplastiques et les nanoplastiques

1.2.1 Définition et origine des microplastiques

Les microplastiques peuvent être définis comme des particules de plastique dont la taille est inférieure à 5 mm avec un diamètre variant de 1 à 1000 µm. Toutefois, d'autres auteurs considèrent comme microplastique, toute particule de plastique dont la taille est inférieure à 2 mm entre ses 2 extrémités les plus longues (Costa *et al.*, 2010). Selon leur origine, ils peuvent être classés en deux catégories à savoir les microplastiques primaires et secondaires.

• Microplastiques primaires

Les microplastiques primaires-sont des polymères synthétiques microscopiques produits de façon industrielle pour être utilisés comme composant de produits cosmétiques en tant qu'agent exfoliant (Sharma et Chatterjee, 2017a) ou d'agent nettoyant pour la peau (Sharma et Chatterjee, 2017a). Les microplastiques manufacturés sont utilisés dans plusieurs domaines à savoir : l'agriculture (Assoumani *et al.*, 2019), la pharmacie, la médecine et peuvent aussi servir de matières premières pour la fabrication de matériaux plastiques (Sharma et Chatterjee, 2017a). Cependant, ces microparticules peuvent aussi provenir de l'usure d'autres objets en plastiques pendant leur utilisation, leur entretien ou leur fabrication (frottement du textile synthétique pendant le lavage, dégradation de films agricoles, abrasion des pneus sur la route...) (Assoumani *et al.*, 2019). D'après Boucher et Friot (2020), les microplastiques primaires rejetés dans l'environnement peuvent provenir de 7 différentes sources : granulés de plastique,

textiles synthétiques, pneus, marquage routier, peintures marines, articles d'hygiène et de soin, poussières urbaines .Parmi ces principales sources, les textiles et les pneus sont responsables de près de deux tiers (63,4 %) du rejet de microplastiques dans l'environnement (Figure 1) (Boucher et Friot, 2020).



Sources : Boucher et Friot (2020).

Figure 1: Rejet des microplastiques dans les océans par source.

• Microplastiques secondaires

Les microplastiques secondaires proviennent de la dégradation des déchets plastiques de plus grande taille rejetée dans l'environnement (Assoumani *et al.*, 2019). La décomposition des déchets plastiques en microplastiques peut être due à l'action de plusieurs phénomènes comme : la photodégradation, la biodégradation, l'hydrolyse ou encore la thermodégradation (Sharma et Chatterjee, 2017a).

1.2.2 Le devenir des microplastiques

La majeure partie des microplastiques (qu'ils soient primaires ou secondaires) finissent leur course dans l'océan où ils provoquent d'importants dégâts aux organismes qui y vivent. Les microparticules plus légères comme le polypropylène flottent et se dispersent à la surface des océans tandis que d'autres, plus denses comme les polyacryliques, coulent et se posent sur le plancher océanique (Boucher et Friot, 2020). En raison de leur taille micrométrique, les microfragments de plastique sont confondus avec l'aliment et absorbés par les organismes aquatiques (Chatterjee et Sharma, 2019). Cette contamination peut avoir des effets néfastes sur leur survie et leur santé (Kim et al., 2017; Sharma et Chatterjee, 2017b). Environ 30% des espèces de poissons marins sont contaminées par les microplastiques (Possatto et al., 2011; Lusher et al., 2015). Une fois ingérés, les fragments de plastiques vont se retrouver dans le tractus gastro-intestinal, et vont s'accumuler dans le foie, les muscles et les branchies (Marie, 2021). En contaminant les organismes marins, les microplastiques s'accumulent dans la chaîne alimentaire aquatique et se retrouvent dans les poissons et les fruits de mer consommés par l'homme, et de ce fait, ils constituent aussi une menace potentielle pour l'homme (Karlsson et al., 2017; McGoran et al., 2017; Wright et Kelly, 2017).

1.2.3 Les nanoplastiques

1.2.3.1 Définition et origines

Un nanoplastique peut se définir comme tout ultrafragment de plastique dont la taille est inférieure à 1000 nm (da Costa *et al.*, 2016; Gigault *et al.*, 2018; Schwaferts *et al.*, 2019). Tout comme les microplastiques, ce sont des fines particules issues de la fragmentation des fibres synthétiques des vêtements lors du lavage et la détérioration par un mécanisme d'abrasion accélérée des objets plastiques comme le polystyrène (da Costa *et al.*, 2016). En plus de ces origines, la technique d'impression 3D génère aussi une importante quantité de nanoparticules (Stephens *et al.*, 2013). Avec la pandémie du Covid-19, les masques sont aussi devenus une source non négligeable de nanoplastiques, chaque masque pouvant générer en 1,6 et 3,8.10⁹ nanoplastiques (Ma *et al.*, 2021). En outre, la dégradation biologique des microplastiques peut aussi générer des nanoplastiques lorsqu'ils sont ingérés par des organismes marins comme l'ont

démontré Dawson *et al.* (2018). Ces auteurs ont exposé le krill de l'Antarctique (*Euphausia superba*) à des microplastiques de polystyrène de 31,5 µm mélangé à la nourriture algale et ont retrouvé après ingestion dans les glandes digestives des particules plus fines de 150-500 nm.

1.2.3.2 Importance environnementale et sanitaire des nanoplastiques

En plus d'être un contaminant, les NPPs constituent une menace sanitaire et environnementale majeure. En effet, une fois libérés dans l'environnement, les NPPs subissent des processus de vieillissement, d'agrégation et de migration. C'est ainsi qu'ils peuvent se retrouver dans le sol. Certains peuvent s'accumuler dans les plantes et altérer leur physiologie (Sun *et al.*, 2020). La présence de NPPs dans l'environnement peut présenter des risques pour les organismes terrestres et aquatiques. De plus, grâce à leur taille très minuscule, ils peuvent facilement se retrouver dans la chaîne alimentaire et menacer la santé humaine (Wang *et al.*, 2021).

La coexistence des NPPs avec d'autres contaminants organiques et les métaux lourds augmente la toxicité de ces derniers, ce qui constitue une menace pour la santé humaine et les écosystèmes (Davranche *et al.*, 2019; González-Fernández *et al.*, 2021). En outre, les NPPs peuvent servir de nouvel habitat pour la colonisation microbienne et agir comme vecteurs pour de nombreuses bactéries comme d'agents pathogènes tels que le *Vibrio* (Zettler *et al.*, 2013) et augmenter l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques dans le sol (Yang *et al.*, 2022). Par ailleurs, les nanoplastiques peuvent se combiner au microcystine-LR (une toxine produite par les cyanobactéries) et exacerber leur effet toxicité sur les stades de développement précoces des poissons (Zuo *et al.*, 2021).

1.2.3.3 Impact des nanoplastiques sur le développement embryonnaire des poissons

L'accumulation des déchets plastiques dans les masses d'eau de la terre constitue une pollution importante de l'écosystème aquatique. A cause de leur petite taille, les NPPs peuvent facilement pénétrer à l'intérieur des poissons, à n'importe quel stade de développement. Cependant, leur capacité à pénétrer dans l'intérieur des embryons de poissons dépend de leur taille. En exposant les embryons du poissonzèbre à des nanoplastiques de polystyrène (NPPS) de taille différente (50, 200 et 500 nm) (Lee *et al.*, 2019) ont montré que les NPPS plus petits (50 nm) pénétraient plus facilement dans le chorion et les embryons en développement et s'accumulaient dans tout le corps, principalement dans les régions riches en lipides tels que les lipides du vitellus. Après avoir pénétré les parois des embryons, les NPPs sont capables de rester dans le vitellus des larves écloses (Chae *et al.*, 2018). Par contre, le chorion joue efficacement un rôle de barrière pour des nanoparticules mesurant 100 nm comme l'a démontré Duan *et al.* (2020). Ces auteurs ont exposé des embryons de *Dario rerio* à des NPPS fluorescents de 100 nm et ont pu constater une rapide accumulation de ces nanoparticules à la surface du chorion embryonnaire à 10 hpf (Figure 2A). A 32 hpf, les NPPS étaient davantage adsorbés sur le chorion et couvrait presque toute sa surface (Figure 2B) sans qu'aucun signal de fluorescence n'ait été détecté à l'intérieur du chorion à 48 hpf (Figure 2C).



Figure 2: Distribution des NPPS fluorescents sur la surface du chorion embryonnaire du poisson-zèbre à 10 hpf(A), 32 hpf (B) et 48 hpf (C) (Duan *et al.*, 2020)

Même s'ils n'arrivent pas à pénétrer le chorion, les NPPs présentent une toxicité remarquable pour les embryons. Dans une autre expérimentation menée par Duan *et al.* (2020), des embryons du poisson-zèbre ont été exposés à des nanoparticules non fluorescentes de 100 nm de 0 hpf jusqu'à 72 hpf. La fréquence cardiaque à 24 hpf, la vitesse du flux sanguin à 48 hpf et le pourcentage d'éclosion retardée à 72 hpf de ces embryons ont été mesurés. Les résultats obtenus par ces auteurs indiquent une augmentation de la fréquence cardiaque de l'embryon de 18 % à 24 hpf, une augmentation de la vitesse du flux sanguin et un fort taux d'inhibition de

l'éclosion de l'embryon à 72 hpf. Les résultats obtenus par ces auteurs sont liés à l'accumulation de nanoplastiques sur les surfaces extérieures du chorion. En effet, en enveloppant les chorions, la couche de nanoparticule modifie leurs propriétés mécaniques, affecte la perméabilité de leurs pores, et conduit à un microenvironnement hypoxique à l'intérieur des chorions, qui est étroitement lié à l'accélération du rythme cardiaque des organismes exposés (Saggese *et al.*, 2016). Par contre, une bradycardie suite à des expositions aux NPPs de petite taille (< 100 nm) a été rapportée par plusieurs auteurs (Pitt *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2021). L'induction de cette bradycardie peut être liée à la petite taille des NPPs. En effet, du fait de leur petite taille, ils arrivent à passer facilement à travers les pores du chorion et interfèrent avec les sarcomères cardiaques (Geiser *et al.*, 2005) ou provoque un stress oxydatif (Chen *et al.*, 2017a) ce qui réduit la fréquence cardiaque.

1.2.3.4 Effets des nanoplastiques sur les larves de poissons

Les NPPs influencent de diverses manières le développement larvaire de plusieurs espèces de poisson. A ce stade de développement, les nanofragments de polystyrène peuvent s'accumuler dans plusieurs tissus comme l'ont montré Brun *et al.*, (2019a) chez les larves du poisson-zèbre. Après avoir exposé les larves du poisson-zèbre aux nanoplastiques de polystyrène de 25 nm à une concentration de 20 mg/l (entre 72-120 hpf), ces auteurs ont observé une accumulation de ces particules dans l'intestin, le pancréas exocrine et la vésicule biliaire des larves de *Danio rerio* (Figure 2). D'autres sites de bioaccumulation tels que le cerveau, le sac vitellin, les yeux, l'intestin et la vessie natatoire ont été également observés chez les larves de *D. rerio* après exposition aux NPPs (Zhang *et al.*, 2020).

Bien que l'exposition aux nanoplastiques ait moins d'incidence sur le taux d'éclosion des larves de poissons, elle provoque cependant des dommages. Des troubles de comportement étaient observés dans plusieurs études sur des larves de *Danio rerio* exposées à ces nanoparticules (Chen *et al.*, 2017b; Brun *et al.*, 2019a; Pedersen *et al.*, 2020b; Han *et al.*, 2022). Ils peuvent provoquer une augmentation du taux de cortisol et des troubles de locomotion chez ces larves (Brun *et al.*, 2019a). Les études sur le comportement des larves du poisson-zèbre exposées aux NPPs ont été réalisées en alternant des phases éclairées et

obscures. De façon générale, ces troubles se traduisent par une réduction, voire une inhibition de la locomotion chez ces larves (Torres-Ruiz *et al.*, 2021). La réduction de la locomotion est la conséquence d'une hypoactivité significative des larves exposées au NPPs (Pitt *et al.*, 2018). Toutefois, la période de test de comportement (éclairage/obscurité) détermine le type de trouble locomotif. En effet, les larves nagent davantage dans l'obscurité que dans la lumière (Torres-Ruiz, 2021 ; Pitt *et al.*, 2018).

L'exposition embryonnaire aux nanoplastiques peut également entraîner une réduction de l'expression des gènes antioxydants, une augmentation de la fréquence des anomalies du développement telles que la queue pliée, les déformations de la mâchoire et l'œdème péricardique; une baisse de la croissance et de l'hypoactivité (Zhang *et al.*, 2020). Les troubles de comportement et la baisse de la croissance peuvent résulter d'une perturbation du métabolisme énergétique des larves exposées aux fins fragments de plastiques. En s'accumulant dans le pancréas exocrine des larves du poisson-zèbre, les NPPs réduisent la taille des îlots pancréatiques, zone d'expression de l'insuline, ce qui provoque une diminution du taux de glucose chez ces larves (Brun *et al.*, 2019a).



Figure 3: Bioaccumulation des nanoplastiques à l'intérieur des larves du poissonzèbre.

a : Images représentatives de l'accumulation de NPPS dans l'intestin (vue latérale, flèche solide), le pancréas exocrine (vue latérale, flèche vide) et la vésicule biliaire (b : vue ventrale et latérale, astérisque) des larves de poisson-zèbre de type sauvage. Source (Brun et al., 2019b)

L'immunotoxicité des NPPs chez les larves de poissons-zèbres a été aussi étudiée. L'exposition des larves de cette espèce à des particules de polystyrène de taille de 50 nm et 100 nm a eu pour conséquence une inflammation hépatique se traduisant par une forte agrégation de neutrophiles et l'apoptose des macrophages dans l'abdomen des larves (Cheng *et al.*, 2022) De plus, les NPPs sont aussi susceptibles de provoquer les maladies liées au système immunitaire en stimulant la biosynthèse des hormones stéroïdes (Cheng *et al.*, 2022). Le niveau de toxicité des NPPs pour les larves dépend de la voie d'exposition. Dans une expérimentation visant à évaluer l'impact de la voie d'exposition, Zhang *et al.* (2020) ont exposé un groupe d'embryon aux nanoplastiques de polystyrène par voie aqueuse tandis qu'un autre groupe a été exposé par injection intraembryonnaire. Ils ont observé une toxicité accrue pour le développement de la larve de poisson-zèbre, une réduction de l'expression des gènes antioxydants et une hypoactivité chez les larves exposées par la voie aqueuse.

1.2.3.5 Impact des nanoplastiques sur les poissons adultes

Les effets des nanoplastiques ne se limitent pas seulement aux stades précoces de développement des poissons, mais affectent négativement les performances de reproduction, l'alimentation et la survie des poissons adultes (Gonçalves et Bebianno, 2021; Han et al., 2022). Tout comme chez les larves, les NPPs peuvent s'accumuler dans les tissus des poissons adultes notamment les organes reproducteurs (testicules et ovaires) et peuvent être transférés à leur progéniture (Zuo et al., 2021), mais ils peuvent aussi s'accumuler dans le foie et les reins (Elizalde-Velázquez et al., 2020). Ils constituent aussi un risque de toxicité élevée pour les poissons. Brandts et al., (2021) ont constaté une augmentation de l'expression des gènes antioxydants suivie d'une augmentation de la capacité antioxydante totale et du statut oxydatif total chez la dorade royale (Sparus aurata) exposée par voie aqueuse à des nanoplastiques de polyméthacrylate de méthyle. Ces auteurs ont aussi noté chez ces poissons une augmentation du taux des anomalies au niveau des noyaux des globules blancs. Par ailleurs, les NPPs peuvent potentiellement altérer le métabolisme des lipides (Brandts et al., 2018). La contamination de l'eau par les nanoplastiques peut provoquer le dysfonctionnement du système immunitaire en réduisant l'expression des gènes ncf, nox2, mst1 et c3 liés à la fonction immunitaire des neutrophiles, des macrophages et du complément chez les poissons (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2020).

1.3 Généralités sur le poisson-zèbre (Dario rerio)

1.3.1 Classification et importance de poisson-zèbre en expérimentation animale

Dario rerio est un poisson osseux appartenant à la classe des cyprinidés et à la sous-famille Danioninae (Porcher *et al.*, 2005). D'après McCluskey et Braasch (2020), la classification de poisson-zèbre se présente comme suit :

Règne :	Animalia
Superphylum :	Deuterostomia
Phylum :	Chordata
Subphylum :	Vertebrata
Infraphylum :	Gnathostomata
Super-classe :	Osteichthyes
Superclasse :	Actinopterygii
Classe :	Actinopteri
Sous-classe :	Neopterygii
Infra-classe :	Teleostei
Ordre :	Cypriniformes
Sous-ordre :	Cyprinoidae
Famille :	Cyprinidae
Genre :	Danio
Espèce :	Danio rerio .

Le poisson-zèbre vit dans des eaux rapides et peu profondes dont la température varie de 10° à 40°C (Daouk, 2012). A l'âge adulte, il pèse environ 300 mg pour une taille de 45 mm. Il se reproduit à des températures comprises entre 26-30°C. La femelle est ovipare et peut pondre entre 200 et 300 œufs et ceci trois fois par semaine (Spence *et al.*, 2008). Le poisson-zèbre est l'un des poissons vertébrés les plus utilisés comme modèles d'expérimentation dans les unités de recherches écotoxicologiques grâce à ses multiples avantages intrinsèques, notamment sa petite taille, sa facilité d'élevage en bassin et en laboratoire, sa fréquence et sa durée de reproduction ...(Porcher *et al.*, 2005; Bernut *et al.*, 2015; Parmentier,

2019). Par ailleurs, la fécondation des œufs du poisson-zèbre a lieu ex utero. C'est l'une des raisons pour lesquelles le poisson-zèbre est devenu un modèle important pour l'étude du développement embryonnaire précoce. Grâce à la transparence des œufs et des embryons, l'embryogenèse du poisson-zèbre peut être facilement étudiée contrairement à celle des animaux placentaires dont l'embryon se développe in utero (Smith et Kimelman, 2020).

1.3.2 Développement embryonnaire de Dario rerio

Le développement des œufs fécondés se déroule très rapidement. La majorité des organes et tissus de l'embryon est formée au bout de 24 heures post-fécondation (hpf) (Wilson, 2012). L'embryon achève son développement 48 hpf. Ce développement se déroule en plusieurs stades : zygote, clivage, blastula, gastrula, segmentation, pharyngula et éclosion (Kimmel *et al.*, 1995).

1.3.3 Stade zygote

Cette étape commence à 0 hpf et prend fin ³/₄ hpf. Pendant la fécondation, le spermatozoïde pénètre à l'intérieur de l'ovule par le micropyle. Après la fécondation, les mouvements cytoplasmiques sont activés et deviennent facilement visibles 10 minutes après fécondation. C'est ainsi que le cytoplasme animal se sépare du vitellus et migre vers le pôle animal. Cette ségrégation se poursuit pendant les premiers stades de clivage.



Figure 4: Modifications morphologiques du zygote du poisson-zèbre (Kimmel et al., 1995)

- A : Le zygote dans son chorion relevé quelques minutes après la fécondation.
- B : Séparation du pôle animal du pôle végétal 10 min après la fécondation.

1.3.4 Stade clivage

La première division cellulaire a lieu 45 minutes après la fécondation et les divisions suivantes se produisent de manière synchrone toutes les 15 minutes pendant les 2 premières heures après la fécondation (Porcher *et al.*, 2005). Pendant les 12 premières divisions du blastomère, les cellules n'ont que deux phases du cycle cellulaire : la phase M (mitose) et la phase S (réplication de l'ADN). C'est ainsi que ces cellules se divisent rapidement en passant de l'étape 2 cellules à ³/₄ hpf à 64 cellules à 2¹/₄ hpf (Kimmel *et al.*, 1995) (Figure 5). Il est à noter que les divisions dans le pôle animal sont mésoblastiques, c'est-à-dire incomplètes.



- A: Etape 2 cellules ¾ hpf
- **B**: Etape 4 cellules 1 hpf
- **C**: Etape 8 cellules 1¹/₄ hpf
- D: Etape 16 cellules 1½ hpf
- E: Etape 32 cellules 1¾ hpf
- F: Etape 64 cellules 2 hpf

Figure 5: Etapes du stade clivage d'un embryon de poisson-zèbre (Kimmel et al., 1995)

1.3.5 Stade de blastula

Le stade blastula fait suite au stade clivage et démarre à 2¼ hpf et prend fin à 5 ¼ hpf. A ce stade, les cellules de la blastula continuent leur division de manière synchrone, au même rythme qu'auparavant. L'embryon poursuit sa métamorphose en passant de 128 cellules jusqu'à 1000 cellules au bout de 3 hpf. D'importants processus se produisent au cours de ce stade. Il s'agit essentiellement de la transition midblastula (MBT), l'expression des gènes zygotiques, la formation de la couche syncytiale vitelline (YSL) et de la couche cellulaire enveloppante (EVL) et le commencement de l'épibolie (Kimmel *et al.*, 1995; Langdon et Mullins, 2011).

La MBT commence pendant le dixième cycle de division cellulaire (à l'étape de 512 cellules). Elle est caractérisée par l'allongement du cycle cellulaire, la perte de

synchronisation cellulaire, l'activation de la transcription et l'apparition de la motilité cellulaire (Kane et Kimmel, 1993).

Pendant cette même phase de MBT, les membranes des blastomères marginaux (plus près du vitellus) se rompent et déversent leur contenu dans la cellule vitelline, ce qui donne lieu à une couche de noyaux dans le vitellus et à la formation de la YSL (Langdon et Mullins, 2011). Cette couche est vitale pour le développement, car elle intervient dans la formation du mésoderme et de l'endoderme (Rodaway *et al.*, 1999; Kimelman et Griffin, 2000).

L'épibolie est le processus par lequel les cellules du blastoderme et de l'YSL s'étendent et encapsulent complètement le vitellus (Warga et Kimmel, 1990). Ce processus est régulé par la couche syncytiale vitelline et démarre environ une heure et demie après la MBT et se poursuit tout au long de la période de gastrula jusqu'à ce que le vitellus soit entièrement recouvert (Warga et Kimmel, 1990). A la fin de la période de la blastula, le blastoderme recouvre la cellule vitelline sur 30% de son diamètre (Porcher *et al.*, 2005).

1.3.6 Stade gastrula

Pendant la période de gastrulation, l'épibolie se poursuit jusqu'à ce que toutes les cellules embryonnaires en haut, aient enveloppé le vitellus. La gastrulation commence à 50 % de l'épibolie (5 ¼ hpf) et se poursuit jusqu'à la fin de l'épibolie à 10 hpf (Smith et Kimelman, 2020). Pendant cette période on observe des mouvements morphogénétiques d'involution, d'extension, et par le développement de l'orientation de l'axe dorso-ventral (Porcher *et al.*, 2005). En dehors de la première étape de la gastrulation (50% de l'épibolie), l'embryon entame l'étape de "germ ring" caractérisé par l'apparition d'un anneau germinatif de tissu épaissi tout autour de l'équateur de l'embryon du bord de blastoderme. Il s'ensuit l'étape "shield" où le bouclier embryonnaire apparaît au niveau du pôle animal. Les cellules du pôle animal forment la future tête. Les rudiments de queue, tandis que les cellules du pôle végétales forment la future queue de la larve. Après ces phases, l'épibolie continue de progresser en couvrant 75 et 90% du vitellus respectivement à 8 et 9 hpf (Warga et Kimmel, 1990). Les rudiments de la queue, du tube neural

et du cerveau sont visibles au cours de l'étape "bud stage" qui marque la fin du stade gastrula (Porcher *et al.*, 2005).

1.3.7 Stade de segmentation

Il se déroule entre 10h-24 hpf. C'est une phase importante dans le développement embryonnaire, car la forme de l'embryon devient plus claire à cause de la variabilité des mouvements morphogéniques qui se produisent. En effet, au cours de ce stade, les somites, les neuromères, le primordia de l'arc pharyngia se développent, le bourgeon de la queue devient plus apparent permettant à l'embryon de s'allonger. Aussi, les rudiments de certains organes primaires tels que : l'œil, oreille, cerveau, myotomes sont visibles (Kimmel *et al.*, 1995).

1.3.8 Stade pharyngula

Il débute à 24hpf et prend fin à 48hpf. A cette période, l'embryon commence à s'organiser de façon bilatérale et les différentes nageoires commencent à se former. Au début du stade, c'est-à-dire à 24h, la pigmentation de la peau est tellement légère. L'épithélium rétinien pigmenté et les mélanophores commencent à se différencier au début de la période, et ensuite la pigmentation progresse assez rapidement au cours de la période. Les cellules pigmentaires constituent une caractéristique proéminente de l'embryon et sont facilement visibles à faible grossissement 28hpf. La circulation sanguine devient plus visible, et le cœur commence à battre. L'embryon continue de présenter des contractions latérales impliquant le tronc et la queue laissant distinguer clairement la réactivité aux touches légères de la tête ou le corps de l'embryon déchorioné.

1.3.9 La Stade de l'éclosion

L'éclosion des embryons commence à 48 h et se déroule en trois phases importantes : long pec (t 48 hpf) ; pec fin (t 60 hpf), et protruding mouth (72 hpf). Presque tous les organes de l'embryon sont en place et on observe l'ouverture de la bouche des larves.

1.4 Objectif du travail

Les nanoplastiques sont des particules présentes dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Grâce à leur petite taille, ils peuvent traverser facilement

les pores des membranes cellulaires pour s'accumuler dans les organes ou dans les vaisseaux sanguins (Lehner *et al.*, 2019). Wang *et al.*, (2022) ont montré que les nanoplastiques de polystyrène (NPPs) influencent négativement le fonctionnement du tube digestif et induisent un stress oxydatif chez les juvéniles de mérous. D'autres auteurs ont mis en évidence l'effet d'une forte concentration des nanoplastiques sur le microbiote intestinal chez le poisson-zèbre (Xie *et al.*, 2021). Cependant, peu d'études se sont consacrées aux mécanismes d'action de ces NPPs sur les organismes aquatiques notamment les stades précoces de développement des poissons. C'est pour cette raison que, dans le cadre de notre thèse de fin d'études, nous avons choisi d'étudier l'influence des NPPs sur le poisson-zèbre (*Dario rerio*) au cours de son développement embryonnaire. L'objectif général de l'étude est d'évaluer les altérations provoquées par une exposition des stades précoces du développement embryonnaire des poissons-zèbre aux NPPs.

Ainsi, nous allons vérifier ou confirmer les hypothèses suivantes :

- Hypothèse 1 : Les microbilles de nanoplastiques de polystyrène ayant un diamètre inférieur à 250 nm n'ont aucun effet sur le développement embryonnaire jusqu'à 72 hpf.
- Hypothèse 2 : Les nanoplastiques de polystyrène (250 nm) augmentent la consommation d'oxygène chez les larves de poissons-zèbres
- Hypothèse 3 : Les nanoplastiques de polystyrène inhibent la locomotion des larves de poisson-zèbre.

2 Matériels et méthodes

2.1 Cadre d'étude

Les expériences se sont déroulées dans le laboratoire de l'Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive (URBE) de l'Université de Namur.

2.2 Matériels

2.2.1 Matériels biologiques

Le matériel biologique est constitué d'embryons issus des œufs de poisson-zèbre (*Dario rerio*) de souche WT AB circ en provenance de l'Université de Gent.

(Belgique). Les géniteurs ont été élevés dans des bassins de 3 l. à raison de 20 individus par bassin.

2.2.2 Matériel expérimental

Les nanoplastiques utilisés sont des microbilles de polystyrène (250 nm) et de concentration forte de 1000 µg/L. Les billes sont préparées à partir de styrène pur, polymérisé au département de la chimie de l'UNamur. Elles sont ensuite séparées et sélectionnées par tailles grâce à des tamis et des centrifugations en série. Le matériel de laboratoire (Figure 6) est constitué de :

- boîtes de pétri en verre de 8 cm contenant les œufs de poisson zèbre pour l'exposition ;
- pipettes et des micropipettes pour le prélèvement des œufs et les solutions ;
- enceinte d'élevage des géniteurs de poisson-zèbre ;
- incubateur qui abrite les différents échantillons et solutions expérimentales à température (37°C);
- plaques expérimentales de 24 puits ;
- bouteilles en verre qui contiennent de l'eau filtrée, la solution des nanoplastiques et l'Acridine Orange, de l'anesthésiant (MS222) ;
- un microscope inversé (Olympus) couplé au logiciel Danioscope (Noldus[®]) pour évaluer les différents paramètres physiologiques de l'embryon (battement cardiaque, activité de la larve, la morphologie du poisson) et relié à un écran fluorescent pour détecter la mort cellulaire des larves exposées.





Bâtiment d'élevage des poissons poisson zèbre (a), solution expérimentale (b), solution du bleu de méthylène (c), barques de reproduction (d), microscope inversé (e), plaque de 24 puits (f).

2.3 Méthode

2.3.1 Elevage et reproduction des géniteurs.

Des poissons-zèbres *Danio rerio* adultes de souche WT AB circ ont été utilisés pour la reproduction au cours de l'expérimentation. Ils ont été maintenus dans un système à circuit fermé et à une température 27,5° C, un pH de 7,2 et une conductivité de 500µS/ cm, avec une photopériode de 12 :12 h (clair : sombre). Les poissons adultes ont été nourris 2x/jour à satiété apparente avec de granulés de taille Micro 300 (200-300µm) et complétés par des nauplii d'artémia. Les larves quant à elles étaient nourries trois fois /jour. Pour la reproduction des géniteurs, un sex ratio de 2 mâles pour 2 femelles a été constitué. La veille de la reproduction, une heure de temps après le dernier nourrissage, les géniteurs mâles et femelles sont sélectionnés chacun dans un compartiment d'une cuve de 1 litre d'eau équipé d'un séparateur au milieu. La cuve est munie d'une grille en bas pour faciliter la séparation des œufs de leurs géniteurs. Ces derniers sont gardés dans l'obscurité toute la nuit. La réunification des géniteurs est faite le lendemain matin 30 min

avant l'allumage de la lumière. La ponte et la fertilisation sont stimulées à l'allumage de la lumière. Les œufs sont récoltés 1 heure après la fécondation pour les manipulations.

2.3.2 Constitution de la solution de travail de nanoplastiques de polystyrène

Les nanoplastiques utilisés sont des microbilles de polystyrène de 250 nm de taille et de concentration 1000 µg/L. La solution de travail est réalisée à partir d'une solution mère 10x concentrée. Après l'avoir diluée, la solution est soniquée pendant 1 mn pour une bonne homogénéisation. Elle est stockée au frigo pour limiter le développement bactérien. Une fraction est prélevée quotidiennement pour la remettre dans un incubateur à 27°C avant les changements de milieu journalier.

2.4 Dispositif expérimental

Deux groupes de traitements ont été constitués pour l'expérimentation. Il s'agit de :

- Groupe contrôle : les embryons exposés à 0 µg/l de NPPs.
- Groupe exposition : les embryons exposés de 2 hpf à 96 hpf aux NPPs d'une taille de 250 nm et de concentration 1000 µg/l.



* Le comptage des cellules apototiques a été fait après le déchorionnage des œufs à 48 hpf

** Le comportement des larves a été évalué à travers le test de locomotion en phases jour et nuit et le test de tapping

*** Les paramètres morphologiques n'ont pas pu être mesurés à 48 hpf à cause d'un défaut de netteté des larves

Figure 7: Schéma expérimental

Trois répétitions ont été faites pour le contrôle et le traitement. Pour chaque réplicat, 30 œufs ont été mis dans des boîtse de pétri de dimension 80*15 mm à un volume standardisé de 10ml de solution. Les œufs ont été gardés à l'incubateur à une température de 27°C pendant l'expérimentation. Les œufs non fécondés et les larves mortes ont été retirés et comptés chaque jour durant l'expérimentation et le milieu est changé une fois par jour pendant 3 jours (24, 48 et 72 hpf) à hauteur de

50% dans chaque réplica. Le prélèvement de la solution et les changements des milieux ont été réalisés avec une pipette en verre graduée. Avant l'exposition, les œufs ont été rincés avec d'une solution diluée de bleu de méthylène (100µl dans 500ml). L'activité des embryons, la fréquence cardiaque des larves, la surface vitelline, la morphologie, la mort cellulaire des larves, la distance et la vitesse de la nage ont été analysées et enregistrées après un temps d'exposition de 24h, 48h, 72h, et 96h.

2.4.1 Mesure de l'activité, de la fréquence cardiaque, de la taille de vitellus et de la longueur de la larve.

L'activité, la fréquence cardiaque, la taille de vitellus et la morphologie des larves ont été mesurées à l'aide d'un microscope inversé (OLYMPUS[®]) couplé au logiciel d'analyse Danioscope de Noldus. La mesure de l'activité des larves, a été prise à 22, 24, 26, 28 et 30 hpf. A partir de 48 hpf jusqu'à 96 hpf, la fréquence des battements cardiaque, a été prise 2 fois par jour. La surface vitelline quant à elle, a été mesurée à 48, 72 et 96 hpf. Enfin la morphologie des larves a été prise à 24,72 et 96 hpf. Celle de 48 hpf n'a pas été prise faute de la netteté des images.



Figure 8: Paramètres morphométriques mesurés sur la larve à 96 hpf

2.4.2 Identification des cellules apoptotiques

Les œufs ont été déchorionnés avant l'analyse de l'apoptose. A 48 h d'exposition, cinq larves de chaque répétition ont été choisies au hasard et ont été mises dans une plaque de 24 puits. Après avoir rincé les larves trois fois avec l'eau du bassin, 3 ml d'une solution de pronase (0,5 mg/ml) ont été ajoutés dans les puits contenant les larves. Après 3 min, les puits ont été vidés et les larves ont été rincées trois fois pour enlever la pronase. Les cellules apoptotiques ont été identifiées à l'aide de la comme coloration AO (Acridine Orange) considérée une coloration métachromatique sélective des acides nucléiques utile pour observer les schémas d'apoptose (Sökmen et al., 2020). Après avoir déchorionné les larves et rincé la pronase, un volume de 3 ml d'Acridine Orange (AO) a été ajouté sur chaque lot de larve. La plaque est laissée 30 min ensuite dans le noir, les puits sont ensuite rincés trois fois à l'eau filtrée de système. Les cellules apoptotiques ont été identifiées au microscope à fluorescence. Une solution de Ms-222 à 0,008% a été utilisée pour anesthésier les larves pendant l'observation.

2.4.3 Evaluation de la respirométrie

La consommation d'oxygène a été déterminée sur les embryons avant l'éclosion (48h) et après éclosion (72h) à l'aide d'un système de lecteur à capteur (Loligo Systems). Les enregistrements ont été effectués à l'aide du logiciel microresp. Les capteurs d'oxygène ont été calibrés à la température expérimentale avec de l'eau sans oxygène obtenue en ajoutant de sulfite de sodium (Na2SO3) et de l'eau entièrement oxygénée à l'aide d'un bulleur. L'appareil servant pour l'analyse de respirométrie était constitué d'une plaque électronique à lumière fluorescence comportant 48 puits dans lesquels ont été mis les échantillons. Il est relié à un autre appareil permettant la transmission de la lumière.

L'analyse a été effectuée sur trois larves de chaque réplicat sélectionnées au hasard. Pour ce faire, les puits ont été remplis avec les solutions oxygénées de chaque replicat. Un bulleur a été utilisé pour oxygéner les solutions. Après le remplissage des puits, les échantillons de chaque réplicat ont été mis dans les solutions de façon rapide. La consommation d'oxygène (MO2) larvaire a été déduite de la pente (K) de la régression linéaire, de la teneur en oxygène (kPa) dans le temps (h) selon l'équation : **y= KVβM**⁻¹. Les résultats ont été exportés dans R pour les analyses statistiques.

2.4.4 Analyse des comportements des larves.

Le comportement des larves a été effectué selon le protocole de Qiang et Cheng (2019) grâce à la DanioBox de Noldus. À 96hpf, 5 larves par réplicat ont été

prélevées au hasard pour évaluer leur comportement et leur capacité de nage. Pour ce faire, les larves prélevées ont été réparties dans les puits d'une plaque de 24 puits contenant 0,5 ml d'eau filtrée chacun. Une période d'acclimatation de 15 minutes dans l'obscurité a été observée avant le démarrage de l'analyse du comportement. Le test d'activité a été réalisé pendant une période de trois cycles de 20 minutes luminosité/obscurité. Après ce premier test, les larves s'acclimatent à nouveau pendant 30 min dans l'obscurité avant d'être soumises au tapping qui consiste à émettre du bruit en tapant sur le support de la plaque toutes les secondes pendant 40s. Toutes ces analyses ont été faites avec le logiciel DanioVision video-track system (Noldus, Netherlands) et les données ont été traitées dans Ethovision XT 15.

2.4.5 Analyses statistiques

Le logiciel R Version 4.2.1., par l'intermédiaire de son interface RStudio (2022.07.1) a été utilisé pour les analyses statistiques.

Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1) avec comme facteur le traitement (contrôle et exposition) a été faite pour connaitre la significativité de l'effet des nanoplastiques sur les paramètres évalués.

Une ANOVA à deux facteurs (traitement et heures de mesure) a été appliquée pour les paramètres mesurés à plusieurs stades de développement des larves. Il s'agit des paramètres morphométriques (longueur standard, surfaces du vitellus et de l'œil), de l'activité embryonnaire (burst activity et burst count), de la fréquence cardiaque et de la consommation de l'oxygène).

Une ANOVA à deux facteurs avec comme source de variation traitement (contrôle et exposition) et phase (jour et nuit) a été réalisée pour savoir l'effet des nanoplastiques sur le comportement des larves

3 Résultats

3.1 Mortalité et taux d'éclosion

A 24 hpf, le taux d'œufs coagulés a été significativement plus élevé (p= 0,0343) dans le groupe contrôle ($26,11\pm6,11\%$; n=15) par rapport au groupe d'exposition ($15,55\pm4,81\%$; n=15). Le même constat a été fait à 48 hpf (p=0,0442) où le taux de mortalité embryonnaire a été de 11,11±5,55% dans le groupe contrôle et 4,44 ± 2,59% dans le groupe exposé (Figure 9a).

A 48 hpf, une seule éclosion a été constatée seulement dans le groupe d'exposition (n=30). L'éclosion a été totale à partir de 72 hpf aussi bien dans le groupe exposé que dans le groupe témoin (Figure 9b). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes même si les œufs exposés ont tendance à éclore plus vite que ceux des groupes contrôles (p = 0,0753).



Figure 9: Mortalité embryonnaire (A) à 24 et 48 hpf et taux d'éclosion des œufs à 48, 72 et 96 hpf (B)

3.2 Activité des embryons de 22 à 30 hpf

La figure 10 présente le pourcentage de temps pendant lequel l'embryon est en mouvement dans le chorion (Burst activity). L'effet de l'exposition sur ce paramètre a été remarqué seulement à 28 hpf où le pourcentage de burst activity est significativement plus élevé (p=0,044) dans le groupe contrôle (4,60±2,18%; n=30)

que dans le groupe d'exposition (3,47±1,31% ; n=30). L'analyse de la variance à deux facteurs a montré que l'effet de l'interaction temps x groupe a été significatif (p=0,0281). De même, indépendamment du groupe, les pourcentages de burst activity ont diminué au cours du temps (p< 2.10^{-16}).





Figure 10: Burst activity des embryons de 22 hpf à 30 hpf

Contrairement au burst activity, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe contrôle et le groupe exposé pour le burst count (nombre de mouvements de l'embryon par minute) (Tableau 1). Tout comme l'effet groupe, l'interaction temps x groupe n'a eu aucun effet significatif sur le burst count (p=0,367). Par contre, le temps de mesure a significativement influencé le burst count indépendamment du groupe les analyses ont montré une différence significative au niveau du temps de mesure des deux groupes (p< 2.10^{-6}).

Tableau 1: Moyennes ± écart type (n=15)) de burst count/min des embryons à 22
24, 26, 28 et 30 hpf	

Temps de mesure	Contrôle (n=15)	NPPs 1000µg/l (n=15)	P-Value
22 hpf	8,60±2,67	7,60±1,69	0,0888
24 hpf	6,23±1,89	6,20±1,61	0,9415
26 hpf	5,33±1,15	5,23±1,81	0,7998
28 hpf	3,23±1,48	2,73±1,34	0,1748
30 hpf	0,77±0,68	0,80±0,92	0,8741

3.1 Cellules apoptotiques au niveau de l'œil à 48 hpf

Le nombre de cellules apoptotiques comptées à 48 hpf au niveau de l'œil (Figure 11) a été significativement plus élevé dans le groupe contrôle ($41,67\pm7,67$) que dans le groupe exposé ($16,67\pm5,44$) (p=0,0007).

Nombre de cellules apototiques

60

40

20

0

Contrôle

NPPs (1000µg/l)



Contrôle

NPs (1000µg/l)



3.2 Morphologie des larves de poisson-zèbre

3.2.1 Longueur des poissons

L'exposition des embryons aux nanoplastiques n'a pas eu d'effet significatif sur la longueur des poissons (Tableau 2) à 24, 72 et 96 hpf (n=15). Toutefois, malgré l'absence de différence significative, les groupes contrôles ont présenté une longueur légèrement plus élevée par rapport à celle des groupes exposés à 72 hpf (2658,9±238,21 contre 2459,01±112,83 µm) et à 96 hpf (3240,54±39,86 contre 3192,57±47,04 µm) et 96 hpf (3240,54±39,86 contre 3192,57±47,04 µm) et 96 hpf (3240,54±39,86 contre 3192,57±47,04) Il est à noter que les effets temps de mesure et l'interaction temps x traitement ont été significatifs (respectivement p < 2.10^{-16} et 0,0289).

Tableau 2: Moyennes \pm déviation standard (n=15) de la longueur (µm) des larves à 24, 72 et 96 hpf

Temps de mesure	Contrôle (n=15)	NPPs 1000µg/l (n=15)	P-Value
24 hpf	2001,86±79,25	2043,67±-41,07	0,0781
72 hpf	2658,9±238,21	2459,01±112,83	0,0693
96 hpf	3240,54±39,86	3192,57±47,04	0,0521

3.2.2 Surface de l'œil et du sac vitellin à 24, 72 et 96 hpf

Tout comme pour la longueur, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour la surface de l'œil, quel que soit le temps de mesure (Figure 12A). Toutefois, indépendamment du groupe, l'effet temps de mesure a été significatif sur la surface de l'œil (n = 30 ; p< 2.10^{-16}). Les valeurs obtenues pour ce paramètre à 72 hpf (0,041±0,003 et 0,039±0,004 µm² pour le contrôle et pour le groupe d'exposition) sont significativement plus élevées que celles obtenues à 24 hpf (0,016±0,006 et 0,012±0,003 µm²) et 96 hpf (0,018±0,002 et 0,015±0,001 µm²). Par contre, l'ANOVA à 2 facteurs n'a révélé aucun effet de l'interaction temps de mesure x groupe (p= 0,585).

Quant à la surface vitelline, aucune différence significative n'a été observée pour les deux groupes à 24 et 72 hpf (Figure 10B). Par contre, à 96 hpf, les poissons du groupe exposé ont présenté une surface vitelline $(0,045\pm0,004 \text{ mm}^2)$ inférieure à celle des poissons du groupe contrôle $(0,059\pm0,007 \text{ mm}^2)$ (p=6,92.10⁻⁵). Dans l'ensemble, la surface vitelline s'est réduite avec le temps (n=30 ; p< 2.10⁻¹⁶), quel que soit le groupe.



Figure 12: Surface de l'œil (A) et du sac vitellin (B) à 24, 72 et 96 hpf

3.3 Comportement des larves

Le test de locomotion pendant les phases obscurité et lumière à 96 hpf a révélé que les larves se sont beaucoup plus déplacées pendant les phases nuit que les phases de jour (p< 2.10⁻¹⁶) indépendamment du traitement (Figure 13). Par contre, pour la même phase, aucune différence significative n'a été remarquée entre les

deux groupes. La distance totale moyenne parcourue par les larves en phase lumière est de 638,37±473,32 mm (n=30) dans le groupe contrôle 542,84±417,17 (n=30). Dans l'obscurité, les larves du groupe contrôle ont parcouru en moyenne 1688,16±505,76 mm et celles du groupe d'exposition, 1632,66±662,66 mm. Malgré l'absence de différence significative, nous avons noté une légère diminution de la distance parcourue par les larves du groupe d'exposition pendant les deux phases.





Quant au tapping, le test a révélé que les larves du groupe contrôle et celles du groupe exposé ont parcouru en moyenne la même distance par seconde suite à un stress. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes (p= 0,873). La moyenne de distance parcourue par les larves du groupe témoin était de 1,35 \pm 0,41mm pour les larves du groupe contrôle (n=30) et de 1,33 \pm 0,63 mm pour celles du groupe exposé (n=30). Malgré l'absence de différence significative entre les moyennes des deux groupes (contrôle et exposé), la courbe d'évolution des distances parcourues (Figure 14) pendant le test de tapping montre

qu'au début du stress, la distance parcourue par seconde était plus grande chez les larves exposées comparativement aux larves du groupe contrôle. Toutefois, dans les deux groupes, nous avons observé une diminution de la distance parcourue avec le temps de stress.



Figure 14: Distance parcourue en fonction du temps pendant le test de tapping

Les résultats de l'analyse statistique de la thigmotaxie ont montré qu'il n'existe aucune différence significative entre les larves du groupe contrôle $(1,78\pm2,61\%)$ et ceux du groupe exposé $(0,81\pm1,16\%)$ en journée (p= 0,711) (Tableau 3). Par contre, dans l'obscurité, il existe une différence significative entre les deux groupes (p= 0,0048). Les larves du groupe contrôle ont présenté un indice d'anxiété plus élevé (60,42±20,12%) que les larves du groupe exposé (46,68±27,84%).

Tableau 3: Moyennes ± déviation standard (n=30) de la thigmot	axie (%	de la
distance totale parcourue dans la zone périphérique du puits) à 96 h	ıpf	

Phase	Contrôle (n=30)	NPPs 1000µg/l (n=30)	P-Value
Jour	1,78±2,61	0,81±1,16	0,711
Nuit	60,42±20,12	46,68±27,84	0,0048

3.4 Consommation d'oxygène

Les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative pour la consommation d'oxygène entre les deux groupes à 48 hpf (p=0,528) et 72 hpf (p = 0,198) (Tableau 4). La consommation d'oxygène à 48 hpf était de 777,26 nmol/ larve \pm 448,42 (n=9) pour les larves du groupe contrôle et 1030,33 \pm 582,2 nmol/larve (n=9) pour celles du groupe exposé. Malgré l'absence de différence signification, une légère augmentation de la consommation d'oxygène a été observée en faveur du groupe d'exposition. Cette même tendance a été observée à 72 hpf (891,72 \pm 375,91et 1228,09 \pm 349,02 respectivement pour le groupe contrôle et le groupe d'exposition).

Tableau 4: Moyennes ± déviation standard (n=9) de la consommation d'oxygène (nmole/larves) à 48 et 72 hpf

Temps	Contrôle (n=9)	NPs(1000µg/l) (n=9)	P-value
48 hpf	777,26±448,42	1030,33±582,2	0,528
72 hpf	891,71±375,91	1228,09±349,02	0,198

3.5 Fréquence cardiaque

Les fréquences du battement cardiaque observées pour les deux groupes ont été significativement différentes à 48 hpf et 96 hpf (Tableau 5). A 48 hpf, le nombre de battements cardiaques par minute (bpm) du groupe contrôle (152,11 ± 23,03 bpm ; n=15) était supérieure à celui du groupe exposé (134,52±8,71 bpm ; n=15) (p = 0,0267). A 96 hpf, cette même observation a été faite pour les deux groupes (p=0,00193). La fréquence cardiaque était de 217,72 ± 11,28 bpm pour le groupe contrôle et 195,89 ± 16,05 pour le groupe exposé. Par contre, à 72 hpf, aucune différence significative n'a été observée pour les deux groupes (p = 0,0877).

Tableau 5: Moyennes ± déviation standard (n=15) de la fréquence cardiaque (bpm) à 48 et 72 hpf

Temps	Contrôle (n=15)	NPPs 1000 μg/l (n=15)	P-value
48 hpf	152,11±23,03	134,52±8,71	0,0267
72 hpf	214,67±9,99	222,86±8,00	0,0877
96 hpf	217,72±11,28	195,89±16,05	0,00193

4 Discussions

4.1 Rappel des objectifs

Notre travail a été conçu dans l'objectif d'étudier les mécanismes physiologiques altérés par l'exposition des nanoplastiques lors du développement embryonnaire chez *Danio rerio*. D'après nos résultats, nous allons discuter les effets que ces nanoplastiques ont sur le poisson *Danio rerio* en développement embryonnaire d'une part et d'autre part nous vérifierons les hypothèses suivantes :

- Hypothèse 1 : Les microbilles de nanoplastiques de polystyrène ayant un diamètre de 250 nm n'ont aucun effet sur le développement embryonnaire jusqu'à 72 hpf.
- Hypothèse 2 : Les nanoplastiques de polystyrène (250 nm) augmentent la consommation d'oxygène chez les larves de poissons-zèbre
- Hypothèse 3 : Les nanoplastiques de polystyrène inhibent la locomotion des larves de poisson-zèbre.

Mortalité et développement embryonnaire des poissons-zèbres

L'exposition des œufs de poisson-zèbre aux nanoplastiques d'une taille de 250 nm à une concentration de 1000µg/l a induit une faible mortalité par rapport au contrôle à 24 et 48 hpf. Ceci implique qu'il n'y a pas d'effet létal significatif associé au niveau d'exposition expérimenté dans cette étude. Nos résultats corroborent ceux de Li et al. (2022) qui ont fait le même constat suite à l'exposition des œufs de poissonzèbre à différentes concentrations de NPPs de 80 nm. Nos observations sont similaires à celle de Pedersen et al. (2020a) qui n'ont pas observé de mortalité accrue due à l'exposition aux NPPs. Par contre, d'autres auteurs ont rapporté des effets létaux significatifs à la suite d'une injection de nanoplastiques de 0,81 ng de 25 nm dans le sac vitellin à 4 hpf (Sökmen et al., 2020). La taille des nanoplastiques utilisés par ces auteurs et la voie d'exposition des embryons au NPPs (injection intravitelline) pourraient expliquer ces résultats. Avec un diamètre des pores chorionique compris entre 500 et 700 nm, les nanoplastiques utilisés dans notre expérimentation devraient passer à l'intérieur à travers le chorion (Rawson et al., 2000). Cependant, plusieurs travaux ont montré que le chorion arrive à empêcher de manière efficace le passage des NPPs d'une taille supérieure à 50 nm, mais

laisse passer d'autres NPPs suffisamment petites et non agglomérées (Vranic *et al.*, 2019). Cette capacité protectrice du chorion pourrait expliquer l'absence d'effets létaux dus au NPPs dans notre étude. Par ailleurs, cela explique aussi l'absence d'effet sur le taux d'éclosion et sur la morphologie des larves notamment la surface de l'œil et la longueur des larves.

Par contre, nous avons remarqué que la surface du vitellus des larves exposées au NPPs a été significativement plus réduite à 96 hpf. D'après Fraher *et al.* (2016), le sac vitellin est essentiellement composé de réserve lipidique dont le contenu s'épuise au fur et à mesure du développement larvaire. Dans la présente étude, la petite surface observée dans le groupe d'exposition peut traduire une accélération du métabolisme lipidique des larves au cours de leur développement. En effet, bien que le chorion empêche leur pénétration, les nanoplastiques s'accumulent sur la surface externe du chorion et réduisent la diffusion de l'oxygène vers l'embryon (Duan *et al.*, 2020). Ceci peut occasionner un changement radical de voies métaboliques et amener l'animal à accroitre l'utilisation de sa réserve vitelline. Ainsi, la petite surface vitelline des larves exposées peut être révélatrice de l'état de stress dans lequel elles se trouvent à cause de l'exposition (LeMoine *et al.*, 2018). Toutefois, les analyses de l'expression des gènes liés au métabolisme lipidique seraient nécessaires afin de mieux élucider l'impact de ces nanoplastiques sur la vitesse d'épuisement des réserves vitellines.

4.1 Cellules apoptotiques au niveau de l'œil à 48 hpf

L'apoptose est un phénomène physiologie qui joue un rôle clé dans les processus de développement notamment la morphogénèse et l'homéostasie tissulaire dans le règne animal (Cole et Ross, 2001; Yamashita, 2003). Ainsi, elle est indispensable pour le bon déroulement de la formation des tissus et des différentes parties de l'organisme (Meier *et al.*, 2000). L'inhibition de l'apoptose ou une apoptose insuffisante peut entraver le développement ou provoquer des tumeurs et des maladies auto-immunes. Dans la présente étude, nous avons observé que le nombre de cellules mortes par apoptose au niveau des yeux était plus élevé chez les larves du groupe contrôle que chez les larves du groupe exposé. Nos résultats sont contraires à ceux de Sökmen *et al.* (2020) et Kantha *et al.* (2022) qui ont noté une forte présence de cellules apoptotiques respectivement dans les

tissus cérébral (120 hpf) et cutané (96 hpf) suite à l'exposition des larves aux NPPs. Contrairement aux résultats obtenus dans notre étude, Bhagat *et al.* (2021) n'ont observé aucun effet de l'exposition aux NPPs de 50 nm dans la région de l'œil et de la tête des larves à 96 hpf. Toutefois, il est à noter que la détection des cellules apoptotiques dans ces études a été faite à un stade beaucoup plus avancé (≥ 96 hpf). La faible détection des cellules apoptotiques dans notre étude (groupe d'exposition) pourrait traduire une inhibition des gènes responsables dans le processus de l'apoptose chez les larves exposées aux nanoplastiques. Cependant, il serait souhaitable d'examiner l'expression des gènes impliqués dans le processus de l'apoptose chez l'embryon du poisson-zèbre exposé aux NPPs afin de mieux cerner le mécanisme d'action de nanoplastique sur le processus d'apoptoses au cours du développement embryonnaire des poissons-zèbres. Par ailleurs, la diminution de l'apoptose peut induire de l'altération au niveau du développement de l'œil.

4.2 Activité embryonnaire et comportements des larves

Dans notre étude, les paramètres d'activité embryonnaires (burst activity et burst count) n'ont pas significativement été impactés par l'exposition aux nanoplastiques en dehors du burst activity à 28 hpf qui avait diminué chez les larves exposées. Toutefois, une légère diminution, mais non significative, du pourcentage de burst activity a été observée dans les groupes d'exposition pendant les autres temps de mesure. Les modifications d'activité chez les embryons de poisson-zèbre peuvent être utilisées comme des marqueurs précoces de neurotoxicité (Raftery *et al.*, 2014; Walpitagama *et al.*, 2019). Les résultats de notre étude laissent entrevoir un effet neurophysiologique des nanoplastiques sur les embryons. L'étude mérite d'être approfondie à travers la détermination des marqueurs enzymatiques de neurotoxicité comme l'acétylcholinestérase (Walpitagama *et al.*, 2019).

Concernant la locomotion des larves, nous avons remarqué qu'elles ont parcouru plus de distance dans l'obscurité que dans la lumière, quel que soit le groupe. Cela rejoint les observations faites dans plusieurs études (Torres-Ruiz *et al.*, 2021). Cependant, dans notre étude, l'exposition aux nanoplastiques n'a pas eu d'effet perceptible sur la distance parcourue. Tout comme les modifications de l'activité embryonnaire, l'altération de l'activité locomotrice est un outil d'évaluation des effets neurologiques potentiels des substances toxiques (Selderslaghs *et al.*, 2010; Orger et de Polavieja, 2017). La plupart des études de toxicité des nanoplastiques ont mis en évidence une réduction de la locomotion pendant l'obscurité suite à une exposition aux nanoplastiques (Chen *et al.*, 2017a; Pitt *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2021). Cependant, les particules de nanoplastiques utilisées dans ces études sont de tailles plus petites que les nôtres avec des concentrations plus élevées. Dans notre expérimentation, cela semble se vérifier, car, malgré l'absence de différence significative entre les deux groupes, nous avons remarqué une légère diminution de la distance parcourue par les larves dans le groupe d'exposition. Cela peut révélateur de stress dû à l'exposition aux nanoplastiques. Ceci a été confirmé par la thigmotaxie des larves du groupe d'exposition qui était significativement plus faible par rapport à celles du groupe contrôle.

4.3 Fréquence cardiaque et consommation d'oxygène

L'évaluation de la consommation d'oxygène à travers la respirométrie est un important outil d'évaluation du stress chez les poissons. Il se base sur le principe selon lequel les coûts homéostatiques sont plus élevés chez les poissons stressés que chez les poissons non stressés (Schreck, 1990). L'absence de différence significative en ce qui concerne la consommation d'oxygène entre les deux groupes suggère qu'il n'y a pas eu d'influence des nanoplastiques sur le métabolisme énergétique des larves à 48 hpf et 72 hpf. Cependant, des effets métaboliques plus perceptibles pourraient se produire plus tard en raison d'une exposition prolongée aux NPPs.

A 48 et 96 hpf, nous avons noté une bradycardie chez les larves exposées aux nanoplastiques. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres études (Pitt *et al.*, 2018; Duan *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021). Cette altération de la fréquence cardiaque chez les larves exposées serait le signal d'un stress oxydatif engendré par l'exposition aux nanoplastiques (Chen *et al.*, 2017a).

5 Conclusion

Les nanoplastiques constituent de nos jours une source de toxicité importante pour l'environnement aquatique à cause de leurs effets sur les organismes aquatiques et de leur bioaccumulation. L'exposition des poissons-zèbres aux nanoplastiques de polystyrène de 250 nm de taille à une 1000 µg/l de concentration a provoqué une faible mortalité à 24 hpf et 48 hpf chez les embryons, une diminution de l'activité des embryons et de la surface vitelline chez les larves respectivement à 24 et 96 hpf une bradycardie à 96 hpf. Cette étude nous a permis de comprendre que les nanoplastiques ayant une taille de 250 nm n'ont pas des effets létaux sur les embryons en développement mise à part une diminution de la vitesse vitelline et du rythme cardiaque. Ceci explique le fait que les nanoplastiques n'ont pas pu pénétrer les pores du chorion pour induire des effets à l'intérieur du chorion. Cependant, la diminution de la consommation d'oxygène peut être liée au métabolisme des larves et de l'expression de certains gènes. Par conséquent, il serait important d'étudier les gènes responsables du métabolisme énergétique chez les larves. Notre étude s'est dirigée sur une seule concentration de 1000µg/l de nanoplastique. Pour approfondir les recherches sur la toxicité des nanoplastiques, il serait important d'utiliser les concentrations plus élevées (2000, 3000 µg/l) que celle utilisée dans la présente étude. Par ailleurs, nous suggérons de prospecter les effets que pourraient induire les nanoplastiques de petite taille (≤ 50 nm) et de différentes formes (billes, fragments, fibres) sur les stades précoces de développement embryonnaire. Nous suggérons à la suite de notre étude, une recherche plus approfondie de l'effet de ces nanoplastiques sur les larves après 4 ipf

Référence bibliographique

- Assoumani A., Strub M.-P., Lardy-Fontan S., Alasonati E., Galgani F., 2019. *Microplastiques dans les eaux de surface continentales*
- Bernut A., Lutfalla G., Kremer L., 2015. Regard à travers le danio pour mieux comprendre les interactions hôte/pathogène. *Medecine/Sciences* 31 (6-7): 638-646
- Bhagat J., Zang L., Nakayama H., Nishimura N., Shimada Y., 2021. Effects of nanoplastic on toxicity of azole fungicides (ketoconazole and fluconazole) in Zebrafish embryos. Science of The Total Environment 800: 149463
- Boucher J., Friot D., 2020. *Microplastiques primaires dans les océans: évaluation mondiale des sources*. Gland, Suisse: UICN
- Brandts I., Barría C., Martins M.A., Franco-Martínez L., Barreto A., Tvarijonaviciute A., Tort L., Oliveira M., Teles M., 2021. Waterborne exposure of gilthead seabream (Sparus aurata) to polymethylmethacrylate nanoplastics causes effects at cellular and molecular levels. *Journal of Hazardous Materials* 403: 123590
- Brandts I., Teles M., Tvarijonaviciute A., Pereira M.L., Martins M.A., Tort L., Oliveira M., 2018. Effects of polymethylmethacrylate nanoplastics on Dicentrarchus labrax. *Genomics* 110 (6): 435-441
- Brun N.R., van Hage P., Hunting E.R., Haramis A.P.G., Vink S.C., Vijver M.G., Schaaf M.J.M., Tudorache C., 2019a. Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval Zebrafish. *Communications Biology* 2 (1)
- Brun N.R., van Hage P., Hunting E.R., Haramis A.P.G., Vink S.C., Vijver M.G., Schaaf M.J.M., Tudorache C., 2019b. Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval Zebrafish. *Communications Biology* 2 (1)
- Chae Y., Kim D., Kim S.W., An Y.-J., 2018. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Scientific reports* 8 (1): 1-11
- Chatterjee S., Sharma S., 2019. Effets sur la santé marine des microplastiques présents dans nos océans. In: L'indispensable réinvention des plastiques (Ed. La revue de l'institut VEOLIA: Facts reports). LA REVUE DE L'INSTITUT VEOLIA: FACTS REPORTS, 54-61
- Chen Q., Gundlach M., Yang S., Jiang J., Velki M., Yin D., Hollert H., 2017a. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward Zebrafish larvae locomotor activity. *Science of the Total Environment* 584-585: 1022-1031

- Chen Q., Gundlach M., Yang S., Jiang J., Velki M., Yin D., Hollert H., 2017b. Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward Zebrafish larvae locomotor activity. *Science of the Total Environment* 584-585: 1022-1031
- Cheng H., Duan Z., Wu Y., Wang Y., Zhang H., Shi Y., Zhang H., Wei Y., Sun H., 2022. Immunotoxicity responses to polystyrene nanoplastics and their related mechanisms in the liver of Zebrafish (Danio rerio) larvae. *Environment International* 161
- Cole L., Ross L., 2001. Apoptosis in the developing Zebrafish embryo. *Developmental biology* 240 (1): 123-142
- Costa M.F., Ivar Do Sul J.A., Silva-Cavalcanti J.S., Araújo M.C.B., Spengler Â., Tourinho P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: A snapshot of a Brazilian beach. *Environmental Monitoring and Assessment* 168 (1-4): 299-304
- da Costa J.P., Santos P.S.M., Duarte A.C., Rocha-Santos T., 2016. (Nano) plastics in the environment–sources, fates and effects. *Science of the total environment* 566: 15-26
- Daouk T., 2012. Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (Danio rerio) par des PCB et des HAP Tarek Daouk To cite this version : HAL Id : tel-00753036 Effets de contaminations d'embryons et d' adultes de poissons zèbres (Danio rerio)
- Davranche M., Veclin C., Pierson-Wickmann A.-C., El Hadri H., Grassl B., Rowenczyk L., Dia A., Ter Halle A., Blancho F., Reynaud S., 2019. Are nanoplastics able to bind significant amount of metals? The lead example. *Environmental pollution* 249: 940-948
- Dawson A.L., Kawaguchi S., King C.K., Townsend K.A., King R., Huston W.M., Bengtson Nash S.M., 2018. Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nature communications* 9 (1): 1-8
- Duan Z., Duan X., Zhao S., Wang X., Wang J., Liu Y., Peng Y., Gong Z., Wang L., 2020. Barrier function of Zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. *Journal of Hazardous Materials* 395: 122621
- Elizalde-Velázquez A., Crago J., Zhao X., Green M.J., Cañas-Carrell J.E., 2020. In vivo effects on the immune function of fathead minnow (Pimephales promelas) following ingestion and intraperitoneal injection of polystyrene nanoplastics. *Science of the Total Environment* 735: 79-110
- Fraher D., Sanigorski A., Mellett N.A., Meikle P.J., Sinclair A.J., Gibert Y., 2016. Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell reports* 14 (6): 1317-1329

- Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V.I., Heyder J., Gehr P., 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives* 113 (11): 1555-1560
- Gigault J., Ter Halle A., Baudrimont M., Pascal P.-Y.Y., Gauffre F., Phi T.-L.L., El Hadri H., Grassl B., Reynaud S., Halle A. ter, Baudrimont M., Pascal P.-Y.Y., Gauffre F., Phi T.-L.L., El Hadri H., Grassl B., Reynaud S., 2018. Current opinion: what is a nanoplastic? *Environmental pollution* 235: 1030-1034
- Gonçalves J.M., Bebianno M.J., 2021. Nanoplastics impact on marine biota: A review. *Environmental Pollution* 273
- González-Fernández C., Díaz Baños F.G., Esteban M.Á., Cuesta A., 2021. Functionalized nanoplastics (NPs) increase the toxicity of metals in fish cell lines. *International journal of molecular sciences* 22 (13): 7141
- Han Y., Lian F., Xiao Z., Gu S., Cao X., Wang Z., Xing B., 2022. Potential toxicity of nanoplastics to fish and aquatic invertebrates: Current understanding, mechanistic interpretation, and meta-analysis
- Hu Q., Wang H., He C., Jin Y., Fu Z., 2021. Polystyrene nanoparticles trigger the activation of p38 MAPK and apoptosis via inducing oxidative stress in Zebrafish and macrophage cells. *Environmental Pollution* 269: 116075
- Jacob H., 2020. Effet des microplastiques sur les jeunes stades de vie des poissons marins. Université Paris, France, 183 p.
- Jacquin J., 2020. Ecotoxicologie microbienne des plastiques en mer : Colonisation et biodégradation par la plastisphère 266
- Kane D.A., Kimmel C.B., 1993. The Zebrafish midblastula transition. *Development* 119 (2): 447-456
- Kantha P., Liu S.-T., Horng J.-L., Lin L.-Y., 2022. Acute exposure to polystyrene nanoplastics impairs skin cells and ion regulation in Zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology* 106203
- Karlsson T.M., Vethaak A.D., Almroth B.C., Ariese F., van Velzen M., Hassellöv M., Leslie H.A., 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. *Marine pollution bulletin* 122 (1-2): 403-408
- Kim D., Chae Y., An Y.J., 2017. Mixture Toxicity of Nickel and Microplastics with Different Functional Groups on Daphnia magna. *Environmental Science and Technology* 51 (21): 12852-12858
- Kimelman D., Griffin K.J., 2000. Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Current opinion in genetics & development* 10 (4): 350-356

- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F., 1995. Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Developmental dynamics* 203 (3): 253-310
- Klemeš J.J., Fan Y. Van, Jiang P., 2021. Plastics: friends or foes? The circularity and plastic waste footprint. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects* 43 (13): 1549-1565
- Koelmans A.A., Besseling E., Shim W.J., 2015. Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. *Marine anthropogenic litter* 325-340
- Lahens L., Strady E., Kieu-Le T.C., Dris R., Boukerma K., Rinnert E., Gasperi J., Tassin B., 2018. Macroplastic and microplastic contamination assessment of a tropical river (Saigon River, Vietnam) transversed by a developing megacity. *Environmental Pollution* 236: 661-671
- Langdon Y.G., Mullins M.C., 2011. Maternal and zygotic control of Zebrafish dorsoventral axial patterning. *Annual review of genetics* 45: 357-377
- Lee W.S., Cho H.-J., Kim E., Huh Y.H., Kim H.-J., Kim B., Kang T., Lee J.-S., Jeong J., 2019. Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in Zebrafish embryos. *Nanoscale* 11 (7): 3173-3185
- Lehner R., Weder C., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B., 2019. Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. *Environmental science & technology* 53 (4): 1748-1765
- LeMoine C.M., Kelleher B.M., Lagarde R., Northam C., Elebute O.O., Cassone B.J., 2018. Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing Zebrafish (Danio rerio). *Environmental pollution* 243: 591-600
- Li Y., Liu S., Wang Q., Zhang Y., Chen X., Yan L., Junaid M., Wang J., 2022. Polystyrene nanoplastics aggravated ecotoxicological effects of polychlorinated biphenyls in on Zebrafish (Danio rerio) embryos. *Geoscience Frontiers* 13 (3): 101376
- Lusher A.L., Hernandez-Milian G., O'Brien J., Berrow S., O'Connor I., Officer R., 2015. Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: the True's beaked whale Mesoplodon mirus. *Environmental Pollution* 199: 185-191
- Ma J., Chen F., Xu H., Jiang H., Liu J., Li P., Chen C.C., Pan K., 2021. Face masks as a source of nanoplastics and microplastics in the environment: quantification, characterization, and potential for bioaccumulation. *Environmental Pollution* 288: 117748
- Marie G., 2021. Effets de l'ingestion de microplastiques sur l'immunité innée des larves de poissons zèbres (Danio rerio). PhD Thesis, Faculté des sciences, Université catholique de Louvain, 83 p.

- McCluskey B.M., Braasch I., 2020. Zebrafish phylogeny and taxonomy. *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications* 15-24
- McGoran A.R., Clark P.F., Morritt D., 2017. Presence of microplastic in the digestive tracts of European flounder, Platichthys flesus, and European smelt, Osmerus eperlanus, from the River Thames. *Environmental Pollution* 220: 744-751
- Meier P., Finch A., Evan G., 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407 (6805): 796-801
- Mitrano D.M., Wick P., Nowack B., 2021. Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution. *Nature nanotechnology* 16 (5): 491-500
- Orger M.B., de Polavieja G.G., 2017. Zebrafish behavior: opportunities and challenges. *Annual review of neuroscience* 40: 125-147
- Parker L., 2017. 91% Des Déchats Plastiques Ne Sont Pas Recyclés. *National geographic*
- Parmentier C., 2019. Pourquoi le poisson zebre -AFH-2009 (January 2009)
- Pedersen A.F., Meyer D.N., Petriv A.M.V., Soto A.L., Shields J.N., Akemann C., Baker B.B., Tsou W.L., Zhang Y., Baker T.R., 2020a. Nanoplastics impact the Zebrafish (Danio rerio) transcriptome: Associated developmental and neurobehavioral consequences. *Environmental Pollution* 266
- Pedersen A.F., Meyer D.N., Petriv A.M. V., Soto A.L., Shields J.N., Akemann C., Baker B.B., Tsou W.L., Zhang Y., Baker T.R., 2020b. Nanoplastics impact the Zebrafish (Danio rerio) transcriptome: Associated developmental and neurobehavioral consequences. *Environmental Pollution* 266
- Pitt J.A., Kozal J.S., Jayasundara N., Massarsky A., Trevisan R., Geitner N., Wiesner M., Levin E.D., Di Giulio R.T., 2018. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing Zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology 194: 185-194
- PlasticsEurope, 2022. Plastics the Facts 2021 https://plasticseurope.org/wpcontent/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf (consulté le 20 mars 2022)
- Porcher J.-M., Delahaye C., Hervin D., Brion F., Poulsen V., 2005. Caractérisation du développement embryo-larvaire chez le Zebrafish (Danio rerio) et comparaison des tests de toxicité aiguë sur les stades embryo-larvaire et adulte Rapport technique 1-26
- Possatto F.E., Barletta M., Costa M.F., do Sul J.A.I., Dantas D. V, 2011. Plastic debris ingestion by marine catfish: an unexpected fisheries impact. *Marine pollution bulletin* 62 (5): 1098-1102

- Qiang L., Cheng J., 2019. Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (Danio rerio). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 176: 226–233. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.088.
- Raftery T.D., Isales G.M., Yozzo K.L., Volz D.C., 2014. High-content screening assay for identification of chemicals impacting spontaneous activity in Zebrafish embryos. *Environmental science & technology* 48 (1): 804-810
- Rawson D.M., Zhang T., Kalicharan D., Jongebloed W.L., 2000. Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the Zebrafish Brachydanio rerio: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research* 31 (3): 325-336
- Renault A., 2022. Pêche, pollution, réchauffement: comment les sciences marines peuvent nous aider à sauvegarder l'océan. *The Conversation*
- Richardson S.D., Kimura S.Y., 2020. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* 92 (1): 473-505
- Rodaway A., Takeda H., Koshida S., Broadbent J., Price B., Smith J.C., Patient R., Holder N., 1999. Induction of the mesendoderm in the Zebrafish germ ring by yolk cell-derived TGF-beta family signals and discrimination of mesoderm and endoderm by FGF. *Development* 126 (14): 3067-3078
- Saggese I., Sarà G., Dondero F., 2016. Silver Nanoparticles Affect Functional Bioenergetic Traits in the Invasive Red Sea Mussel Brachidontes pharaonis. *BioMed Research International* 2016: 1872351
- SCHRECK C.B., 1990. Physiological, behavioral, and performance indicators of stress. 29-37
- Schwaferts C., Niessner R., Elsner M., Ivleva N.P., 2019. Methods for the analysis of submicrometer-and nanoplastic particles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112: 52-65
- Selderslaghs I.W., Hooyberghs J., De Coen W., Witters H.E., 2010. Locomotor activity in Zebrafish embryos: a new method to assess developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and teratology* 32 (4): 460-471
- Sharma S., Chatterjee S., 2017a. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (27): 21530-21547
- Sharma S., Chatterjee S., 2017b. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (27): 21530-21547

- Smith N.L., Kimelman D., 2020. Establishing the body plan: The first 24 hours of Zebrafish development. In: The Zebrafish in Biomedical Research. ELSEVIER, 81-88
- Sökmen T.Ö., Sulukan E., Türkoğlu M., Baran A., Özkaraca M., Ceyhun S.B., 2020. Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of Zebrafish embryo (Danio rerio). *Neurotoxicology* 77: 51-59
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C., 2008. The behaviour and ecology of the Zebrafish, Danio rerio. *Biological Reviews* 83 (1): 13-34
- Stephens B., Azimi P., El Orch Z., Ramos T., 2013. Ultrafine particle emissions from desktop 3D printers. *Atmospheric Environment* 79: 334-339
- Sun X.-D., Yuan X.-Z., Jia Y., Feng L.-J., Zhu F.-P., Dong S.-S., Liu J., Kong X., Tian H., Duan J.-L., Ding Z., Wang S.-G., Xing B., 2020. Differentially charged nanoplastics demonstrate distinct accumulation in Arabidopsis thaliana. *Nature Nanotechnology* 15 (9): 755-760
- Torres-Ruiz M., De la Vieja A., de Alba Gonzalez M., Lopez M.E., Calvo A.C., Portilla A.I.C., 2021. Toxicity of nanoplastics for Zebrafish embryos, what we know and where to go next. *Science of The Total Environment* 797: 149125
- Vranic S., Shimada Y., Ichihara S., Kimata M., Wu W., Tanaka T., Boland S., Tran L., Ichihara G., 2019. Toxicological evaluation of SiO2 nanoparticles by Zebrafish embryo toxicity test. *International journal of molecular sciences* 20 (4): 882
- Walpitagama M., Carve M., Douek A.M., Trestrail C., Bai Y., Kaslin J., Wlodkowic D., 2019. Additives migrating from 3D-printed plastic induce developmental toxicity and neuro-behavioural alterations in early life Zebrafish (Danio rerio). *Aquatic Toxicology* 213: 105227
- Wang L., Wu W.-M., Bolan N.S., Tsang D.C.W., Li Y., Qin M., Hou D., 2021. Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives. *Journal of hazardous materials* 401: 123415
- Wang Q., Huang F., Liang K., Niu W., Duan X., Jia X., Wu X., Xu P., Zhou L., 2022. Polystyrene nanoplastics affect digestive function and growth in juvenile groupers. *Science of The Total Environment* 808: 152098
- Warga R.M., Kimmel C.B., 1990. Cell movements during epiboly and gastrulation in Zebrafish. *Development* 108 (4): 569-580
- Wilson C., 2012. Aspects of larval rearing. ILAR journal 53 (2): 169-178
- Wright S.L., Kelly F.J., 2017. Plastic and human health: a micro issue? Environmental science & technology 51 (12): 6634-6647

- Xie S., Zhou A., Wei T., Li S., Yang B., Xu G., Zou J., 2021. Nanoplastics Induce More Serious Microbiota Dysbiosis and Inflammation in the Gut of Adult Zebrafish than Microplastics. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 107 (4): 640-650
- Yamashita M., 2003. Apoptosis in Zebrafish development. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 136 (4): 731-742
- Yang L., Wang X., Ma J., Li G., Wei L., Sheng G.D., 2022. Nanoscale polystyrene intensified the microbiome perturbation and antibiotic resistance genes enrichment in soil and Enchytraeus crypticus caused by tetracycline. *Applied Soil Ecology* 174: 104426
- Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A., 2013. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environmental science* & *technology* 47 (13): 7137-7146
- Zhang R., Silic M.R., Schaber A., Wasel O., Freeman J.L., Sepúlveda M.S., 2020. Exposure route affects the distribution and toxicity of polystyrene nanoplastics in Zebrafish. *Science of the Total Environment* 724: 138065
- Zuo J., Huo T., Du X., Yang Q., Wu Q., Shen J., Liu C., Hung T.C., Yan W., Li G., 2021. The joint effect of parental exposure to microcystin-LR and polystyrene nanoplastics on the growth of Zebrafish offspring. *Journal of Hazardous Materials* 410