

Travail de fin d'études

Auteur : Yemelié Nguéfeu, Danielle

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/2268.2/16483>

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.



FACULTE DES SCIENCES

**MASTER DE SPECIALISATION EN GESTION DES RESSOURCES AQUATIQUES
ET AQUACULTURE**

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES

**TOXICITE DES FRAGMENTS DE MICROPLASTIQUES SUR LA SURVIE, LE
COMPORTEMENT ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES LARVES DE
POISSON-ZEBRE**

Rapport réalisé par

YEMELIE NGUEFEU Danielle

Année académique 2021-2022

Remerciements

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude à tous ces enseignants qui ont accepté de faire partie du jury d'évaluation et qui j'espère trouveront un réel plaisir à lire et évaluer ce travail : M. Patrick Kestemont et Mme Valérie Cornet, Mme Sylvie Gobert et M. Frederick De Laender.

Je tiens particulièrement à remercier Professeur Patrick Kestemont, Directeur de l'URBE (Unité de Recherche de Biologie Evolutive) pour m'avoir permis d'effectuer mon travail de fin d'études dans son unité de recherche. A mes promoteurs Professeur Patrick Kestemont et Docteur Valérie Cornet pour l'encadrement et l'attention qu'ils m'ont portée.

A toute l'équipe de l'ARES-CDD pour le privilège qu'elle m'a accordée de pouvoir faire partir de la dernière promotion du Master Geraa. A tous les enseignants de ce programme pour leur dévouement ainsi que la qualité des enseignements.

Je tiens également à remercier l'ensemble de ces personnes sans qui rien n'aurait été possible. Dans un premier temps Mesdames Omayma Missawi et Mathilde Oger pour leurs implications dans l'avancement des travaux et aux « filles de Valérie » Charlotte, Océane, Sabine et Aline, merci pour votre soutien ainsi que vos encouragements les filles.

Ce travail bien qu'imparfait pourra voir le jour grâce à toi, « le meilleur de moi » comme j'aime bien t'appeler. Tu as toujours été là pour m'encourager lorsque je voulais jeter l'éponge, et quand la solitude m'envahissait, tu séchais mes larmes même à distance. Merci pour ce sacrifice, aussi pénible il a été tu as tenu bon et pris soin du précieux cadeau de notre union, nos filles. Vous me manquez tellement et à très bientôt, je vous aime.

Des collaborations ont donc été faites avec d'autres laboratoires auxquels je tiens à exprimer toute ma gratitude plus précisément le Département de Physique en Faculté des Sciences (FUNDP) pour les analyses par spectroscopie FT-IR et la SEM ainsi que le département de Biosciences pour les analyses de FACS. Merci pour votre disponibilité ainsi que votre accueil.

Résumé

Généralement, les microplastiques sont détectés dans les environnements aquatiques, et leurs effets potentiels sur le système immunitaire suscitent de plus en plus d'interrogations. Dans cette étude, le poisson zèbre *Danio rerio* et la bactérie *Aeromonas salmonicida achromogenes* ont été utilisés comme organismes modèles pour l'exposition aux microplastiques en laboratoire. Un challenge bactérien a été réalisé à 6 hpf dans le but de stimuler le système immunitaire des larves de poisson zèbre. Nous avons étudié les effets toxiques d'un type de microplastique très présent dans notre environnement direct le polyéthylène téréphtalate (PET) extrait d'une bouteille plastique de coca-cola. Les résultats ont montré une létalité nulle ou faible chez *D. rerio* après une exposition pendant 96 hpf à 1000 µg/l de fragments de microplastiques de taille 5-15µm. A l'issue de ce travail, les résultats ont montré que l'exposition des larves aux microplastiques PET et l'infection bactérienne ont significativement affectées de façon générale le comportement et le système immunitaire du poisson zèbre.

Mots clés : Polyéthylène téréphtalate, *Aeromonas salmonicida*, *Danio rerio*, exposition, challenge bactérien

Abstract

Microplastics have been frequently detected in aquatic environments, and the potential effects on the immune system are of increasing concern. In this study, the zebrafish *Danio rerio* and the bacterium *Aeromonas salmonicida achromogenes* were used as model organisms for microplastic exposure in the laboratory. A bacterial challenge was performed at 6 hpf in order to stimulate the immune system of zebrafish larvae. We studied the toxic effects of a type of microplastic very present in our direct environment, polyethylene terephthalate (PET) extracted from a plastic Coca-Cola bottle. The results showed no or low lethality in *D. rerio* after exposure for 96 hpf to 1000 µg/l of microplastic fragments of size 5-15µm. At the end of this work, the results showed that the exposure of the larvae to PET microplastics and the bacterial infection significantly affected in general the behavior and the immune system of the zebrafish.

Key words: polyethylene terephthalate, *Aeromonas salmonicida*, *Danio rerio*, exposure, bacterial challenge

Liste des abréviations et acronymes

UV : Ultraviolet

POP : Polluants organiques persistants

PCB : Polychlorobiphényles

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

PBDE : Polybromodiphényléthers

PVC : Poly (chlorure de vinyle)

MPs : Microplastiques

OCDE : Organisation de coopération et de développement économique

UE : Union européenne

PAMP : Modèle moléculaire associé aux agents pathogènes

TCR : Tcell receptor

DEG : Differential expressed genes

ATR-FTIR : Réfractance totale atténuée- Infrarouge à transformée de fourrier

SEM : Microscopie électronique à balayage

BHI : Brain heart infusion

CFU : Unité formant colonies

CMF : Cytométrie en flux

BPM : Battements par minute

DMSO : Diméthylsulfoxyde

MS 222: Tricaine methane sulfonate

PET: Polyethylene terephthalate

Table des matières

<i>Remerciements</i>	<i>i</i>
<i>Résumé</i>	<i>ii</i>
<i>Liste des abréviations et acronymes</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>vi</i>
1.1 MICROPLASTIQUES	1
1.1.1. Composition des microplastiques	2
1.1.2. Sources de microplastiques.....	3
1.1.3. Processus de dégradation des microplastiques dans l'environnement.....	5
1.1.4. Impacts des microplastiques	5
1.2. Microplastiques : Potentiel vecteur	7
1.3. MODELE BIOLOGIQUE : POISSON ZEBRE	8
1.3.1. Choix du modèle biologique.....	8
1.3.2. Description du poisson zèbre	9
1.3.3. Cycle de vie et de reproduction du poisson zèbre.....	10
1.4. Système immunitaire	13
1.4.1. Système immunitaire naturel ou inné	13
1.4.2. Le système immunitaire acquis.....	15
1.4.3. Effets des microplastiques	16
1.5. Objectif de l'étude	18
2. Matériel et méthodes	18
2.1. Caractérisation des microplastiques	18
2.2. Elevage des poissons zèbres	19
2.3. Conditions expérimentales	19
2.3.1. Décontamination des MPs	19
2.3.2. Exposition des embryons	20
2.3.3. Quantification des bactéries par cytométrie en flux.	21
2.3.4. Suivi de l'activité, la mortalité, la cardiologie, morphologie et comportement des larves	22
2.3.5. Suivi et évolution de la mise en place du biofilm.....	23

2.3.6. Evaluation de la présence de cellules apoptotiques (coloration à l'acridine orange)	23
2.4. Analyses statistiques	24
3. Résultats	25
3.1. Suivi de la décontamination des MPs	25
3.2. Caractérisation des microplastiques	25
3.3. Evaluation de la quantification bactérienne et évolution de la mise en place du biofilm	27
3.4. Évaluation de l'activité des embryons, du taux de mortalité, du taux d'éclosion, de la fréquence cardiaque, de la morphologie des embryons après exposition	27
3.5. Analyse des cellules apoptotiques après coloration à l'acridine orange	29
3.6. Analyse du comportement des larves	30
4. Discussion	33
5. Conclusion	37
Références bibliographiques	38

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification taxonomique du poisson zèbre	9
Tableau 2 : Concentrations des populations bactériennes prélevés à partir des échantillons de bactéries et de MPs combinés aux bactéries 24h après exposition. CT : contrôle +Bactéries et MP : Microplastiques+ Bactéries.....	27
Tableau 3: Taux d'éclosion (%) des larves à 48h (n=30). Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries	29
Tableau 4 : Moyenne et écart-type de la fréquence cardiaque (BPM) et la longueur (μm) des embryons à 48h (n=60). Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries	29

Liste des figures

Figure 1 : Répartition des polymères de microplastiques dans l'eau en fonction de leur densité (Gesamp, 2015).....	3
Figure 2 : Différentes formes de microplastiques : a) Fibres synthétiques (McLachlan Laura, Université de Liège, non publié), microbilles plastiques (polyéthylène) utilisées comme particules exfoliantes dans des crèmes de soin pour la peau (Kedzierski et al., 2017), granulés plastiques industriels (Kedzierski et al., 2017).....	4
Figure 3 : Biodégradation du plastique par les bactéries (İpekog'lu et al., 2007).	5
Figure 4 : Tortue piégée par un filet de pêche : pêche fantôme (Kedzierski et al., 2017).....	7
Figure 5 : Mâle et femelle adulte de poisson zèbre (Bourrachot, 2009).	10
Figure 6 : Cycle de vie du poisson zèbre (Bourrachot, 2009).	11
Figure 7 : Récapitulatif des stades de développement du poisson zèbre en relation avec les stades régulés ou non par l'UE (Embry et al., 2010).	13
Figure 8 : Constituants de l'immunité innée chez le poisson (Eryalçın, 2018).	14
Figure 9 : (A) (B) Coupe transversale de l'intestin du poisson zèbre après exposition à des microplastiques de polystyrène de 15 µm pendant 21 jours à des concentrations de 10 µg/L, (C) Graphique du taux de sécrétion du mucus(Qiao et al., 2019).....	17
Figure 10 : Cage de reproduction (Techniplast.it)	19
Figure 11 : Moniteur SEM avec a) une colonne d'électrons ; b) une chambre d'échantillon ; c) un détecteur EDS ; d) une console électronique ; e) Des écrans d'affichage (labetesting.com).	20
Figure 12 : Protocole expérimental d'exposition des larves de poisson zèbre aux fragments de polyéthylène téréphtalate (PET) de 5-15 µm pendant 4 jours selon les quatre conditions d'exposition. Un challenge bactérien a été réalisé à 6 hpf.....	23
Figure 13 : Photographies des fragments de MPs après différents traitements. (a) Contrôle, (b) H ₂ O ₂ 30%. (c) KOH 10%. (d) KOH 20% et (e) KOH alcoolique.....	25
Figure 14 : (A) Fragments de MPs (> 50 µm) visualisés avec la SEM avant l'exposition; (B) Groupes fonctionnels.	26
Figure 15 : Caractérisation des fragments de MPs par le FTIR.	26
Figure 16 : Observation SEM de la colonisation bactérienne des MPs+Bact après 24h.	27
Figure 17 : Activité des embryons (%) à 24 hpf en fonction des différentes conditions (n=20). Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les différentes conditions	

<i>d'exposition. Ctrl : Contrôle, MPs : Microplastiques, Ctrl+Bact : Bactéries ; MPs+Bact : Microplastiques combinés aux bactéries.</i>	<i>28</i>
Figure 18 : <i>Taux de mortalité (%) des embryons après 24h d'exposition en fonction des différentes conditions d'expérimentation (n=30). Ctrl : Contrôle, MPs : Microplastiques, Ctrl+Bact : Bactéries ; MPs+Bact : Microplastiques combinés aux bactéries</i>	<i>28</i>
Figure 19 : <i>Nombre d'évènements apoptotiques (A); Embryon de poisson zèbre coloré à l'acridine orange (B) présentant des cellules mortes (vert-brillant et rouge) dans l'œil (a), le cœur (b), et le vitellus (c) Echelle = 1000 μm (n=60). Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les différentes conditions d'exposition Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries</i>	<i>30</i>
Figure 20 : <i>Répartition de la distance parcourue (mm) des larves lors de l'activité de nage à 96 hpf (n=48). Les lettres a et b et c indiquent les différences significatives entre les différentes conditions d'exposition. Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries</i>	<i>31</i>
Figure 21 : <i>Distribution de la distance parcourue (mm) des larves en réponse au stimulus (Tapping) dans les différentes conditions à 96 hpf (n=48). Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries</i>	<i>32</i>

1. INTRODUCTION

Le plastique occupe une place centrale dans notre vie quotidienne ainsi que dans l'économie moderne avec ses multiples applications aussi bien dans les industries que pour les consommateurs. Les statistiques Européennes en 2016 ont révélé leur présence majoritairement dans le secteur de l'emballage (39.9%), de la construction (19.7%), de l'automobile (10%), des équipements électriques et électroniques (6.2%) (PlasticEurope, 2021). Selon l'UE, seulement 42% des emballages plastiques sont recyclés à côté des emballages métalliques (papier carton, verre) qui quant à eux ont un taux de recyclage nettement plus élevé. Ce faible taux de recyclage est à l'origine du rejet des plastiques dans l'environnement (4,8 à 12,7 millions de déchets déversés dans les océans) (PlasticEurope, 2021). La production mondiale en 1950 qui était estimée à 1,5 million de tonnes est passée à 9,2 milliards de tonnes en 2017 ce qui représente environ une tonne par personne vivant sur la planète terre. Cette production exponentielle s'explique par une demande de plus en plus croissante de cette matière ceci dû à leur faible coût, leur légèreté, leur polyvalence et leur résistance par rapport aux matériaux tels que l'acier, le ciment et l'aluminium. A cause de cette résistance, le plastique apparaît à la fois comme un avantage et un inconvénient pour la simple raison qu'il se dégrade lentement. Malgré la persistance de ce dernier dans la nature, il subit des dégradations donnant lieu aux particules de faibles tailles nommées microplastiques.

1.1 MICROPLASTIQUES

Tous les ans, près de 8 millions de tonnes métriques de plastiques finissent leur course dans l'océan, après avoir transité par les rivières, les côtes littorales, etc (Rowencyk et al., 2021). Lorsqu'ils arrivent dans l'environnement, ces plastiques peuvent être transportés par les vents, exposés à la lumière ou aux rayons du soleil. Ils peuvent flotter à la surface de l'eau, se retrouver à différents niveaux de profondeur et même se déposer dans les fonds marins. Tous ces phénomènes engendrent leur fragmentation en taille plus ou moins petite. Lorsque la taille est comprise entre 5 millimètres (mm) à 1 μm , on parle de microplastiques. Etant de très petite taille et donc invisibles à l'œil nu, les microplastiques posent de plus en plus de problèmes et dont la recherche suscite un intérêt croissant (Gauthier, 2021). D'après (Crawford & Quinn, 2017), la catégorisation des microplastiques basée sur leur morphologie permet de distinguer : les pastilles, les microbilles, les fragments, les fibres, les films.

1.1.1. Composition des microplastiques

Les plastiques se définissent comme étant des composés de polymères organiques de synthèse obtenus par la polymérisation de monomères extraits du pétrole ou du gaz. En milieu aquatique, la composition des microplastiques est fonction de leur situation géographique, leur position dans la colonne d'eau et la densité des polymères qui détermine leur degré de flottabilité. En prenant en compte la densité de l'eau de mer estimée à 1,02 g/cm³ (Erni-Cassola et al., 2019), les polymères ayant une densité inférieure à celle-ci flotteront en surface contrairement à ceux dont la densité serait supérieure qui couleront au fond (Figure 1).

Au niveau des côtes, les microplastiques retrouvés à la surface des mers sont en majorité constitués de résines de polyéthylène, de polypropylène et de polystyrène expansé auxquels s'ajoutent d'autres polymères mais en moindres proportions (Vered & Shenkar, 2021). En haute mer, 90% du nombre de déchets retrouvé à la surface sont constitués de polyéthylène et les 10% restants sont faits en polypropylène produits par les industries et très persistants en pleine mer (ter Halle et al., 2016).

Les polymères plus denses tels que les polyesters, les polyacryliques (77% en moyenne) sont retrouvés dans les sédiments mais également de façon très surprenante, certains fragments de polymères moins denses que l'eau (Erni-Cassola et al., 2019) ayant subi un transport de la surface vers le fond sous l'action des microorganismes ou de l'énergie marine.

Lors de la fabrication du plastique, des additifs peuvent y être ajoutés et constituent en moyenne 4% de sa composition (Bouwmeester et al., 2015). Ils peuvent être des antioxydants, des pigments, des stabilisateurs, des retardateurs de flammes (Lupo & Angot, 2020). Leurs rôles sont entre autres : augmenter la flexibilité, la durabilité et la transparence du plastique (Fabres et al., 2016).

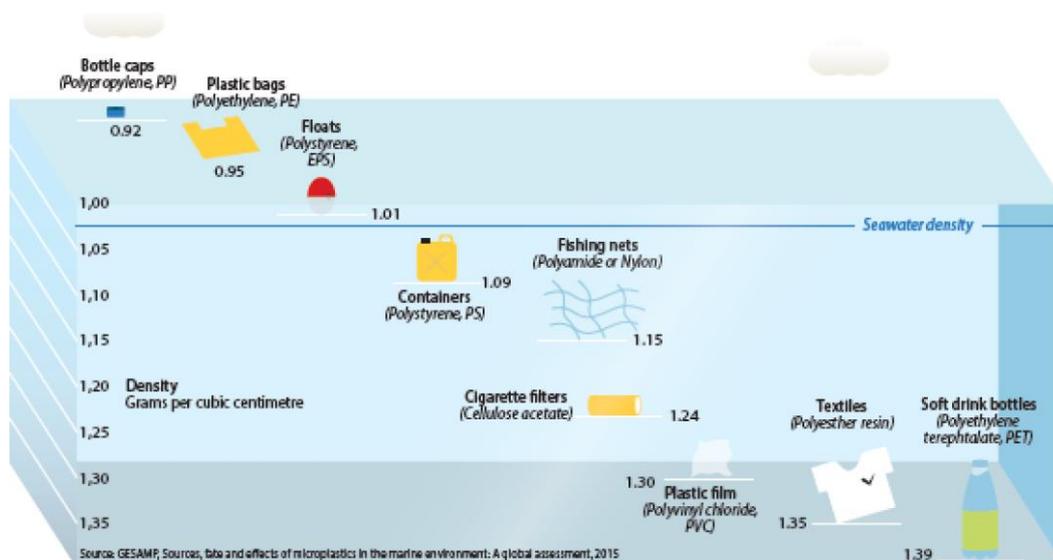


Figure 1 : Répartition des polymères de microplastiques dans l'eau en fonction de leur densité (Gesamp, 2015).

1.1.2. Sources de microplastiques

Dans l'environnement aquatique, deux grandes sources de microplastiques sont définies :

- Les microplastiques primaires

Ce sont des microplastiques dont le diamètre est inférieur à 5mm. Ils sont fabriqués par les industries de plastique sous forme de microparticules (Auta et al., 2017). Par ordre décroissant, les principales sources de ces microplastiques primaires sont : les pneus de voiture, les marquages à base de peinture, les résines de plastique et les vêtements synthétiques sous forme de fibres synthétiques (Hann et al., 2018).

Lors d'un freinage, d'une accélération ou encore en cas d'abrasion routière, le frottement qu'effectue les pneus sur la route crée un effet de friction entraînant l'usure des pneus et le détachement des microplastiques contenus dans les pneus. Ces microplastiques qui se retrouvent sur les routes sont par la suite entraînés sous l'action des eaux de pluie dans les stations d'épuration (Hann et al., 2018) et relargués dans les eaux puisque à cause de leurs petites tailles, ils ne peuvent être retenus lors de l'épuration (Sapea, 2019).

Certains microplastiques primaires sont issus des fibres synthétiques (Figure 2a) que l'on rencontre dans les vêtements synthétiques. Ces fibres synthétiques contiennent 78 % de polyester (pour les vêtements obtenus à partir des bouteilles plastiques recyclés) et 22% de fibres acryliques. Des expériences ont montré après analyse des eaux usées issues des machines à laver, qu'un vêtement fait à base de fibres synthétiques pouvait libérer près de 1900 fibres synthétiques pour un tour de machine (Browne et al., 2011).

Les jouets en plastique fabriqués dans les industries sont faits à partir de granules de microplastiques (Figure 2b) contenus dans la matière première. Ces microplastiques peuvent se retrouver dans les eaux à la suite d'un incident quelconque, lors du transport ou même du stockage.

Ces microplastiques primaires englobent également les microbilles (Figure 2c) assimilées aux produits cosmétiques ou produits d'hygiène corporelle (dentifrice, gel de douche) qui ont la capacité, par leurs propriétés abrasives d'augmenter le pouvoir nettoyant.

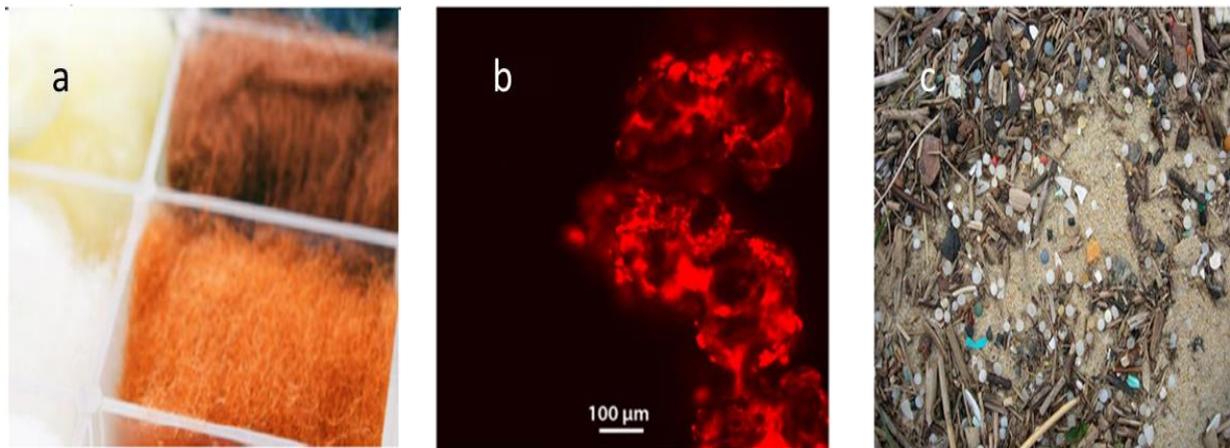


Figure 2: Différentes formes de microplastiques : a) Fibres synthétiques (McLachlan Laura, Université de Liège, non publié), microbilles plastiques (polyéthylène) utilisées comme particules exfoliantes dans des crèmes de soin pour la peau (Kedzierski et al., 2017), granulés plastiques industriels (Kedzierski et al., 2017).

- Les microplastiques secondaires

Ils résultent de la fragmentation de plastiques de plus grande taille ou macroplastiques (supérieur à 5mm) déjà présents dans l'environnement sous forme de déchets, en des fragments de plus petites tailles, par des processus tels que les forces mécaniques naturelles (soleil), chimiques et biologiques (Andrady, 2011; Browne, 2015). Le principal phénomène à l'origine de cette fragmentation de polymères de plastiques est la photodégradation (rayons UV). D'autres phénomènes de moindre mesure existent tels que : la biodégradation faisant intervenir les microorganismes, l'hydrolyse, la thermolyse, l'oxydation et les processus mécaniques entre autres l'érosion (Eich et al., 2015; Yoshida et al., 2016) . A l'issue de ces dégradations, on observe une altération de la structure des polymères avec une diminution de leur poids moléculaire, une perte de leurs propriétés mécaniques ainsi qu'une modification de leur signature spectrale (Gesamp, 2015).

1.1.3. Processus de dégradation des microplastiques dans l'environnement

La dégradation totale des microplastiques est un processus assez long raison pour laquelle la grande majorité des plastiques sont dits persistants. La première étape de ce processus de dégradation réside dans l'action des agents abiotiques. Ces agents concourent à la modification de la structure moléculaire ainsi que la perte des propriétés mécaniques des matériaux. Dans les conditions naturelles, on observe sous l'action de la photolyse et de certaines réactions chimiques une rupture des chaînes de polymères libérant des fragments de tailles différentes ainsi que des additifs poreux et instables de toutes sortes (Lupo & Angot, 2020). Le caractère photodégradable du plastique est étroitement lié à sa composition. La vitesse et le degré de dégradation quant à eux sont fonctions des propriétés des polymères : les polymères contenant les liaisons esters tel que le polyurethane vont être attaqués par les estérases ce qui va conférer au matériau un caractère plus ou moins hydrophobe (Andrady, 2011; İpekog˘lu et al., 2007). En fonction de la composition de ces polymères, les microorganismes viendront se fixer à leur surface et participer par la même occasion au processus de dégradation (Figure 3). Ces microorganismes commencent le processus de minéralisation lorsque les molécules deviennent suffisamment petites facilitant la libération des monomères et oligomères. A côté des polymères à liaisons esters, on a par exemple les matières synthétiques telles que le polyéthylène, le polyéthylène téréphtalate qui possèdent de fortes liaisons d'hydrogène les rendant moins accessibles aux enzymes et donc plus stables (Zbyszewski et al., 2014).

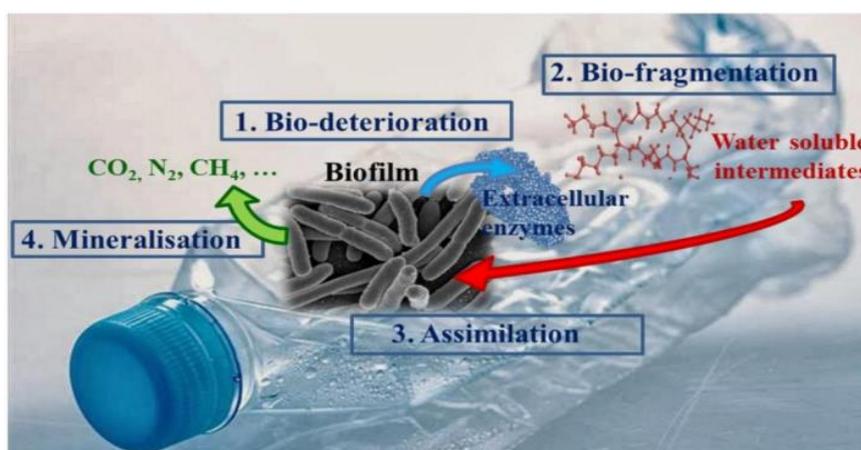


Figure 3: Biodégradation du plastique par les bactéries (İpekog˘lu et al., 2007).

1.1.4. Impacts des microplastiques

L'impact des microplastiques peut être appréhendé sous plusieurs angles.

Au niveau des écosystèmes ils constituent très souvent un habitat nouveau pour les microorganismes (bactéries, champignons, microalgues, virus) et macroorganismes benthiques

(arthropodes, bryozoaires, mollusques) (Carlton et al., 2017) . Ces espèces vont se fixer voir même se développer sur ces derniers en constituant une plastisphère et seront transportés sur des échelles d'espaces et de temps suffisamment grandes grâce à la capacité de persistance et de mobilité des plastiques (Zettler et al., 2013). Elles deviendront invasives au détriment des espèces endémiques aboutissant ainsi au bouleversement des communautés et donc de l'écosystème. En plus de ceci, certaines de ces espèces se sont révélées nuisibles, toxiques (ou de potentiels pathogènes) et responsables de certaines maladies chez les êtres humains, poissons ou coquillages (Dussud et al., 2018). Ceci pouvant s'expliquer par l'étendu du temps de contact entre le support et les espèces plus spécialement bactériennes favorisant un échange de matériel génétique et contribuant à cet effet à la propagation des résistances aux antibiotiques via les bactéries (Laganà et al., 2019).

Les impacts générés par les déchets plastiques au niveau des organismes sont principalement observés sur les animaux marins tels que les oiseaux marins, et mammifères piégés dans les déchets plastiques (Figure 4). Quant aux microplastiques, de par leur petite taille, ils sont ingérés par un nombre plus élevé d'espèces et obstruent le système digestif de ces derniers (Mazurais et al., 2015). Des expériences effectuées sur les poissons ont prouvé que le simple transit de ces microplastiques à travers le tractus digestif peut induire des modifications au niveau de la biologie de l'animal et induire des perturbations d'ordre physiologiques tels que la croissance, les défenses immunitaires et la reproduction (Sussarellu et al., 2016). Le rapport volume/surface des microplastiques ainsi que leur composition chimique leur permet d'absorber les métaux lourds et les polluants organiques persistants (POP) tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et les PCB (polychlorobiphényles) constituant ainsi une nouvelle source d'absorption des substances chimiques. Une fois au contact de ces polluants complexes (PCB, HAP, PBDE), les microplastiques peuvent être absorbés par les poissons où ils s'accumulent dans les tissus libérant les toxiques dont ils sont porteurs causant de ce fait un stress général et une toxicité hépatique (Rochman et al., 2013). Des essais effectués sur les vers ayant ingérés des microplastiques ont montré une accumulation suffisante de polluants et d'additifs capable de compromettre leur survie, la prise alimentaire et même leurs défenses immunitaires.



Figure 4: Tortue piégée par un filet de pêche : pêche fantôme (Kedzierski et al., 2017).

Du point de vue sanitaire, l'impact des microplastiques n'est plus à débattre. Leur présence a été démontré dans notre alimentation à travers les produits tels que les moules, les huîtres, les crustacés, les crevettes, les crabes, les langoustines, les palourdes (Green, 2016). Leur présence a également été détecté dans le système digestif de certaines espèces de poissons et de manière particulière au niveau des muscles, dans le sel de table en provenance de la mer (Peixoto et al., 2019), le sucre, de l'eau, de la bière, du miel et même des selles humaines. Une autre voie d'exposition de l'homme a ces microplastiques est l'inhalation qui s'avère être la plus importante et est fonction de l'environnement. Concernant la santé des consommateurs, très peu de connaissances existent sur la question. Mais on sait que les microplastiques sont capables de créer des complexes une fois associés à certains monomères tels le PVC, les retardateurs de flamme bromés, le bisphénol A, les phtalates qui à eux seuls représentent un danger et dont les impacts à long terme sur la santé humaine font actuellement l'objet de nombreuses investigations.

1.2. Microplastiques : Potentiel vecteur

Généralement, il est approuvé que les MPs peuvent servir de vecteur pour le transport des produits chimiques (absorbés dans l'environnement ou contenus dans les particules de plastique) comme les polluants organiques persistants (POP) et même les additifs (Koelmans, 2015). Compte tenu du fait que les plastiques ont une demi-vie beaucoup plus longue que certains substrats naturels flottants ainsi qu'une surface hydrophobe, ils favorisent la colonisation bactérienne, la formation des biofilms et offrent un habitat aux microorganismes et invertébrés pélagiques (Reisser et al., 2014). Le biofilm formé à la surface du plastique contribue au processus de dégradation du plastique de plusieurs façons (Artham et al., 2009) : soit de manière indirecte en augmentant la longévité du plastique tout en le protégeant contre les rayonnements UV et les rayons lumineux (Carson et al., 2013), ou encore de manière directe en réduisant le degré de flottabilité favorisant ainsi son enfoncement (Andrady, 2011)

et l'accélération du processus de dégradation via la colonisation par les organismes. Bien que toutes les surfaces des microplastiques dans l'environnement marin soient rapidement colonisées par des bactéries, la composition taxonomique réelle des biofilms sur les microplastiques marins reste largement inexplorée et aucune donnée réellement connue sur les communautés bactériennes colonisant les particules microplastiques n'existe (Deshoules, 2020). Jusqu'ici, la souche bactérienne ayant été étudiée et dont les données sont disponibles est *Aeromonas hydrophila* naturellement présent dans le microbiote intestinal du poisson zèbre et est capable d'occasionner une toxicité aiguë chez les adultes et même de générer chez ces derniers une septicémie provoquant une mortalité élevée des sujets (Dong et al., 2022). Quelques études sur la colonisation bactérienne des MPs ont été publiées au cours de ces dernières décennies. D'après (Viršek et al., 2017), *Aeromonas salmonicida* est parmi tant d'autres l'une des bactéries les plus invasives et dangereuses des espèces exotiques envahissantes recensés en Europe. C'est une souche pathogène et virulente pour les Salmonidés plus spécifiquement mais également pour les Cyprinidés et les poissons plats marins (Austin & Austin, 2016). De ce que l'on sait, c'est un agent pathogène responsable de la furunculose, principale cause de mortalité chez les poissons d'élevage surtout chez le saumon et fait encore l'objet de recherche pour ce qui est du poisson zèbre.

1.3. MODELE BIOLOGIQUE : POISSON ZEBRE

1.3.1. Choix du modèle biologique

Lors des analyses toxicologiques, le choix d'un modèle biologique approprié est très souvent basé sur plusieurs paramètres de sélection tels que : sa sensibilité aux toxiques étudiés, son intérêt économique, sa pertinence écologique et enfin la faisabilité des expérimentations. S'il ne faille tenir compte uniquement de ces éléments, les tests effectués au stade embryonnaire et larvaire des poissons seraient difficiles, voire impossible. Afin de rendre faisable les expérimentations, il est souvent plus approprié d'utiliser les espèces endémiques représentatives du milieu aquatique de la région où se fera l'essai limitant ainsi les excédents liés aux coûts d'approvisionnement, d'installation d'élevage ainsi que la représentativité écologique de l'espèce étudiée.

Cependant, la faisabilité des expérimentations avec des espèces endémiques dans les régions tempérées est particulièrement difficile au stade embryo-larvaire ceci dû à leurs cycles saisonniers de reproduction et de développement. N'étant pas représentatif des milieux aquatiques des régions tempérées, le poisson zèbre ne peut être considéré comme prototype pour des expérimentations. Mais au vu de ses nombreux atouts, il apparaît comme un bon

modèle biologique pour l'évaluation de la toxicité intrinsèque de xénobiotiques (Hill et al., 2005) et recommandé par les lignes directrices de l'OCDE (OECD, 2004).

Ses principales caractéristiques sont les suivantes :

-Sa robustesse (une fertilité relativement grande avec plusieurs centaines d'œufs par ponte) ;
-Sa facilité d'élevage (leur petite taille facilite la maintenance des géniteurs dans un aquarium limitant ainsi les coûts liés à l'installation) ;

- Sa sensibilité toxicologique (perméabilité du chorion aux substances toxiques) ;
- Sa rapidité d'embryogénèse ;
- La possibilité de reproduction en toute saison en conditions optimales ;
- Le développement externe des œufs, leur transparence corporelle et l'absence d'agglutination permettant de visualiser les embryons, les différents stades de développement et les éventuelles perturbations possibles.

1.3.2. Description du poisson zèbre

Le poisson zèbre de son nom scientifique *Danio rerio* est un cypriniforme tropical appartenant à la famille des Cyprinidés. La position taxonomique de cette espèce est présentée dans le tableau 1 (Arunachalam et al., 2013) :

Tableau 1: Classification taxonomique du poisson zèbre

Phylum	Poissons ou chordés
Super-classe	Osseux ou Ostéichthyens
Classe	Actinoptérygiens
Super-ordre	Téléostéens
Ordre	Cypriniformes
Famille	Cyprinidés
Genre	Danio
Espèce	rerio

Sa répartition géographique s'étend du nord-est de l'Inde, du Népal, et du Bangladesh au niveau des bassins du Gange et du Brahmapoutre. Il a été importé au début des années 1900 et fait maintenant partie intégrante des espèces qu'on retrouve le plus souvent en aquariophilie et en élevage pour la recherche (Spence & Smith, 2006). Il vit dans les eaux des rizières (d'où son nom *Danio*, qui vient du bengali *Dahni* signifiant « de champs de riz »), les eaux stagnantes et les petits cours d'eau à faible débit dont la température peut varier de 6 à 38 °C en fonction de la saison (Spence et al., 2008). C'est un poisson osseux, homocercue qui ne possède pas de

nageoire adipeuse. La bouche est légèrement protractile et porte une paire de barbillons. Les mâchoires ne possèdent pas de dents mais plusieurs rangées de dents pharyngiennes servant à broyer la nourriture. Ce poisson fusiforme de petite taille (4,5 à 5 cm de long à l'âge adulte) a un corps cylindrique montrant sept à neuf stries longitudinales bleu-cobalt sur fond argenté qui se prolongent sur les nageoires caudales et anales ; ses flans sont jaune-ocres. A l'âge adulte, il est facile de distinguer le mâle de la femelle car cette espèce présente un dimorphisme sexuel (Figure 5). La femelle possède un abdomen plus bombé que le mâle, une ligne dorsale convexe et une papille génitale distincte. Le mâle a un corps plus élancé, une nageoire anale plus longue, une ligne dorsale rectiligne et présente une coloration plus vive que la femelle. Il a un comportement grégaire et se reproduit dans des zones peu profondes présentant des herbiers où il dépose ses œufs non adhérents.



Figure 5: Mâle et femelle adulte de poisson zèbre (Bourrachot, 2009).

1.3.3. Cycle de vie et de reproduction du poisson zèbre

Le cycle de vie de cette espèce est court (Figure 6) car seulement 75 à 90 jours sont nécessaires à sa maturation sexuelle en condition de laboratoire. Les mécanismes génétiques à l'origine de la différenciation sexuelle chez cette espèce restent encore énigmatiques surtout en ce qui concerne la différenciation des gonades en ovaires. Quant aux mâles, la différenciation en testicules débute entre 5 et 7 semaines (Spence et al., 2008).

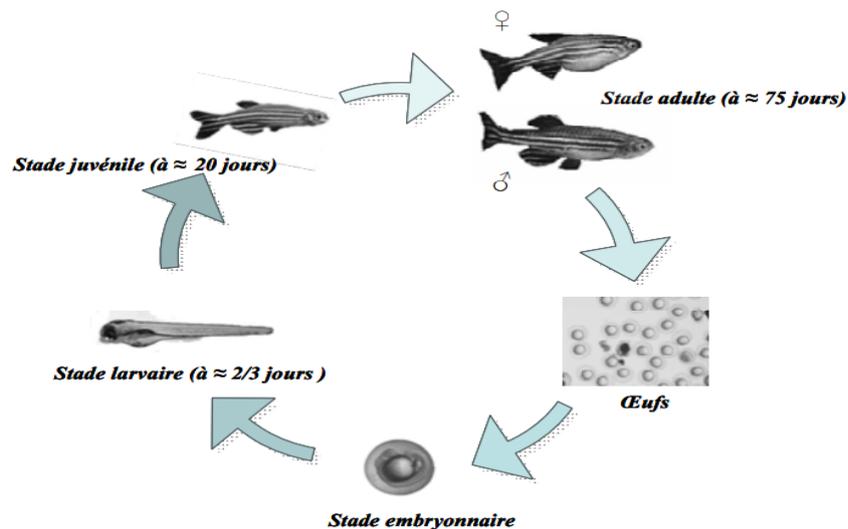


Figure 6: Cycle de vie du poisson zèbre (Bourrachot, 2009).

Les femelles une fois la maturité sexuelle atteinte, elles peuvent pondre environ 1 à 700 œufs en une ponte par femelle pendant un intervalle de ponte (augmentant avec l'âge) variant entre 1 à 6 jours, mais le nombre quotidien d'œufs est de 103 ± 140 d'après les travaux de Spence et Smith (2006) lors d'un test de reproduction de douze jours en laboratoire. Dans les conditions naturelles, ce poisson a une reproduction saisonnière qui dépend fortement des pluies ainsi que des apports en ressources alimentaires dans le milieu. En condition artificielle cependant, sa reproduction peut être déclenchée par des facteurs tels que la lumière, un pic de température, et même un choc osmotique ou pH. Pour déclencher l'ovulation chez cette espèce, on expose femelles aux phéromones mâles et de la même façon des mâles aux phéromones femelles ce qui entraîne le comportement de fraie (Hurk & Lambert, 2011).

Une fois la fertilisation des œufs faite, le développement embryonnaire peut commencer et est très rapide. Les tests basés sur le développement embryonnaire (OECD, 2004), se réfèrent aux descriptions de développement très précises et largement validé aujourd'hui (Hill et al., 2005). La durée de ces tests est différente selon les normes (48h à 32 jours) et est de plus en plus réduite au stade embryon (48h) dans les normes les plus récentes. Pendant cette période, les embryons sont considérés comme des modèles *in vitro* et de ce fait ne sont pas pris en compte dans la législation définie par les directives de l'UE sur la protection d'animaux utilisés en recherche scientifique. Le développement embryonnaire est décrit succinctement dans la figure 7 et se déroule en plusieurs étapes :

- La période de clivage cellulaire : la première division cellulaire a lieu trois quarts d'heures après la fertilisation et par des divisions rapides et synchrones, l'œuf passe de 2 à 64 cellules ;
- La période de blastula : elle débute 2,5hpf (Heure Post Fertilisation), et l'embryon passe alors à 128 cellules. La moitié de la hauteur du sac vitellin est occupée par les cellules de blastoderme qui changera de forme par la suite ;
- La phase gastrula : elle a lieu 5,5hpf et est marquée par la présence des mouvements morphogénétiques d'extension ainsi que le développement de l'orientation de l'axe dorso-ventral permettant de distinguer les cellules du pôle animal qui se différencient en structure de la tête (tube neural, cerveau) et en rudiments de la queue ;
- La période de la segmentation : elle débute à partir de 10hpf. Elle est marquée par le développement des somites, les arcs pharyngés primordiaux et les neuromères se développent. On observe également au fur et à mesure un accroissement de la queue ;
- La période de la pharyngula : elle débute à partir de 24hpf pendant laquelle on observe une pigmentation de la rétine et de la peau. Le cœur se met à battre après la mise en place de la circulation sanguine matérialisé par des mouvements de cellules sanguines. On observe également un développement des nageoires pectorales.

L'éclosion quant à elle commence à 48hpf et se termine 72hpf. Elle est marquée par le développement morphologique des organes primaires (Bourrachot, 2009). La nageoire pectorale s'allonge postérieurement et commence à recouvrir le sac vitellin. La pigmentation est très importante, les bandes dorsales et ventrales se rencontrent au niveau de la queue. Les mouvements spontanés disparaissent. La bouche est grande ouverte mais pas béante. Elle se situe en dessous de la limite antérieure des yeux. Le cœur bat très fort et est plein de sang circulant. Trois jours après l'éclosion, la larve a pratiquement achevé sa morphogénèse et elle continue à grandir grâce à sa réserve vitelline. Il y a un accroissement de la vessie natatoire et la bouche sort de plus en plus vers l'avant dans l'axe antéro-dorsal. Certaines bandes de pigments s'assombrissent pendant que d'autres s'éclaircissent. La larve commence à nager activement et bouge ses mâchoires, ses nageoires pectorales et ses yeux. Ces développements permettent des réponses rapides à des stimuli par la fuite, et annoncent la respiration, la recherche de proies et l'alimentation (5 jours).

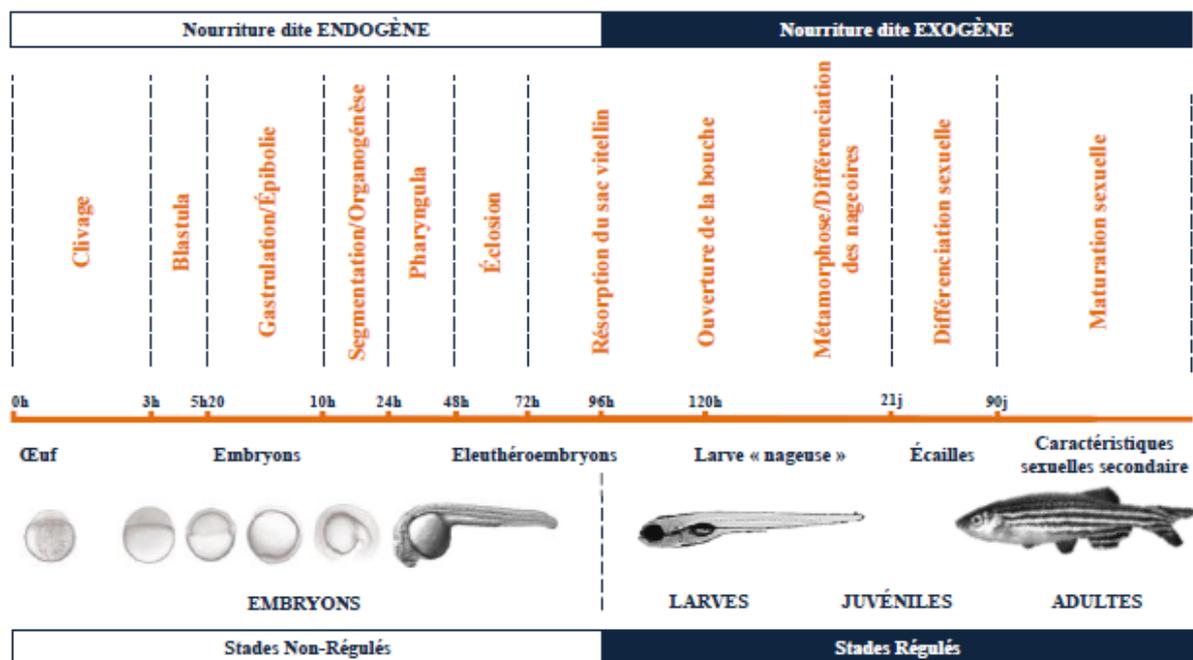


Figure 7: Récapitulatif des stades de développement du poisson zèbre en relation avec les stades régulés ou non par l'UE (Embry et al., 2010).

1.4. Système immunitaire

Le système immunitaire chez les poissons tout comme chez l'humain est constitué d'un ensemble de cellules et de composants humoraux dont le rôle est de protéger l'organisme contre des corps étrangers, des menaces de parasites, bactéries et virus (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014). L'environnement ainsi que leur aptitude ectodermique sont des facteurs déterminant de ce système (Makrinos & Bowden, 2016). Ce dernier est subdivisé en deux grandes parties à savoir : le système immunitaire inné et le système immunitaire acquis ou adaptatif (Biller-Takahashi & Urbinati, 2014).

1.4.1. Système immunitaire naturel ou inné

La plupart des organismes pluricellulaires sont capables à plus de 98% de se défendre en faisant recours à leur système immunitaire inné (Tort et al., 2003). Lorsqu'un agent étranger traverse la barrière de l'organisme, immédiatement se produit une réponse non spécifique en provenance du système immunitaire inné (Rauta et al., 2012). Cette réponse résulte de l'association d'un ensemble d'acteurs et de médiateurs solubles. Les principaux acteurs intervenant dans une telle réponse sont les polynucléaires (basophiles, éosinophiles, polynucléaires), les phagocytes mononucléés (cellules dendritiques, macrophages et monocytes), les mastocytes et les cellules lymphoïdes (Yang et al., 2011). Quant aux médiateurs solubles de l'immunité inné, ils comprennent le système de complément, les

cytokines pro-inflammatoires que sont les interférons (Charles et al., 2010), les cytokines chimio-attractantes et les cytokines régulatrices de l'inflammation (Bacchetta et al., 2005). En plus de ceux-ci, ce système comprend des enzymes et peptides antimicrobiens ainsi que des médiateurs solubles lipidiques de l'inflammation.

Les cellules impliquées dans la première ligne de défense du système immunitaire innée (Figure 8) sont les phagocytes associés aux cellules de Natural Killer (NK) (Carnicer-Lombarte et al., 2021). Une fois active, ces cellules vont identifier les pathogènes grâce à de récepteurs cellulaires appelés Pattern Recognition Receptor (PRR). Ces récepteurs également à leur tour sont capables de reconnaître certains motifs moléculaires appelés Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP), partagés par de nombreux microorganismes (Janeway, 2013). En fonction des récepteurs activés, les cellules dendritiques modulent différemment l'activité des lymphocytes T tandis que les cellules NK produisent des immuno-régulateurs (cytokines et chimokines) permettant la destruction des cellules cibles infectées ou anormales (cellules tumorales) (Bouachour, 2012).

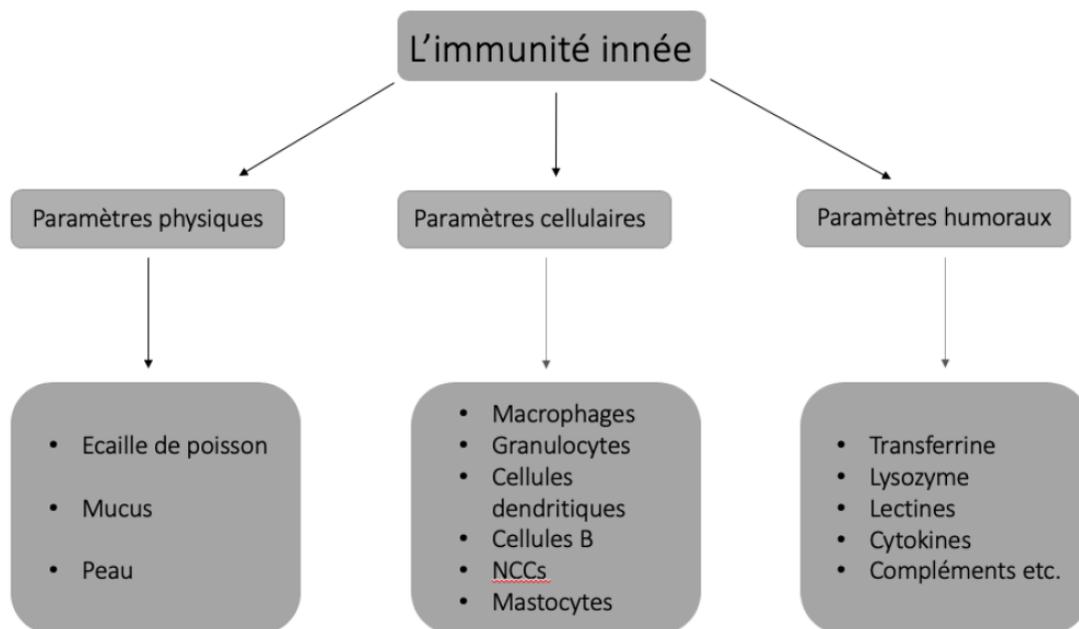


Figure 8: Constituants de l'immunité innée chez le poisson (Eryalçın, 2018).

Chez le poisson zèbre, c'est le système immunitaire inné qui assure l'immunité dans les premiers stades de développement de la larve (Magnadóttir, 2006) ; Les premiers paramètres intervenant dans la limitation de la contamination de l'hôte par des pathogènes sont les facteurs physiques (les écailles, la muqueuse présente sur la peau et les branchies, les parois internes recouvertes de mucus). Les cellules de l'immunité innée sont stimulées après activation des récepteurs du non soi. Elles sont constituées de cellules phagocytaires (neutrophiles,

monocyte/macrophage), des cellules cytotoxiques non spécifiques (mastocytes, éosinophiles), des cellules épithéliales et des cellules dendritiques (Magnadóttir, 2006). La réaction inflammatoire est enclenchée par la sécrétion de cytokines et de médiateurs. On assiste par la suite à une amplification et à un confinement de la réponse suivi d'un recrutement des cellules et effecteurs (Lieschke & Trede, 2009). Les paramètres humoraux intervenant dans la réponse innée du système immunitaire sont entre autres : les transferrines, les interférons ou les inhibiteurs de protéases. En plus de cela, on a des anticorps naturels contenus dans le sérum et produits sans stimulation d'un antigène. Enfin, on a les cytokines et les chimiokines qui sont des molécules de signalisation et responsables du contrôle ainsi que la coordination de la réponse immunitaire innée et acquise (Magnadóttir, 2006). La reconnaissance des pathogènes va activer chez le complément une cascade de protéines convergentes formant un complexe capable d'induire la mort des pathogènes par lyse cellulaire. Chez le poisson zèbre, ce complexe est activé via les voies d'activation classiques, alternatives et de liaison au mannose-lectine (Lieschke & Trede, 2009).

1.4.2. Le système immunitaire acquis

Par opposition à l'immunité innée, l'immunité acquise encore appelée adaptative produit une réponse spécifique de l'antigène. Cette spécificité s'explique par le fait que, les lymphocytes T fonctionnels, cellules de l'immunité acquise ont la capacité de se fixer à un seul type de récepteur (TCR qui signifie « T cell receptor ») dans le thymus (organe) et de reconnaître spécifiquement qu'un seul déterminant antigénique. Cette réponse est principalement caractérisée par une mémoire immunologique qui apparaît très rapidement et secondairement après une exposition double au même agent pathogène., facteur essentielle pour une immunité durable de l'organisme (Secombes & Wang, 2012). L'immunité acquise se produit après une alerte des acteurs de l'immunité innée qui transmettent l'information aux lymphocytes T, grâce aux cellules dendritiques qui fournissent l'antigène nécessaire pour la réponse immunitaire (Alli et al., 2004). A ceci s'ajoute une réponse immunitaire humorale produisant des anticorps et lymphocytes T avec la participation des lymphocytes B. Donc pour chaque type de lymphocyte correspond une immunité spécifique qui peut être soit à médiation humorale, soit à médiation cellulaire.

En résumé, l'immunité spécifique à médiation humorale fait intervenir les lymphocytes B ainsi que les plasmocytes dont le rôle est de produire des anticorps ou immunoglobulines (il en existe plusieurs classes : IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). L'immunité à médiation cellulaire quant à elle fait intervenir les cellules lymphocytes T. les cellules impliquées dans ces deux types d'immunité

spécifique interagissent ensemble et ceci au fur et à mesure jusqu'à ce que la phase non-spécifique puisse être remplacée par la phase d'entretien. Cette phase d'entretien correspond à la phase d'élimination de l'agent étranger tout en préservant l'hôte (Rebl & Goldammer, 2018). Chez le poisson zèbre, l'immunité acquise devient fonctionnelle très tardivement, après 4 semaines et peut manquer d'efficacité (Malbouyres, 2018).

1.4.3. Effets des microplastiques

De nombreuses expériences ont pu montrer des altérations causées par l'accumulation dans le tractus digestif des particules de microplastiques. En plus des altérations du tractus, ces microplastiques sont capables d'induire des dommages physiques, conduisant à l'apparition de lésions sur les tissus de l'intestin et au niveau de l'épithélium des branchies des poissons (Qiao et al., 2019). La présence de fissures sur les villosités de la muqueuse intestinale et l'induction de la division des entérocytes ont aussi été montrés par ces mêmes auteurs. Qiao et al., 2019 dans une étude a réussi à mettre en évidence l'influence des différentes formes de microplastiques utilisées par les équipes de recherche ainsi que la présence des altérations qu'elles peuvent engendrer. Ce dernier a exposé des poissons zèbres de 21 jours à des billes, des fragments et des fibres de particules de polystyrène vierges (Figure 9), et les résultats ont montré des changements histologiques chez le poisson. Des dommages beaucoup plus considérables ont été observés avec les fibres et matérialisés par la présence de vacuolisations (80%), de cils défectueux (64%) et une nécrose des tissus, ceci pouvant s'expliquer par la surface des microplastiques non sphériques rugueuse (Qiao et al., 2019). Des analyses histologiques ont montré une diminution du nombre de cellules pouvant s'expliquer par l'importante sécrétion de mucus (Limonta et al., 2019). Jin et al., 2018 ont pu mettre en évidence l'augmentation de la sécrétion du mucus dans l'intestin du zébrafish ce qui pourrait s'expliquer comme une réponse de défense du poisson contre les microplastiques. Néanmoins, ce changement pourrait bouleverser les attributions normales de barrière de la couche de mucus contre les pathogènes (Jin et al., 2018). D'autres auteurs ont pu montrer que l'augmentation de mucus aurait pour conséquence une augmentation de l'apparition des pathogènes dans le microbiote (Limonta et al., 2019). Toutefois, des études effectuées sur les microplastiques en forme de fibres et fragments ont montré plutôt une diminution de la sécrétion de mucus (Qiao et al., 2019). Cette diminution peut s'expliquer par l'induction de DEG (*differential expressed genes*), une régulation négative de gènes responsables de la division des cellules souches intestinales (*fbxo5* et *pttg1*) ainsi qu'une méthylation de la lysine et des histines (*smyd1b* et

dnmt3bb.2) impliqués dans la régénération et la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin (Qiao et al., 2019) .

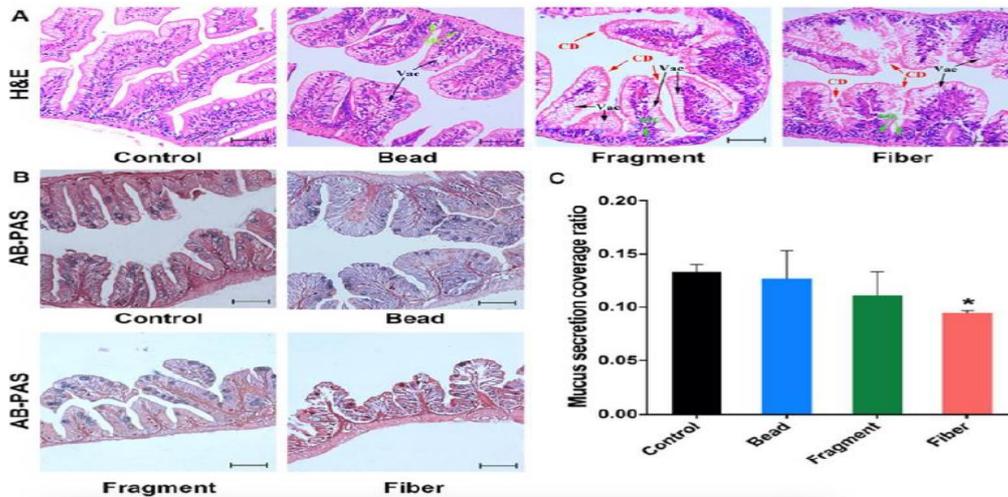


Figure 9: (A) (B) Coupe transversale de l'intestin du poisson zèbre après exposition à de microplastiques de polystyrène de 15 μm pendant 21 jours à des concentrations de 10 $\mu\text{g/L}$, (C) Graphique du taux de sécrétion du mucus (Qiao et al., 2019).

Qiao, Deng, et al., (2019) ont aussi montré que la forme des microplastiques joue un rôle prépondérant en ce qui concerne leur toxicité. L'expérimentation a été faite sur plusieurs formes de microplastiques (fibres, fragments, granules), et après exposition, ils ont pu déterminer que les fibres de microplastiques étaient capables d'induire des effets beaucoup plus conséquents comparés aux autres formes de microplastiques. Ils ont observé une concentration de l'ordre de 8 $\mu\text{g/mg}$ accumulée dans le tube digestif par comparaison aux autres dont la concentration n'était estimée qu'à 1,7 $\mu\text{g/mg}$ et 0,5 $\mu\text{g/mg}$ respectivement pour les fragments et granules.

Chez les poissons, les pathogènes bactériens peuvent également avoir la capacité de pénétrer dans l'hôte par une ou plusieurs des trois voies différentes : la peau, les branchies et le tractus gastro-intestinal. Des études ont montré les dommages faites aux cellules intestinales chez le saumon atlantique (*Salmo salar* L.) causés par l'agent pathogène du poisson *Aeromonas salmonicida* ssp, l'agent causal de la furunculose. Une expérience in vitro a démontré un détachement considérable des entérocytes de la région antérieure de l'intestin lors de l'exposition à l'agent pathogène. Dans l'intestin postérieur, peu de décollement ont été observés mais plutôt des dommages cellulaires au niveau des microvillosités, les desmosomes et les jonctions serrées (Ringø et al., 2004).

1.5. Objectif de l'étude

L'objectif général de ce travail est de comprendre les effets de la présence des particules de microplastiques en association avec les bactéries lors des premiers stades de développement du poisson zèbre. Dans un premier temps, pour mieux appréhender les dangers causés par les microplastiques, il est très important de comprendre et connaître la nature de ces derniers d'où la première étape qui consiste en l'extraction de ces microplastiques. Il s'en suivra dans un second temps à effectuer une caractérisation de ces microplastiques en procédant à une analyse par spectroscopie FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) et SEM (Microscopie électronique à balayage) afin de déterminer leur composition chimique, les différents polluants constitutifs, la présence ou non d'agglomérats ainsi que leurs concentrations, l'identification des polymères constitutifs. Dans un troisième temps, nous évaluerons l'influence des microplastiques seuls ou en association avec une bactérie pathogène dont le but est de déterminer si la pollution par les microplastiques est à l'origine de la propagation ou sert de vecteur pour le transfert des microorganismes et donc de stimuler la réponse immunitaire chez le poisson zèbre. La bactérie choisie pour notre étude est *Aeromonas salmonicida achromogenes*, ayant fait ses preuves dans une étude antérieure par (Cornet et al., 2020). Ces derniers dans leur étude ont évalué l'impact d'une infection à différents moments du stade larvaire sur l'expression des gènes immunitaires lors d'une exposition au stade adulte.

2. Matériel et méthodes

2.1. Caractérisation des microplastiques

Le type de plastique utilisé dans le cadre de cette étude était du polyéthylène téréphtalate (PET) d'une bouteille plastique de coca cola vierge obtenu dans le commerce, préparé par Mathilde Piette lors d'une précédente expérience. Le processus de dégradation du plastique a consisté à tailler soigneusement à l'aide d'un ciseau une bouteille de coca cola dans le but d'obtenir des particules moyennes. Afin d'acquérir une taille suffisamment petite, ces particules ont été soumises à une opération de fragmentation au mixeur, suivie d'une sonication de 15h. les fragments ont ensuite été filtrés à l'aide de différents tamis afin d'obtenir une taille entre 5-15 μm . Dans la plupart des cas, pour qualifier les particules obtenues, on procède par un tri visuel ou avec un microscope mais cette technique n'est pas très exacte car il est facile de confondre surtout en cas de contamination du plastique avec d'autres particules et inversement. La technique probablement la plus fiable et d'ailleurs celle qui a été utilisée était la spectroscopie FTIR qui a permis d'identifier le type de polymères de MPs avec une caractérisation de la morphologie de surface de MPs par la SEM.

Les analyses sont faites à l'aide d'un ATR-FTIR (Réflexion totale atténuée-Infrarouge à transformée de Fourier) qui reflète sur l'échantillon un faisceau IR à multiples fréquences ou balayages et mesure l'absorption de l'échantillon. Le processus est renouvelé et les données numériques obtenues sont collectées sur ordinateur qui calcule l'absorption à différentes longueurs d'ondes. Les données sont par la suite transférées dans le logiciel KnowItAll BioRad 2018 qui compare le spectre de l'échantillon obtenu à celui préexistant dans la base des données.

2.2. Elevage des poissons zèbres

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisés les géniteurs de la lignée AB (circ) *Danio rerio* des laboratoires de l'Université de Gent en Belgique. Ces géniteurs ont été maintenus dans un système ZebTec (Techniplast) en recirculation à 28 °C avec une photopériode de 12 :12 h (lumière/obscurité). La conductivité a été maintenue à environ 500 µS/cm, le pH à 7,2 et l'oxygène dissous à 95 % de saturation. Les poissons étaient nourris trois fois par jour.

Concernant la reproduction, 6 adultes (ratio mâle femelle 1 :1) ont été maintenus dans la nuit et le frai a été induit le lendemain matin lorsque la lumière a été allumée après une période d'obscurité de 12heures (Figure 10). A 2hpf, les embryons ont été collectés et rincés avec l'eau filtrée du système, prêts pour l'exposition.



Figure 10: Cage de reproduction (Techniplast.it)

2.3. Conditions expérimentales

2.3.1. Décontamination des MPs

Naturellement, il est possible d'observer des dépôts de matière organique ou des débris sur des échantillons de plastiques. Afin de limiter au maximum ces débris lors de l'identification, on a procédé par une décontamination. Pour la décontamination, un test préalable a été effectué sur quatre composés afin de déceler celui qui était propice pour l'élimination des contaminants (substances n'ayant pas été ajouté de façon intentionnelle tels

les hydrocarbures, les métaux, les additifs, les pesticides, les bactéries etc...dont ils sont porteurs) sans altération ni modification de la composition chimique du microplastique. Le choix du composé a utilisé pour cette décontamination s'est fait sur la base des travaux préexistants tels que ceux de (Karami et al., 2017) qui ont utilisé des agents chimiques alcalins tels l'hydroxyde de potassium, ou encore ceux de (Collard et al., 2017) qui ont utilisé les oxydants tels l'hypochlorite de sodium le peroxyde d'hydrogène , et l'hydroxyde de soude (NaOH) comme décontaminant. Sur la base de leur efficacité ainsi que leurs coûts, les choix ont été portés sur le KOH 10%, le KOH 20%, le KOH alcoolique et le H₂O₂ 30%. Pour le traitement, 10mL de chaque solution testée a été ajoutée dans une boîte de Petri avec des fragments de plastique et incubés sans agitation. Avant et après l'application des traitements de digestion, les fragments ont été rincés avec de l'eau filtrée quatre fois, puis centrifuger à 300rpm et sublimer à 30°C pendant 24h. Au lendemain de ces 24h, les échantillons ont été utilisés pour une observation au microscope électronique à balayage (SEM) (Figure 11).

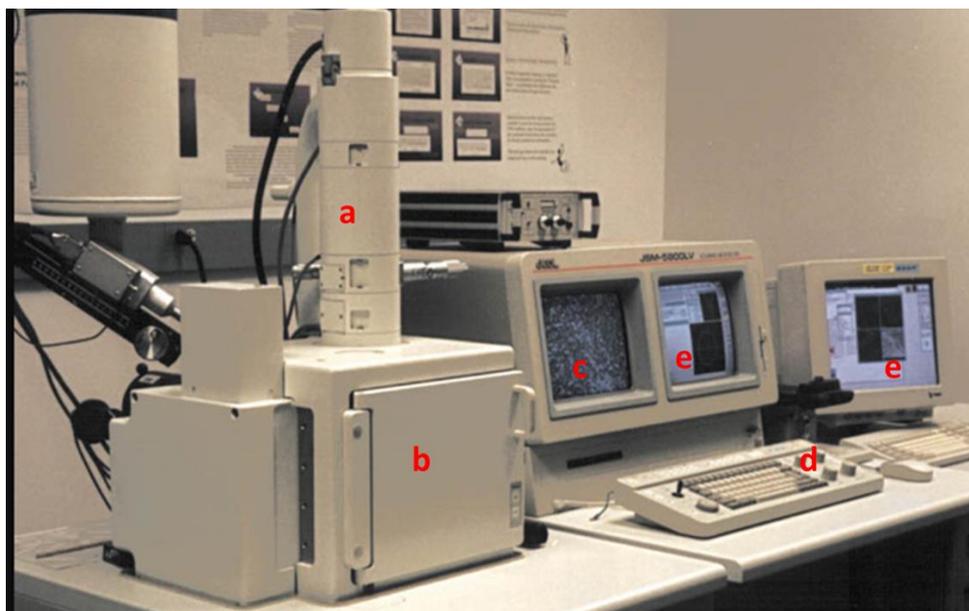


Figure 11: Moniteur SEM avec a) une colonne d'électrons ; b) une chambre d'échantillon ; c) un détecteur EDS ; d) une console électronique ; e) Des écrans d'affichage (labetesting.com).

2.3.2. Exposition des embryons

Préparation de la solution stock de microplastiques : Une solution stock de fragments de MPs d'une taille de 5-15 μm a été constituée à une concentration de 1000 $\mu\text{g/L}$. Dans une bouteille en verre de laboratoire contenant 500 mL d'eau de circuit filtrée (maille de 0,22 μm), on a ajoutée 500 μL de la solution de MPs (1 mg/ml). Une étape de sonication a été effectuée avant l'exposition (5min).

Test de toxicité : Préalablement à l'exposition, les œufs de poisson zèbre issus de parents non contaminés ont été désinfectés dans une solution de bleu de méthylène à raison de 500 µL de solution dissoute dans 100 mL d'eau filtrée, incubé pendant 1 heure puis rincé trois fois à l'eau filtrée. Quatre groupes différents ont été constitués pour cette expérimentation :

- Un groupe contrôle (Ctrl) sans aucune exposition ;
- Un groupe microplastiques (MPs) ;
- Un groupe Bactéries seules (Bact) ;
- Un groupe combiné microplastiques bactéries (MPs+Bact).

Pour les deux conditions expérimentales Bact et MPs+Bact, les embryons ont été exposés à la bactérie pathogène *Aeromonas salmonicida achromogenes* fournie par CER Groupe (Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgique). Les bactéries ont été cultivées dans un milieu liquide stérile de brain heart infusion (BHI) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et incubées à 26 °C pendant 18 h. A partir de la solution de bactérie cultivée, un volume de 50 µL a été introduit dans 50 mL d'eau filtrée constituant ainsi la solution mère de bactéries à 10⁶ CFU/L. Pour l'exposition, 10 mL de suspension bactérienne ont été apportés aux embryons contenus dans les boîtes de Pétri puis incubés à 27°C pendant 24h. La moitié du volume du milieu est renouvelé chaque jour.

Pour la préparation de la solution stock de microplastiques avec les bactéries, 50 µL de suspension bactérienne ont été ajoutée à un volume de 50 mL de solution de microplastiques. Cela étant, 10 mL de la solution obtenue ont été introduits dans une boîte de Pétri contenant 30 embryons et incubé à 27°C pendant 24h. L'exposition a toutes ces conditions s'est faite à 6 hpf et a duré jusqu'à 96 hpf.

2.3.3. Quantification des bactéries par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux (CMF) est une technique consistant en la caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

Protocole : Avant l'exposition des embryons aux différents traitements, dans le but de connaître la quantité de bactéries, ces dernières ont été prélevées suivant des dilutions sériées de 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ et 10⁻¹⁰ dans des tubes spécifiques pour la cytométrie de flux (CMF, BD FACS Verse au laboratoire de Bioscience). Pendant toute la durée de l'exposition, des prélèvements de milieu ont été analysés dans le but de quantifier et vérifier la présence des bactéries dans les milieux d'exposition.

2.3.4. Suivi de l'activité, la mortalité, la cardiologie, morphologie et comportement des larves

Les mortalités ont commencé à être relevées après 24 hpf jusqu'à 96 hpf et le taux d'éclosion quant à lui à partir de 48h (Figure 12). La fréquence cardiaque a été évaluée à partir de 2 jpf sur un ensemble de cinq embryons par réplicat ainsi que la morphologie des larves à 4 jpf. Des vidéos ont été acquises via le microscope Olympus et le logiciel Toupview. Ces paramètres ont été évalués par la suite à l'aide d'un Danioscope (Noldus) qui, en ce qui concerne la cardiologie, détecte les battements de cœur sur des vidéos de 20 sec de façon automatique sur une image, pareil pour l'activité des embryons mais pour une durée de 60 sec, le tout contrôlé par un ordinateur. Sur la base de la distribution des données, les valeurs inférieures à 120 et supérieures à 220 ont été considérées comme des valeurs aberrantes et ont été exclues de l'ensemble des données de cardiologie.

Dans le but d'évaluer l'activité locomotrice ainsi que le stress induit par la transition obscurité/lumière chez les larves de 96 hpf, un test comportemental a été effectué à l'aide de 6 organismes par traitement et par conditions réparties dans quatre plaques de 48 puits. Les organismes ont été placés individuellement dans chaque puits avec 1mL de milieu suivant un plan mixte des différentes conditions ; les groupes témoins et les groupes exposés étaient dans la même plaque. La plaque a été préparée la veille de l'expérience. Une fois placées dans la chambre d'observation de DanioVision (Noldus), une période d'acclimatation de 15 minutes a été respectée avant le début de l'enregistrement. Le test comportemental consistait en l'acclimatation des larves pendant 10 min suivie de trois phases d'alternance lumière/obscurité. A l'issue de ce test, les larves étaient laissées au repos 10 min à l'obscurité avant d'être stimulé par un tapping (claquement dans la chambre ressenti par les larves) toutes les secondes pendant 5 min. La réponse au stimulus tactile a été évaluée en comparant les réponses au stimulus pour tous les traitements. Par la suite, le résultat de la réponse a été utilisé pour comparer la réponse entre les larves témoins et les larves exposées.

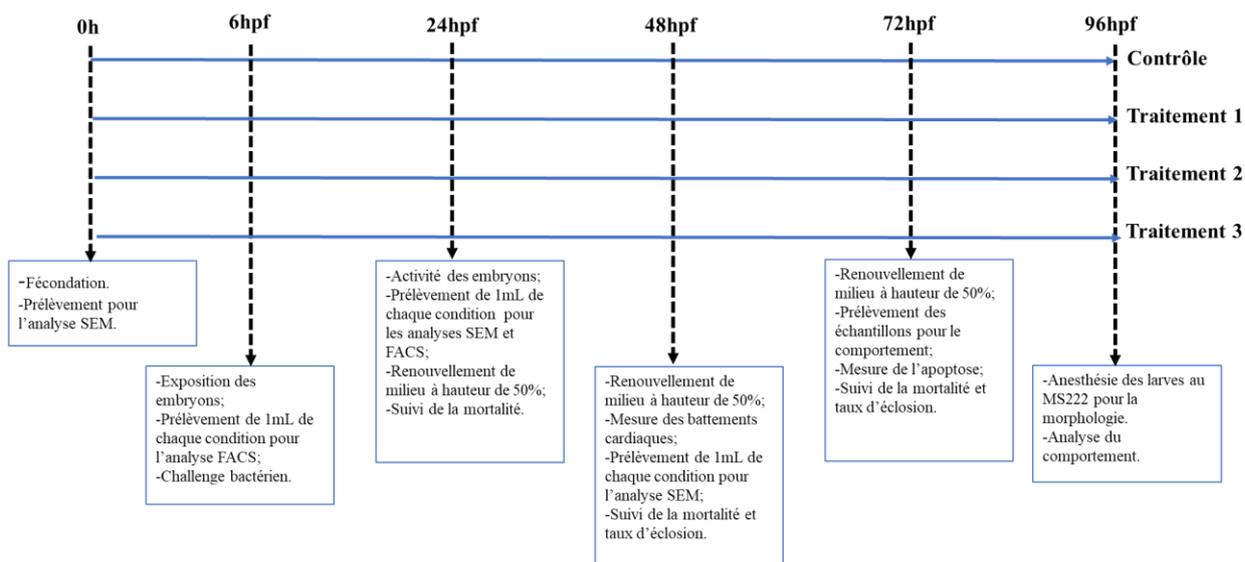


Figure 12: Protocole expérimental d'exposition des larves de poisson zèbre aux fragments de polyéthylène téréphthalate (PET) de 5-15 µm pendant 4 jours selon les quatre conditions d'exposition. Un challenge bactérien a été réalisé à 6 hpf.

2.3.5. Suivi et évolution de la mise en place du biofilm

Les plastiques comme énoncé dans le paragraphe 1.1.3 sur leur processus de dégradation ont une durée de vie beaucoup plus longue que la majorité des substrats marins naturels, avec une surface hydrophobe favorisant la formation des biofilms et servant de ce fait d'habitat pour les microorganismes pélagiques et même les invertébrés (Reisser et al., 2014).

Protocole : Concernant le suivi de la contamination des MPs par les bactéries, le protocole consistait à prélever 1mL de la solution d'exposition en quatre points :

T0 : Pour 0h d'exposition

T1 : 24 h d'exposition

T2 : 48 h d'exposition

T3 : 72 h d'exposition

La préparation des échantillons pour l'analyse SEM a consisté à placer une fine couche de colle Pritt sur des supports en plomb puis transférés dans de l'azote liquide pendant 10 minutes. Ce temps écoulé, 20 µL de chaque échantillon ont été prélevés et placés sur les supports puis couverts d'or pendant 2-3h avant l'analyse SEM qui consistait à visualiser la morphologie et de confirmer la présence/absence des colonies de bactéries sur les microparticules de plastiques.

2.3.6. Evaluation de la présence de cellules apoptotiques (coloration à l'acridine orange)

Préalablement, les embryons ont été rincés à l'eau filtrée, remplacée ensuite par une solution d'acridine orange. Pour la solution stock, 10 µg/mL de solution mère d'acridine orange ont été

préparés en diluant 2000 fois une solution de DMSO de 20 mg/mL soit 15 μ L dans 30 mL d'eau du circuit. De la solution stock obtenue, 3 mg/L d'acridine orange a été ajouté aux larves maintenues pendant 30 min dans un environnement sombre ceci dans le but de minimiser la décoloration de la couleur orange de l'acridine. Ensuite, les larves ont été lavées trois fois de façon très soigneuse avec de l'eau filtrée afin d'éliminer l'excès d'acridine. Après incubation, les larves (5 pour chaque condition) ont été par la suite anesthésiées à l'aide du MS222 (sulfonate de méthane de tricaïne) à 0,01 % (10 μ L dans 100 mL d'eau filtrée). Après anesthésie, deux images avec différentes mises au point des larves ont été prises et les cellules apoptotiques sont apparues comme des points vert brillant sous un microscope à fluorescence avec un grossissement de 4X et 10X. Une fois les images capturées, une section précise (la ligne latérale postérieur) pour toutes les larves et pour toutes les conditions ont été comptées afin de déterminer le nombre total d'événements apoptotiques.

2.4. Analyses statistiques

De toutes les données recueillies, un contrôle d'homoscédasticité des variances sur les résidus ainsi qu'un test de normalité des données (Shapiro-Wilk) a été réalisé. Un seuil de signification de $\alpha = 0,05$ a été fixé et le logiciel utilisé pour les analyses statistiques est R4.2.1 dans son interface Rstudio et Excel pour les graphiques. Lorsque les tests de normalité et d'homogénéité n'étaient pas respectés, on procédait à un test non paramétrique en effectuant un test d'ANOVA non paramétrique à la place d'une transformation de données (vu le fort écart par rapport à la distribution normale). Pour la comparaison des moyennes, un test de Tukey a été effectué suivi d'un Post hoc pour les données qui s'écartaient des autres, permettant de faire une comparaison deux à deux. La signification statistique des différences entre le groupe témoin ou contrôle et les groupes de traitement a été obtenue par un test non-paramétrique de Wilcoxon suivi d'un test de Kruskal wallis et les différences entre les groupes comparés ont été considérées lorsque $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Suivi de la décontamination des MPs

Les résultats de la décontamination des MPs montrent une altération des fragments avec les composés suivants : KOH 10%, KOH 20%, KOH alcoolique et le H₂O₂ 30% (Figure 13). Le meilleur produit chimique sans aucun risque de modification et de dégradation des MPs est le peroxyde H₂O₂ 30%.

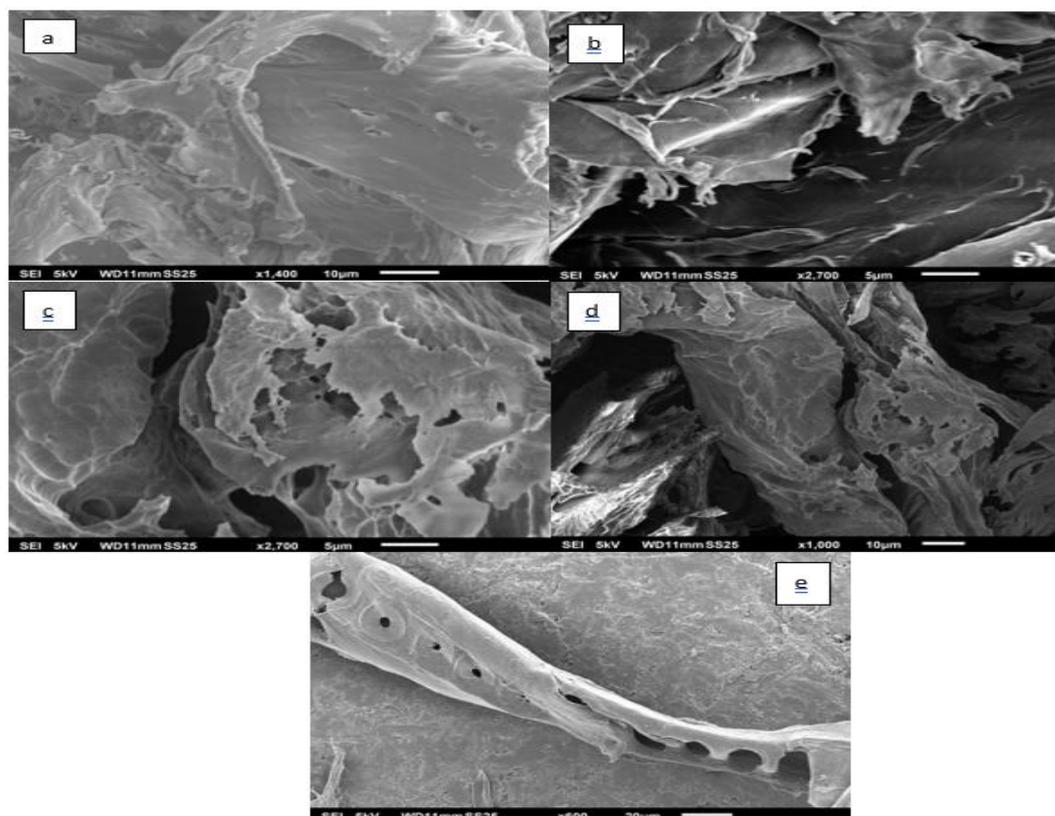


Figure 13 : Photographies des fragments de MPs après différents traitements. (a) Contrôle, (b) H₂O₂ 30%. (c) KOH 10%. (d) KOH 20% et (e) KOH alcoolique.

3.2. Caractérisation des microplastiques

L'analyse FTIR effectué dans le cadre de cette étude a permis d'obtenir les informations concernant le type de microplastiques (Figure 14A), leur composition chimique, les groupes fonctionnels constitutifs ainsi que les additifs associés à ces microplastiques. Pour le type de MPs : PET, le logiciel utilisé pour l'identification est KnowItAll BioRad 2018 qui contient une base de données avec des spectres de références. Les spectres obtenus se situent dans une longueur d'onde comprise entre 400-4000 nm. Les additifs détectés dans la composition des microplastiques sont entre autres : Poly (Diallyl phthalate), Cabazitaxel, Aconitine (Figure 15). La comparaison des spectres obtenus par rapport aux spectres de référence confirme un

pourcentage de similarité de 92,95%. Les spectres obtenus ont été comparés aux spectres de la bibliothèque de polymères ATR-FTIR du laboratoire de physique afin d'identifier la composition des particules. A ces spectres correspondaient les groupes fonctionnels situés dans le tableau de la figure 14 B.

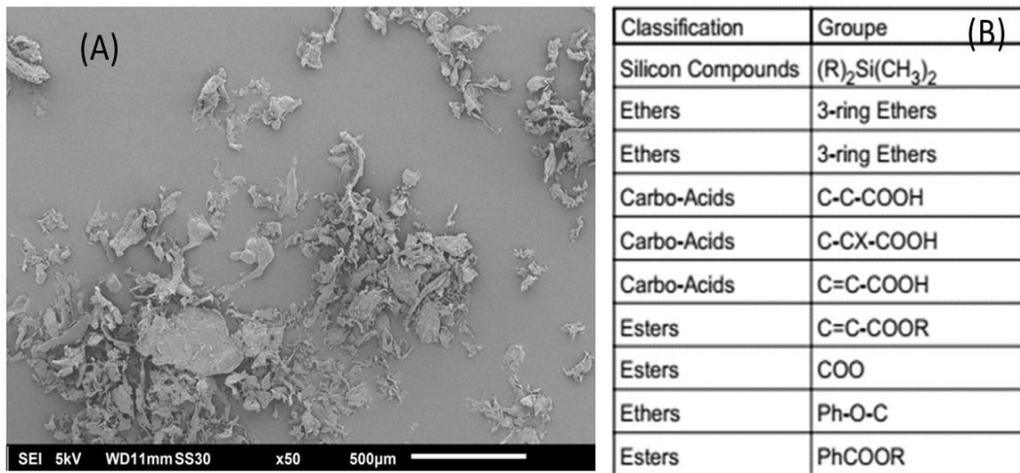


Figure 14 : (A) Fragments de MPs (> 50 μm) visualisés avec la SEM avant l'exposition; (B) Groupes fonctionnels.

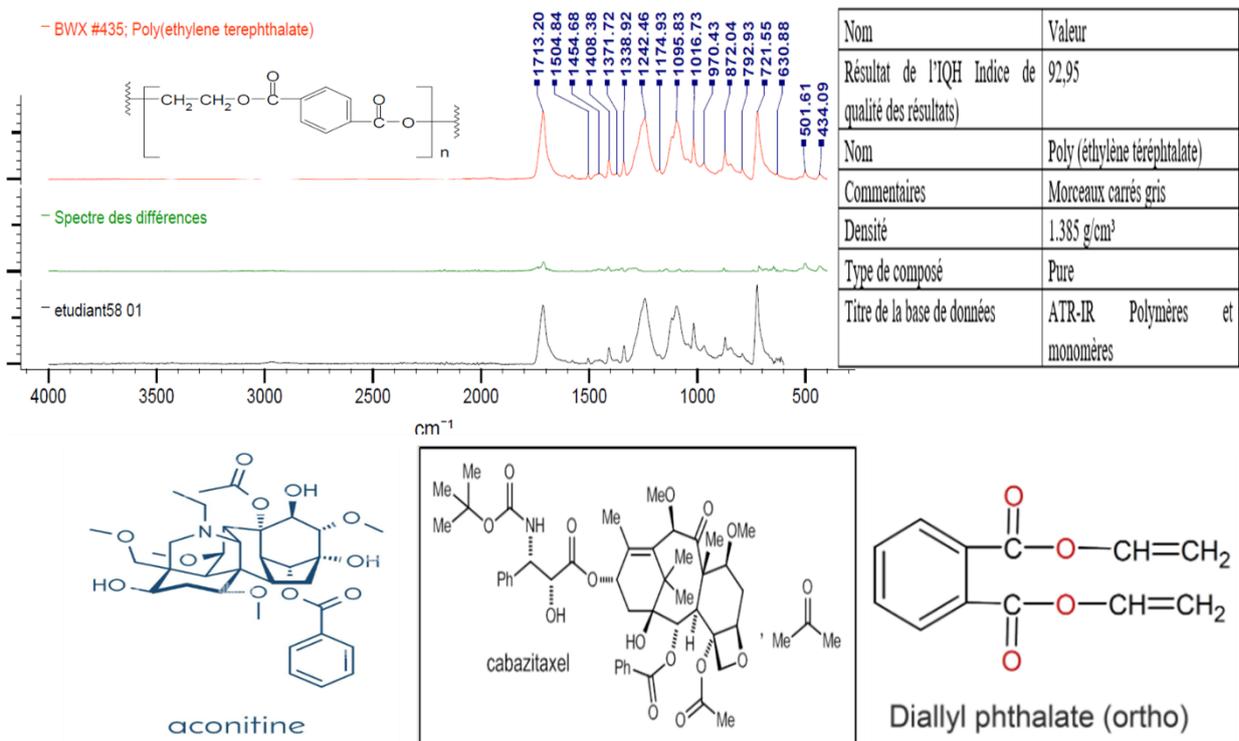


Figure 15: Caractérisation des fragments de MPs par le FTIR.

3.3. Evaluation de la quantification bactérienne et évolution de la mise en place du biofilm

Les concentrations de bactéries obtenues en cytométrie de flux ont présenté des valeurs presque similaires et une variation pas très significative tout au long de l'essai (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentrations des populations bactériennes prélevés à partir des échantillons de bactéries et de MPs combinés aux bactéries 24h après exposition. CT : contrôle
+Bactéries et MP : Microplastiques+ Bactéries

Bactéries (µL)						
Noms	CT1	CT2	CT3	MP1	MP2	MP3
24h	0,39	3,11	0,14	0,19	0,19	0,53
48h	0,96	1,25	0,15	11,68	0,30	0,65

Les observations faites en microscopie électronique à balayage ont révélé la présence des bactéries dans les différentes conditions d'essai après les 24h d'exposition. Par la suite, une inhibition progressive de la formation du biofilm bactérien a été observé ainsi qu'une altération de la forme des bactéries due à la méthode de fixation pour la microscopie à balayage.

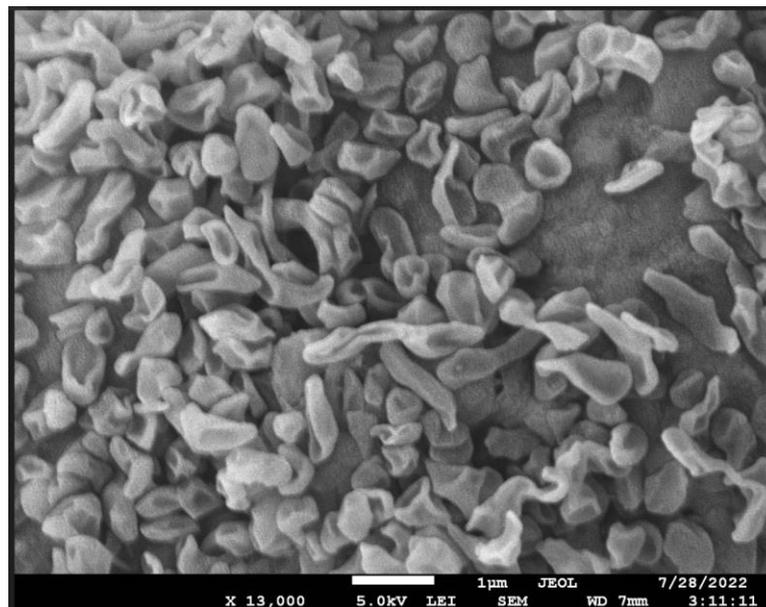


Figure 16 : Observation SEM de la colonisation bactérienne des MPs+Bact après 24h.

3.4. Évaluation de l'activité des embryons, du taux de mortalité, du taux d'éclosion, de la fréquence cardiaque, de la morphologie des embryons après exposition

A 24 hpf, la période pendant laquelle les poissons sont restés en activité était augmenté chez le groupe Ctrl par rapport aux groupes d'exposition (Figure 17). Une différence significative

($P=0,00605$) est observée entre le groupe d'exposition MPs+Bact et les autres signifiant l'impact de la combinaison MPs et bactéries sur l'activité des larves de poisson zèbre.

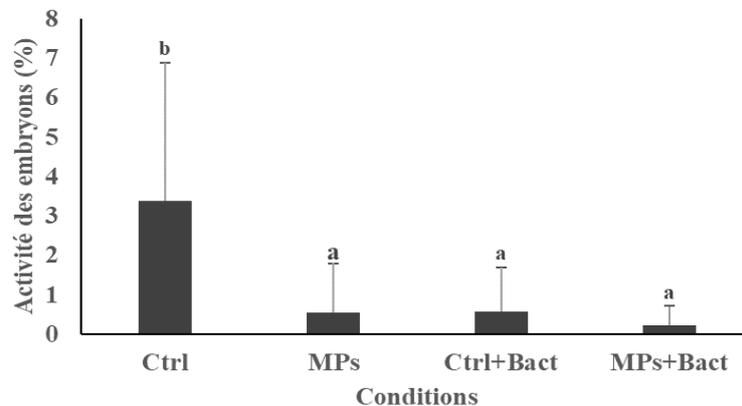


Figure 17 : *Activité des embryons (%) à 24 hpf en fonction des différentes conditions (n=20). Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les différentes conditions d'exposition. Ctrl : Contrôle, MPs : Microplastiques, Ctrl+Bact : Bactéries ; MPs+Bact : Microplastiques combinés aux bactéries.*

Le taux de mortalité a été évalué à partir de 24h après exposition. La figure 18 nous montre que bien qu'on ait noté des mortalités dans toutes les conditions, aucune différence significative n'a été observé entre les groupes témoins et les groupes d'embryons exposés. Le taux d'œufs coagulés le plus élevé a été observé dans le groupe contrôle ($17,8\pm 13,5\%$) et contrôle bactéries ($17,8\pm 9,62\%$). Le plus faible dans le groupe d'exposition aux MPs ($12,2\pm 1,92\%$).

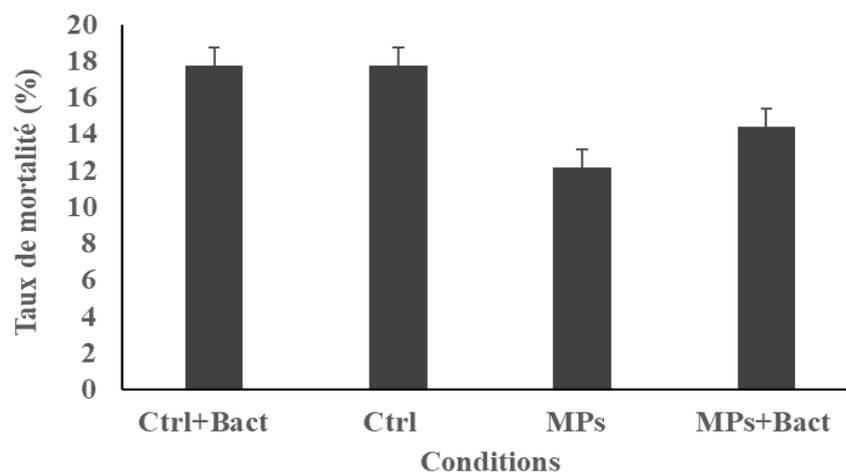


Figure 18 : *Taux de mortalité (%) des embryons après 24h d'exposition en fonction des différentes conditions d'expérimentation (n=30). Ctrl : Contrôle, MPs : Microplastiques, Ctrl+Bact : Bactéries ; MPs+Bact : Microplastiques combinés aux bactéries*

Concernant le taux d'éclosion, les larves ont commencé leur éclosion à 48hpf et on observe un fort taux d'éclosion dans les groupes exposés et une différence significative a été observé entre le groupe contrôle et les autres groupes d'exposition (Tableau 3). Aucune éclosion n'a été observé dans le contrôle à 48hpf mais on a pu noter 100% d'éclosion de tous les embryons à 72hpf. Le taux d'éclosion le plus élevé a été observé chez les embryons ayant été exposés aux MPs additionnés aux bactéries.

Tableau 3: Taux d'éclosion (%) des larves à 48h (n=30). Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries

Conditions	Moyenne ± écart-type
Ctrl	0±0
MPs	41.1 ± 30.1
Ctrl+Bact	32.2 ± 13.5
MPs+Bact	51.1 ± 17.1

Aucune différence significative entre le groupe contrôle et ceux exposés n'a été observée en ce qui concerne la fréquence cardiaque (P=0,516) et la longueur des embryons (P=0,0155) à 48hpf. Les battements cardiaques ont varié entre 178±24,7 BPM pour le contrôle et 191±30,8 BPM pour le groupe MPs plus bactéries (Tableau 4). Quant à la longueur des embryons, elle était comprise entre 3174±160 µm (MPs) et 3367±306 µm (Contrôle).

Tableau 4 : Moyenne et écart-type de la fréquence cardiaque (BPM) et la longueur (µm) des embryons à 48h (n=60). Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries

Conditions	Fréquence cardiaque (BPM)	Longueur (µm)
Ctrl	178±24,7	3367±306
MPs	184±23,7	3174±160
Ctrl+Bact	189±30,6	3347±250
MPs+Bact	191±30,8	3321±254

3.5. Analyse des cellules apoptotiques après coloration à l'acridine orange

La figure 19A montre le nombre moyen d'événements ou de cellules apoptotiques obtenus chez les embryons de poisson zèbre à différentes conditions (Ctrl, MPs, Ctrl+Bact, MPs+Bact). Les embryons étudiés au cours de cet essai ont montré de nombreux emplacements de cellules apoptotiques repartis sur l'ensemble du corps des larves. La mort cellulaire, indiquée par la

coloration à l'acridine orange (figure 19), a été quantifiée pour l'ensemble de l'embryon à 72hpf soit trois jours après le début de l'exposition. L'analyse statistique a montré une différence significative ($P=0,00000505$) entre les groupes d'embryons exposés aux MPs et les autres groupes.

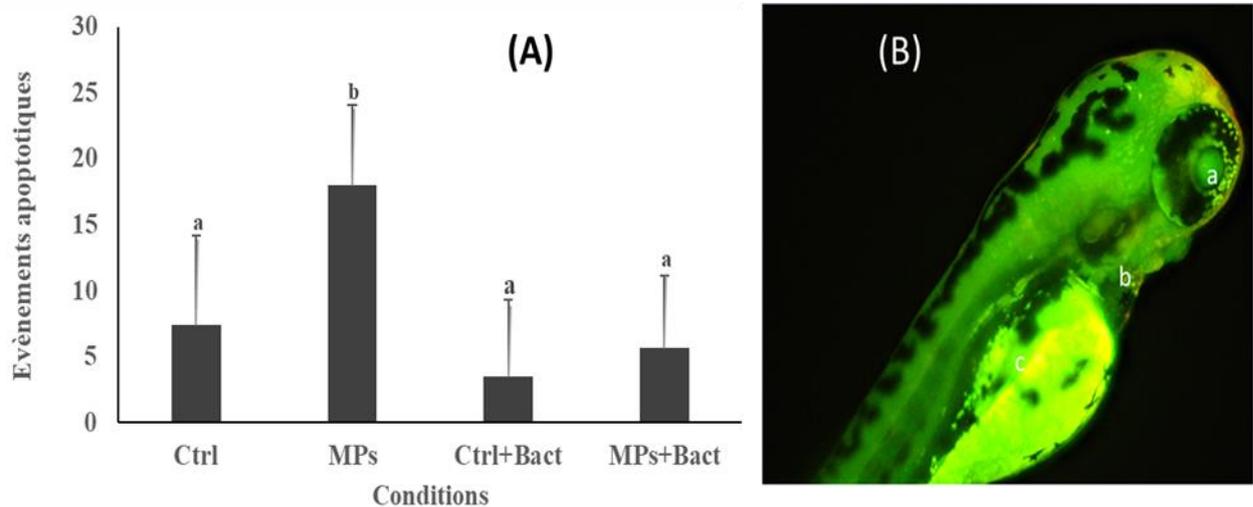


Figure 19 : Nombre d'évènements apoptotiques (A); Embryon de poisson zèbre coloré à l'acridine orange (B) présentant des cellules mortes (vert-brillant et rouge) dans l'œil (a), le cœur (b), et le vitellus (c) Echelle = 1000 μ m ($n=60$). Les lettres a et b indiquent les différences significatives entre les différentes conditions d'exposition Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries

3.6. Analyse du comportement des larves

L'analyse statistique (ANOVA deux facteurs) a montré un effet traitement, un effet temps et une interaction temps traitement. Afin de pouvoir comparer les comportements des larves en fonction des différentes conditions et suivant le temps (jour et nuit) une ANOVA à un facteur a été réalisé sur la variable groupe. Le résultat de cette analyse révèle que la distance parcourue (mm) par les larves a été significativement ($P < 2.2 \times 10^{-16}$) différente entre tous les groupes ou conditions et montrant ainsi que la distance parcourue dans l'obscurité a été plus longue que la distance parcourue par les larves dans la lumière sauf dans la condition MPs où le constat inverse a été observé (Figure 20). Une différence significative a également été observé entre les différents traitements ($P= 0.0284$) pour les deux phases sauf dans le traitement MPs où la distance parcourue dans la lumière a été plus longue que celle parcourue dans l'obscurité. Dans les groupes MPs et MPs+Bact, on observe une augmentation de la distance parcourue dans la nuit par rapport au groupe Ctrl. En ce qui concerne la condition temps, les MPs ont parcouru moins de distance que le Ctrl dans la nuit.

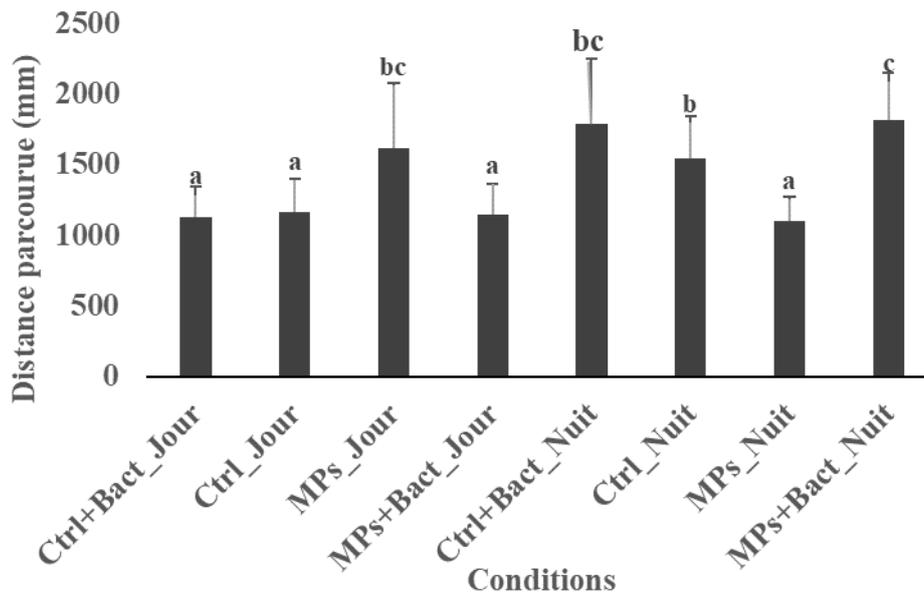


Figure 20 : Répartition de la distance parcourue (mm) des larves lors de l'activité de nage à 96 hpf (n=48). Les lettres a et b et c indiquent les différences significatives entre les différentes conditions d'exposition. Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries

L'évaluation de la réponse au stimulus tactile a été faite en comparant les réponses au stimulus pour tous les traitements et le résultat de la réponse a été utilisé pour comparer la réponse entre les larves témoins et les larves exposées. La caractérisation du comportement de natation indique le pourcentage de temps pendant lequel la larve de poisson zèbre se déplace dans l'intervalle d'une seconde. Nous avons choisi un intervalle inter-stimulus de 64 secondes afin de mesurer la réponse des individus au sursaut de manière répétitive sans que cela n'induisse une habitude. Il en ressort de cette analyse une différence significative ($P=2,31 \cdot 10^{-16}$) entre le groupe bactéries et les autres groupes d'exposition. Les pics élevés d'activité ont été observés immédiatement après l'application de chaque stimulus indiquant ainsi les réponses des larves de poisson zèbre au sursaut. Seul le groupe bactérie n'a pas produit un pic après le stimulus. Dans les autres conditions (Ctrl, MPs, MPs+Bact), on observe une habituation progressive des larves après le pic élevé dû à l'application du stimulus.

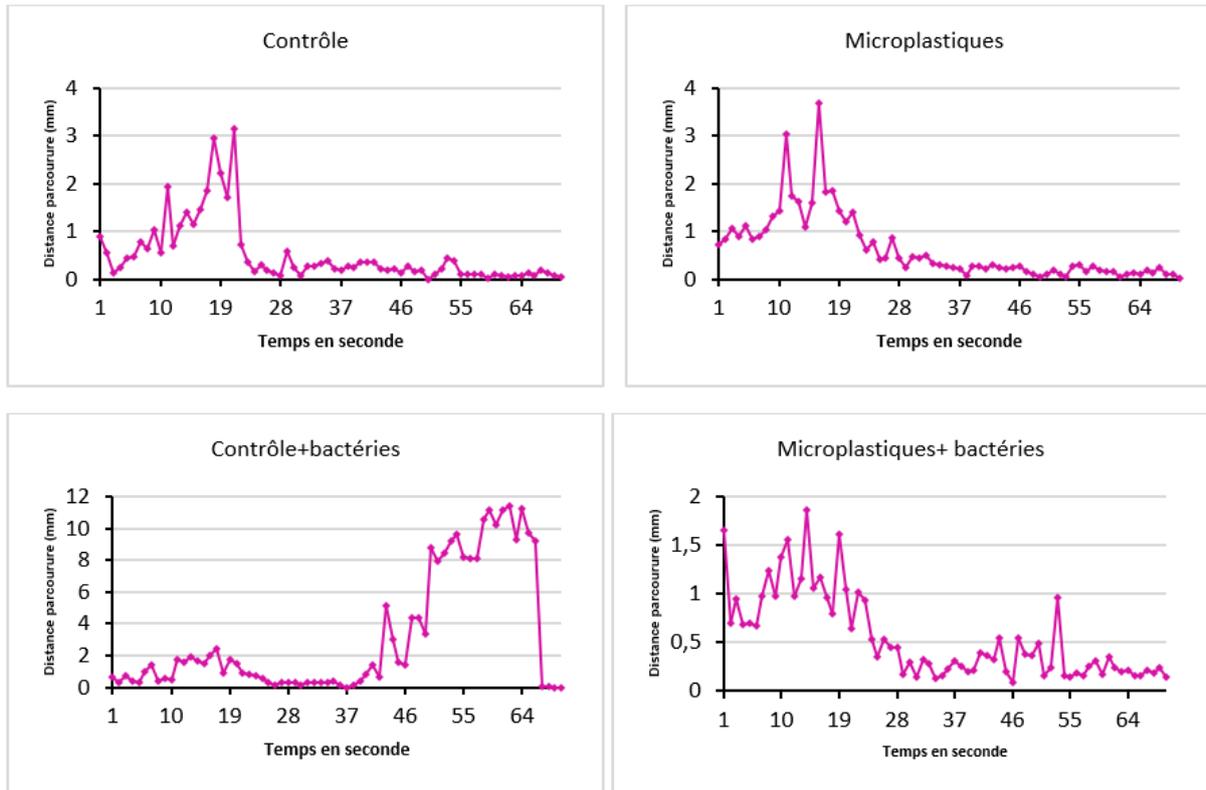


Figure 21 : Distribution de la distance parcourue (mm) des larves en réponse au stimulus (Tapping) dans les différentes conditions à 96 hpf (n=48). Ctrl: Contrôle, MPs: Microplastiques, Ctrl+Bact: Bactéries; MPs+Bact: Microplastiques combinés aux bactéries

4. Discussion

4.1. Décontamination des microplastiques

Le protocole de dégradation et d'identification des MPs réside avant le début des analyses à une sélection visuelle des fragments de MPs susceptible d'engendrer des biais. Pour lever cet équivoque, la phase préalable de traitement a révélé le H₂O₂ 30% comme étant la solution sans altération ou dégradation des MPs ce qui concorde avec les travaux de (Tagg et al., 2015) qui a adopté un prétraitement au H₂O₂ pour faciliter et améliorer l'imagerie FT-IR des MPs avec un taux global d'identification des différents types de polymères réussi à 98,33% très proche de 92,95% trouvé dans nos travaux.

4.2. Développement bactérien

Le test quantitatif du développement bactérien réalisé au FACS et celui examiné sous microscopie électronique à balayage ont montré un faible développement bactérien dans les groupes d'exposition (Ctrl, MPs, Bact) contrairement au groupe exposé aux MPs combinés aux bactéries où la présence du biofilm était plus prononcée. La faible formation de biofilm signifie l'apparition d'un effet inhibiteur (par exemple la diminution des réserves nutritives) sur la formation de biofilms dans ces groupes. Ces résultats corroborent avec ceux de (Jahid et al., 2013) qui après des observations similaires d'inhibition de formation du biofilm d'*A. hydrophila* a effectué un ajout de 0,05% (poids/volume) de glucose dans le milieu de renouvellement, ce qui a permis la régulation de la formation du biofilm bactérien ainsi que ses propriétés de virulence. En conclusion, l'alimentation apparaît comme une matrice complexe très importante nécessaires pour élucider l'énigme sur la formation du biofilm et les propriétés de virulence d'*A. hydrophila*. Il a également été démontré que les interactions entre les surfaces des cellules bactériennes et les nanoplastiques pouvaient induire des réactions d'oxydo-réduction conduisant de ce fait à leur sédimentation ou leur agrégation (Brar et al., 2010). (Brayner et al., 2006) a signalé que suite à une infection ZnO-NPs, la pénétration des ions Zn²⁺ dans l'enveloppe cellulaire ont conduit à la désorganisation de la membrane bactérienne, avec pour conséquence une inhibition de la croissance bactérienne. (Li et al., 2009), lors d'une exposition à 50 µg/ml d'Ag-NPs, ont observé des images SEM montrant des puits dans les cellules bactériennes avec des membranes fragmentées indiquant des attaques modifiant ainsi la perméabilité membranaire de la surface bactérienne.

4.3. Evaluation du taux de mortalité

Les résultats de l'analyse statistique du taux de mortalité n'ont montré aucune différence significative entre les groupes d'exposition et les groupes contrôle ce qui signifie que les mortalités des embryons observées tout le long de l'essai n'étaient pas dues du fait de l'exposition. Ces résultats corroborent avec ceux (Brandts et al., 2020) qui ont signalé que l'exposition aux nanoplastiques PS et par *A. hydrophila* pendant 24 heures n'a pas d'effet sur les larves de poisson zèbre. Des études faites sur la moule *Mytilus galloprovincialis* montre également que son infection par *Vibrio splendidus* après une exposition aux nanoplastiques pendant 3 heures avait des effets sur l'expression des gènes provoquant une modulation des hémocytes de *M. galloprovincialis* tandis qu'une exposition aux nanoplastiques seuls ou à *V. splendidus* seul a eu des effets sur l'expression génétique ou à *V. splendidus* seulement n'a eu aucun effet observable. Des auteurs ont indiqué qu'une exposition chronique à des microplastiques pourrait avoir une importance plus grande. Mais (Ding et al., 2022) a montré qu'après une exposition simultanée des larves à des microplastiques et à *A. hydrophila* pendant 35 jours n'avait pas aggravé la mortalité des poissons zèbres par rapport à ceux infectés par *A. hydrophila* seule.

4.4. Evaluation du taux d'éclosion

L'intervalle de temps compris entre le début et la fin de l'éclosion pour notre expérimentation était de 48h jusqu'à 72 hpf, on observe 100% d'éclosion. L'exposition a eu un effet sur la vitesse d'éclosion ($p < 0,05$). Comparé au groupe contrôle, le taux d'éclosion du poisson zèbre a augmenté dans tous les groupes exposés. Ces différences sont compatibles avec celles de la littérature qui stipulent que le processus d'éclosion n'est pas un phénomène synchrone, donc quelques différences peuvent apparaître d'un groupe à un autre (Frayssé et al., 2006). Cependant, l'augmentation de la vitesse d'éclosion observé dans les groupes d'exposition est rare puisque très souvent c'est le contraire que l'on observe. Des travaux menés par certains auteurs ont montré que l'accélération de l'éclosion se produisait seulement à faible dose et surtout quand l'exposition se déroule dans la phase de blastula. Même si lors de nos travaux, l'exposition n'a pas eu lieu pendant la phase blastula (2 hpf), mais plutôt à 6 hpf (Miyachi et al., 2003). D'après ce même auteur, l'exposition à des faibles doses pourrait avoir un effet stimulateur sur des processus cellulaires.

4.5. Fréquence cardiaque

A la suite de l'exposition des larves, aucune différence significative de la fréquence cardiaque (BPM) n'a été observé. En effet, la fréquence cardiaque est un paramètre cardiaque (parmi tant

d'autres tel le volume systolique, la respirométrie) étroitement lié au transport de l'oxygène qui à lui seul ne saurait donner un meilleur aperçu des performances cardiaques d'un individu. (Lucas, 2013) a également signalé une absence de déficience cardiaque des effets de HAP chez le poisson zèbre mais révèle que leur niveau de susceptibilité serait probable un peu plus à la fin du stade larvaire. Rabezanahary Andry Ny Aina dans ses travaux en 2020 a montré des différences de la fréquence cardiaque à 72 hpf chez le poisson zèbre.

4.6. Evènements apoptotiques

En ce qui concerne la mort cellulaire programmée, une augmentation des cellules apoptotiques a été observée chez les individus exposés aux MPs. En comparaison au groupe contrôle, une augmentation des évènements apoptotiques a été observée dans le groupe MPs+Bact même en absence de différence significative. Des résultats similaires ont été rapportés par (Jung et al., 2020) qui ont pu isoler à partir du cortex embryonnaire des souris une expression des cellules apoptotiques lors d'une exposition aux nanoparticules de polystyrène. Pareillement, la présence des cellules apoptotiques dans les branchies ainsi que les gonades mâles a été démontrée à la suite d'une exposition aux MPs du poisson zèbre (Qiang & Cheng, 2021), (Umamaheswari et al., 2021). (Santos et al., 2022) pensent que le mécanisme par lequel les MPs induisent la mort cellulaire pourrait s'expliquer par l'augmentation de la synthèse et du transport des cellules par la voie dopaminergique (niveaux élevés de dopamine) qui génère des radicaux libres capable de déclencher l'activation des caspases et donc de l'apoptose. D'après (Lei et al., 2018), l'exposition des poissons aux MPs réduirait la capacité de ces derniers à lutter contre les bactéries les rendant ainsi sensible au stress oxydatif.

4.7. Analyse des comportements

Dans cette partie, nous nous attarderons sur la réponse locomotrice induite par une alternance lumière et l'obscurité. L'analyse statistique effectuée sur l'activité locomotrice des larves de poisson zèbre a mis en évidence un effet significatif du temps (jour et nuit) pour tous les traitements expérimentaux, ce qui signifie que le jour et la nuit ont un effet significatif sur l'activité de nage du poisson zèbre. Il est d'abord important de noter que la physiologie au sein d'une population est très diversifiée et peut être observée dans tout le règne animal, aussi bien dans des populations génétiquement diverses que dans des populations isogéniques (Fitzgerald et al., 2019). La réponse locomotrice des larves peut être involontaire ou induite par l'alternance de périodes de lumière et d'obscurité et elle peut être mesurée aux stades embryonnaires post-éclosion à partir de plus de 48 hpf du poisson zèbre comme dans notre expérimentation où elle

s'est faite à 96hpf. Dans le cas de l'alternance lumière/obscurité, les embryons de poisson-zèbre ne bougent pas beaucoup lorsqu'ils sont éclairés par la lumière, mais leur activité augmente lorsqu'ils passent de la lumière à l'obscurité (Selderslaghs et al., 2010). La réponse lumière/obscurité selon (MacPhail et al., 2009) est souvent affectée par la durée des cycles et le nombre de répétitions (Ingebretson & Masino, 2013) et l'effet de toxicité observé dépend très fortement de la concentration d'exposition ce qui va en adéquation avec nos observations montrant une distance parcourue par les larves exposées aux MPs plus longue en journée plutôt que la nuit. (Hamm et al., 2019) ont signalé que le renouvellement de la solution d'exposition pouvait influencer les tests de toxicité rendant ainsi la concentration d'exposition un des paramètres expérimentaux les plus importants dans les études de toxicité. D'autre part, il a été prouvé que la recherche de nourriture chez le poisson-zèbre dépend de son système visuel et que l'augmentation de l'activité dans l'obscurité peut être liée à un comportement de recherche de lumière (Horstick et al., 2017). Aussi, certains auteurs ont montré que, la distance parcourue par les embryons de poisson zèbre est fonction de paramètres tels que l'âge des embryons ainsi que la taille du récipient dans lequel ils sont exposés (de Esch et al., 2012). Par ailleurs, il a été démontré que la dynamique du temps d'analyse affecte les résultats des tests parce que des périodes prolongées de lumière ou d'obscurité peuvent avoir un impact sur l'activité des embryons de poisson zèbre et donc impacter la sensibilité et les résultats de l'étude (Liu et al., 2015)

Les expositions à des stimuli acoustiques brusques provoquent des sursauts, qui sont des comportements stéréotypé ou reflexes dont l'évolution est modifiable. (Best et al., 2008) ont signalé la réduction de la fréquence de réponse des larves de poisson zèbre à la suite d'une série de stimuli sonores. Les larves du groupe exposé aux bactéries ont répondu à un stimulus du tapotement différents des autres groupes contrôle, microplastiques et microplastiques combinées aux bactéries. Cette exception incohérente peut s'expliquer par l'accoutumance inter-individuelle à la réponse du sursaut habituant les larves exposées aux bactéries au sursaut sonore comme l'a rapporté (Pantoja et al., 2016) qui stipule que le degré d'accoutumance chez un même individu est divers, stable et héréditaire. Aussi, d'après les études de (Fitzgerald et al., 2019), les observations de la réponse des larves au sursaut ont montré que alors que certaines larves se déplacent vers le centre, d'autres peuvent être arrêtées par le bord du mur. Ce qui signifie qu'occasionnellement le mur pourrait inhiber la réponse complète de sursaut et empêcher de voir le comportement intra-individuel des larves.

5. Conclusion

Dans cette étude, nous avons étudié les effets de l'exposition aux microplastiques sur les poissons zèbres. Les organismes marins étant soumis dans leur environnement naturel à divers stress incluant des fluctuations de paramètres physicochimiques, à des pollutions chimiques ainsi que des contaminations par des agents biologiques tels les virus, bactéries. Un challenge infectieux a été mis en place afin d'évaluer l'effet de ces MPs. Le principe de ce challenge bactérien était d'exposer les embryons à des fragments de MPs, à une bactérie pathogène *A.salmonicida*. Le suivi de l'effet de cette bactérie est évalué pendant 96hpf et les résultats obtenus ont été comparés afin de voir si le contaminant et les MPs entraînent un effet synergique, additif ou antagoniste sur le système immunitaire du poisson zèbre. Les résultats de cette étude ont montré que l'action seule ou combinée des MPs avec les bactéries affecte l'activité de nage du poisson zèbre. On a également observé une susceptibilité au stress oxydatif, la stimulation de la vitesse d'éclosion ainsi que certains processus cellulaires, l'augmentation des cellules apoptotiques. Globalement, le poisson zèbre est affecté aussi bien au niveau cellulaire, moléculaire que physiologique et des études ultérieures devraient faire plus attention à l'aspect moléculaire des effets des particules plastiques combinés aux bactéries sur le poisson zèbre.

Références bibliographiques

- Alli, R., Savithri, B., Das, S., Varalakshmi, C., Rangaraj, N., & Khar, A. (2004). Involvement of NKR-P2/NKG2D in DC-mediated killing of tumor targets: Indicative of a common, innate, target-recognition paradigm? *European Journal of Immunology*, 34(4), 1119-1126. <https://doi.org/10.1002/eji.200324793>
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596-1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Artham, T., Sudhakar, M., Venkatesan, R., Madhavan Nair, C., Murty, K. V. G. K., & Doble, M. (2009). Biofouling and stability of synthetic polymers in sea water. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(7), 884-890. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.03.003>
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., & Mayden, R. L. (2013). Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0803>
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens : Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment : A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102, 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.013>
- Bacchetta, R., Gregori, S., & Roncarolo, M.-G. (2005). CD4+ regulatory T cells : Mechanisms of induction and effector function. *Autoimmunity Reviews*, 4(8), 491-496. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2005.04.005>
- Best, J. D., Berghmans, S., Hunt, J. J. F. G., Clarke, S. C., Fleming, A., Goldsmith, P., & Roach, A. G. (2008). Non-Associative Learning in Larval Zebrafish. *Neuropsychopharmacology*, 33(5), 1206-1215. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301489>
- Biller-Takahashi, J. D., & Urbinati, E. C. (2014). Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system : Brazilian studies. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 86(3), 1484-1506. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130159>
- Bouachour, T. (2012). *Activation des cellules Natural Killer par les endocannabinoïdes Anandamide et 2-Arachidonoyl-glycérol* [Phdthesis, Université d'Angers]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01003790>

- Bourrachot, S. (2009). *Etude des effets biologiques de l'exposition à l'uranium chez le poisson zèbre (D. rerio). Impact sur les stades de vie* [hèse de doctorat de l'université Aix-Marseille I].
https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/Formation_recherche/Theses/Theses-soutenues/DEI/Pages/2009-bourrachot-etude-effets-biologiques-exposition-uranium-poisson-zebre-Drerio-impacts-stades-vie.aspx#.YpznB6hBw2w
- Bouwmeester, H., Hollman, P. C. H., & Peters, R. J. B. (2015). Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 49(15), 8932-8947. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01090>
- Brandts, I., Garcia-Ordoñez, M., Tort, L., Teles, M., & Roher, N. (2020). Polystyrene nanoplastics accumulate in ZFL cell lysosomes and in zebrafish larvae after acute exposure, inducing a synergistic immune response in vitro without affecting larval survival in vivo. *Environmental Science: Nano*, 7(8), 2410-2422. <https://doi.org/10.1039/D0EN00553C>
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste Management*, 30(3), 504-520. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.10.012>
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., & Fiévet, F. (2006). Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano Letters*, 6(4), 866-870. <https://doi.org/10.1021/nl052326h>
- Browne, M. A. (2015). Sources and Pathways of Microplastics to Habitats. In M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Éds.), *Marine Anthropogenic Litter* (p. 229-244). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_9
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide : Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9175-9179. <https://doi.org/10.1021/es201811s>
- Carlton, J. T., Chapman, J. W., Geller, J. B., Miller, J. A., Carlton, D. A., McCuller, M. I., Treneman, N. C., Steves, B. P., & Ruiz, G. M. (2017). Tsunami-driven rafting: Transoceanic species dispersal and implications for marine biogeography. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aao1498>

- Carnicer-Lombarte, A., Chen, S.-T., Malliaras, G. G., & Barone, D. G. (2021). Foreign Body Reaction to Implanted Biomaterials and Its Impact in Nerve Neuroprosthetics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.622524>
- Charles, J., Chaperot, L., Salameire, D., Di Domizio, J., Aspod, C., Gressin, R., Jacob, M.-C., Richard, M.-J., Beani, J.-C., Plumas, J., & Leccia, M.-T. (2010). Plasmacytoid dendritic cells and dermatological disorders : Focus on their role in autoimmunity and cancer. *European Journal of Dermatology: EJD*, 20(1), 16-23. <https://doi.org/10.1684/ejd.2010.0816>
- Collard, F., Gilbert, B., Eppe, G., Roos, L., Compère, P., Das, K., & Parmentier, E. (2017). Morphology of the filtration apparatus of three planktivorous fishes and relation with ingested anthropogenic particles. *Marine Pollution Bulletin*, 116(1-2), 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.067>
- Cornet, V., Douxfils, J., Mandiki, S. N. M., & Kestemont, P. (2020). Early-life infection with a bacterial pathogen increases expression levels of innate immunity related genes during adulthood in zebrafish. *Developmental and Comparative Immunology*, 108, 103672. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103672>
- Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). 10—Microplastic identification techniques. In C. B. Crawford & B. Quinn (Éds.), *Microplastic Pollutants* (p. 219-267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809406-8.00010-4>
- de Esch, C., van der Linde, H., Slieker, R., Willemsen, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., & De Groot, D. (2012). Locomotor activity assay in zebrafish larvae : Influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicology and Teratology*, 34(4), 425-433. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.03.002>
- Deshoules, Q. (2020). *Influence du vieillissement des polymères sur la formation et le comportement des microplastiques en milieu marin* [Phdthesis, Université de Bretagne occidentale - Brest]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03589679>
- Ding, N., Jiang, L., Wang, X., Wang, C., Geng, Y., Zhang, J., Sun, Y., Zhang, Y., Yuan, Q., & Liu, H. (2022). Polyethylene microplastic exposure and concurrent effect with *Aeromonas hydrophila* infection on zebrafish. *Environmental Science and Pollution Research International*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20308-9>
- Dong, J., Yan, T., Yang, Q., Zhou, S., Song, Y., Liu, Y., Ma, L., Xu, N., Yang, Y., & Ai, X. (2022). Inhibitory Effect of Polydatin Against *Aeromonas hydrophila* Infections by

- Reducing Aerolysin Production. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.937463>
- Dussud, C., Hudec, C., George, M., Fabre, P., Higgs, P., Bruzard, S., Delort, A.-M., Eyheraguibel, B., Meistertzheim, A.-L., Jacquin, J., Cheng, J., Callac, N., Odobel, C., Rabouille, S., & Ghiglione, J.-F. (2018). Colonization of Non-biodegradable and Biodegradable Plastics by Marine Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01571>
- Eich, A., Mildenerger, T., Laforsch, C., & Weber, M. (2015). Biofilm and Diatom Succession on Polyethylene (PE) and Biodegradable Plastic Bags in Two Marine Habitats : Early Signs of Degradation in the Pelagic and Benthic Zone? *PLOS ONE*, 10(9), e0137201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137201>
- Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., Léonard, M. A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., & Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 97(2), 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>
- Erni-Cassola, G., Zadjelovic, V., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2019). Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 369, 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.067>
- Eryalçın, K. (2018). Effects of different commercial feeds and enrichments on biochemical composition and fatty acid profile of Rotifer (*Brachionus plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia franciscana*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18, 81-90. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_1_09
- Fabres, J., Savelli, H., Schoolmeester, T., Rucevska, I., & Baker, E. (2016). *Marine Litter Vital Graphics*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20593.89442>
- Fitzgerald, J. A., Kirla, K. T., Zinner, C. P., & vom Berg, C. M. (2019). Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Scientific Reports*, 9, 13647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49614-y>
- Fraysse, B., Mons, R., & Garric, J. (2006). Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(2), 253-267. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.015>
- Gauthier, L. (2021). Micro- et nanoplastiques dans les eaux continentales. *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail*, 17, 37.

- Gesamp. (2015). *Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment (Part 1)*. GESAMP. <http://www.gesamp.org/publications/reports-and-studies-no-90>
- Green, D. S. (2016). Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 216, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.043>
- Hamm, J. T., Ceger, P., Allen, D., Stout, M., Maull, E. A., Baker, G., Zmarowski, A., Padilla, S., Perkins, E., Planchart, A., Stedman, D., Tal, T., Tanguay, R. L., Volz, D. C., Wilbanks, M. S., & Walker, N. J. (2019). Characterizing sources of variability in zebrafish embryo screening protocols. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation*, 36(1), 103-120. <https://doi.org/10.14573/altex.1804162>
- Hann, S., Sherrington, C., Jamieson, O., Hickman, M., Kershaw, P., Bapasola, A., & Cole, G. (2018). *Investigating options for reducing releases in the aquatic environment of microplastics emitted by (but not intentionally added in) products: Final Report*. <https://www.vliz.be/nl/catalogus?module=ref&refid=312043&printversion=1&dropI MIStitle=1>
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 86(1), 6-19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
- Horstick, E. J., Bayleyen, Y., Sinclair, J. L., & Burgess, H. A. (2017). Search strategy is regulated by somatostatin signaling and deep brain photoreceptors in zebrafish. *BMC Biology*, 15(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0346-2>
- Hurk, R. van den, & Lambert, J. G. D. (2011). Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z83-317>
- Ingebretson, J., & Masino, M. (2013). Quantification of locomotor activity in larval zebrafish : Considerations for the design of high-throughput behavioral studies. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2013.00109>
- İpekog˘lu, B., Bke, H., & izer, . (2007). Assessment of material use in relation to climate in historical buildings. *Building and Environment*, 42(2), 970-978. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2005.10.029>
- Jahid, I. K., Lee, N.-Y., Kim, A., & Ha, S.-D. (2013). Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76(2), 239-247. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-321>

- Janeway, C. A. (2013). Pillars Article : Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989. 54: 1–13. *The Journal of Immunology*, 191(9), 4475-4487.
- Jin, Y., Xia, J., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., & Fu, Z. (2018). Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution*, 235, 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>
- Jung, B.-K., Han, S.-W., Park, S.-H., Bae, J.-S., Choi, J., & Ryu, K.-Y. (2020). Neurotoxic potential of polystyrene nanoplastics in primary cells originating from mouse brain. *NeuroToxicology*, 81, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.10.008>
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. B., & Salamatinia, B. (2017). A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *The Science of the Total Environment*, 578, 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.213>
- Kedzierski, M., Le Tilly, V., Bourseau, P., Bellegou, H., César, G., Sire, O., & Bruzard, S. (2017). Microplastics elutriation system. Part A : Numerical modeling. *Marine Pollution Bulletin*, 119(2), 151-161. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.060>
- Koelmans, A. A. (2015). Modeling the Role of Microplastics in Bioaccumulation of Organic Chemicals to Marine Aquatic Organisms. A Critical Review. In M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Éds.), *Marine Anthropogenic Litter* (p. 309-324). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_11
- Laganà, P., Caruso, G., Corsi, I., Bergami, E., Venuti, V., Majolino, D., La Ferla, R., Azzaro, M., & Cappello, S. (2019). Do plastics serve as a possible vector for the spread of antibiotic resistance? First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(1), 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.08.009>
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K. M., & He, D. (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Science of the Total Environment*, 619-620, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>
- Lieschke, G., & Trede, N. (2009). Fish immunology. *Current biology : CB*, 19, R678-82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.068>
- Limonta, G., Mancina, A., Benkhalqui, A., Bertolucci, C., Abelli, L., Fossi, M. C., & Panti, C. (2019). Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 9(1), 15775. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52292-5>

- Liu, Y., Carmer, R., Zhang, G., Venkatraman, P., Brown, S. A., Pang, C.-P., Zhang, M., Ma, P., & Leung, Y. F. (2015). Statistical Analysis of Zebrafish Locomotor Response. *PLOS ONE*, *10*(10), e0139521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139521>
- Lucas, J. (2013). *Intégrité fonctionnelle chez le poisson zèbre, Danio rerio, exposé à des concentrations sublétales d'hydrocarbures aromatiques polycycliques* [Phdthesis, Université de La Rochelle]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01174980>
- Lupo, C., & Angot, J.-L. (2020). Problèmes de santé publique liés à la consommation de fruits de mer. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, *204*(9), 1017-1033. <https://doi.org/10.1016/j.banm.2020.10.001>
- MacPhail, R. C., Brooks, J., Hunter, D. L., Padnos, B., Irons, T. D., & Padilla, S. (2009). Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology*, *30*(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011>
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(2), 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Makrinos, D. L., & Bowden, T. J. (2016). Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, *53*, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.008>
- Malbouyres, M. (2018). *Le collagène XXII dans la formation et la fonctionnalité de la jonction myotendineuse chez le poisson zèbre, de l'embryon à l'âge adulte*. 'Université Claude Bernard Lyon 1.
- Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, L., Mouchel, O., Soudant, P., Robbens, J., Huvet, A., & Zambonino-Infante, J. (2015). Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine Environmental Research*, *112*, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.009>
- Miyachi, Y., Kanao, T., & Okamoto, T. (2003). Marked depression of time interval between fertilization period and hatching period following exposure to low-dose X-rays in zebrafish. *Environmental research*, *93*, 216-219. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00042-2)
- OECD. (2004). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1 : Physical-Chemical properties* [Text]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1-physical-chemical-properties_20745753

- Pantoja, C., Hoagland, A., Carroll, E. C., Karalis, V., Conner, A., & Isacoff, E. Y. (2016). Neuromodulatory Regulation of Behavioral Individuality in Zebrafish. *Neuron*, *91*(3), 587-601. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.016>
- Peixoto, D., Pinheiro, C., Amorim, J., Oliva-Teles, L., Guilhermino, L., & Vieira, M. N. (2019). Microplastic pollution in commercial salt for human consumption: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *219*, 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.02.018>
- PlasticEurope. (2021). Plastics—The Facts 2021 • Plastics Europe. *Plastics Europe*. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>
- Qiang, L., & Cheng, J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, *263*, 128161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128161>
- Qiao, R., Deng, Y., Zhang, S., Wolosker, M. B., Zhu, Q., Ren, H., & Zhang, Y. (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, *236*, 124334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065>
- Rauta, P. R., Nayak, B., & Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study : A model for higher organisms. *Immunology Letters*, *148*(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Rebl, A., & Goldammer, T. (2018). Under control : The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, *77*, 328-349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.016>
- Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D. K. A., Thums, M., Wilcox, C., Hardesty, B. D., & Pattiaratchi, C. (2014). Millimeter-Sized Marine Plastics : A New Pelagic Habitat for Microorganisms and Invertebrates. *PLOS ONE*, *9*(6), e100289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100289>
- Ringø, E., Jutfelt, F., Kanapathipillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T. M., Myklebust, R., & Olsen, R. E. (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and Tissue Research*, *318*(2), 305-311. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0934-2>
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T., & Teh, S. J. (2013). Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific Reports*, *3*(1), 3263. <https://doi.org/10.1038/srep03263>

- Rowenczyk, L., Leflaive, J., Clergeaud, F., Minet, A., Ferriol, J., Gauthier, L., Gigault, J., Mouchet, F., Ory, D., Pinelli, E., Albignac, M., Roux, C., Mingotaud, A. F., Silvestre, J., Ten-Hage, L., & ter Halle, A. (2021). Heteroaggregates of Polystyrene Nanospheres and Organic Matter : Preparation, Characterization and Evaluation of Their Toxicity to Algae in Environmentally Relevant Conditions. *Nanomaterials*, *11*(2), 482. <https://doi.org/10.3390/nano11020482>
- Santos, D., Luzio, A., Félix, L., Cabecinha, E., Bellas, J., & Monteiro, S. M. (2022). Microplastics and copper induce apoptosis, alter neurocircuits, and cause behavioral changes in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *242*, 113926. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113926>
- Sapea. (2019). *A Scientific Perspective on Microplastics in Nature and Society*. SAPEA. <https://doi.org/10.26356/microplastics>
- Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control*, 3-68. <https://doi.org/10.1533/9780857095732.1.3>
- Selderslaghs, I. W. T., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.002>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *83*(1), 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Spence, R., & Smith, C. (2006). Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behavioral Ecology*, *17*(5), 779-783. <https://doi.org/10.1093/beheco/arl016>
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Julie Pernet, M. E., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., & Huvet arnaud, A. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics | Proceedings of the National Academy of Sciences. *PNAS*. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1519019113>
- Tagg, A. S., Sapp, M., Harrison, J. P., & Ojeda, J. J. (2015). Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. *Analytical Chemistry*, *87*(12), 6032-6040. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00495>

- ter Halle, A., Ladirat, L., Gendre, X., Goudouneche, D., Pusineri, C., Routaboul, C., Tenailleau, C., Duployer, B., & Perez, E. (2016). Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris. *Environmental Science & Technology*, *50*(11), 5668-5675. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00594>
- Tort, L., Balasch, J., & Mackenzie, S. (2003). Fish Immune System. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunologia*, *22*, 277-286.
- Umamaheswari, S., Priyadarshinee, S., Kadirvelu, K., & Ramesh, M. (2021). Polystyrene microplastics induce apoptosis via ROS-mediated p53 signaling pathway in zebrafish. *Chemico-Biological Interactions*, *345*, 109550. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109550>
- Vered, G., & Shenkar, N. (2021). Monitoring plastic pollution in the oceans. *Current Opinion in Toxicology*, *27*, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.08.005>
- Viršek, M. K., Lovšin, M. N., Koren, Š., Kržan, A., & Peterlin, M. (2017). Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine Pollution Bulletin*, *125*(1), 301-309. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.024>
- Yang, X., Sheng, W., Sun, G. Y., & Lee, J. C.-M. (2011). Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochemistry International*, *58*(3), 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.004>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
- Zbyszewski, M., Corcoran, P. L., & Hockin, A. (2014). Comparison of the distribution and degradation of plastic debris along shorelines of the Great Lakes, North America. *Journal of Great Lakes Research*, *40*(2), 288-299. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.02.012>
- 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. <https://doi.org/10.1021/es401288x>