
Microplastics ingestion effects on zebrafish larvae (*Danio rerio*) health

Auteur : Rabezanahary, Andry Ny Aina

Promoteur(s) : 8790; 8794

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master de spécialisation en gestion des ressources aquatiques et aquaculture

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9798>

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.

Annexe 1 : expression des gènes à 4 jpf

Tableau 1: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (*ef1a*) à 4 jpf (n=3)

Gènes	Expositions	
	0 μ g/l	1000 μ g/l
<i>lyso</i>	1,239 \pm 0,127	1,298 \pm 0,041
<i>mpo</i>	2,271 \pm 0,177	2,236 \pm 0,168
<i>cyp3</i>	0,178 \pm 0,093	0,305 \pm 0,095
<i>tnfa</i>	1,468 \pm 0,491	1,025 \pm 0,267
<i>bcl2</i>	1,264 \pm 0,087	1,066 \pm 0,114
<i>il8</i>	1,727 \pm 0,542	1,830 \pm 0,013
<i>sod</i>	1,769 \pm 0,065	1,691 \pm 0,076
<i>aldo</i>	0,394 \pm 0,044	0,370 \pm 0,026
<i>hsp70</i>	3,227 \pm 1,079	1,559 \pm 0,175
<i>igf</i>	1,920 \pm 0,930	1,671 \pm 0,093

Annexe 2A: expression des gènes à 7 jpf

Tableau 2: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (*ef1a*) à 7 jpf (n=3)

Gènes	Traitements			
	A	B	C	Contrôle
<i>lyso</i>	1,032 \pm 0,230	1,219 \pm 0,182	1,291 \pm 0,083	0,859 \pm 0,108
<i>mpo</i>	1,446 \pm 0,574	1,312 \pm 0,113	1,124 \pm 0,133	1,388
<i>cyp3</i>	1,865	1,067	1,086 \pm 0,309	1,792 \pm 1,305
<i>tnfa</i>	0,691 \pm 0,162	0,953 \pm 0,253	0,671 \pm 0,115	1,032
<i>il8</i>	0,688 \pm 0,111	0,835 \pm 0,144	0,635 \pm 0,030	0,652

Annexe 2B: Expression des gènes à 8 jpf

Tableau 3: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (*ef1a*) à 8 jpf (n=3)

Gènes	Traitements			
	A	B	C	Contrôle
<i>lyso</i>	0,763 \pm 0,042	0,917 \pm 0,048	1,039 \pm 0,097	0,838 \pm 0,009
<i>mpo</i>	0,541 \pm 0,082	0,716 \pm 0,117	0,528 \pm 0,064	0,839 \pm 0,027
<i>cyp3</i>	0,458 \pm 0,292	0,213 \pm 0,101	0,150 \pm 0,021	0,882 \pm 0,395
<i>tnfa</i>	1,420 \pm 0,055	1,745 \pm 0,469	1,437 \pm 0,530	1,794 \pm 0,281
<i>il8</i>	0,571 \pm 0,092	3,088 \pm 2,444	0,368 \pm 0,033	1,794 \pm 0,281

Annexe 3 : Protocole coloration des billes avec du Nil red

D'après l'article de Cole, (2016). A novel method for preparing microplastic fibers. *Scientific reports*, 6, 34519.

Matériel :

- Nile red
- Microbilles de deux tailles calibrées, 30 μ m et 5 μ m
- Ethanol à 99.8%
- Eppendorf de la marque pour éviter la dissolution du matériel dans le solvant.
- Verrerie (Bechers)
- Falcon Eppendorf

Mode opératoire :

Le matériel utilisé ne doit idéalement pas se disperser dans le milieu par *leaching*. Dans cette optique, seuls des récipients de la marque Eppendorf™ ou de la verrerie rincée à l'eau distillée seront utilisés.

Une quantité de 1mg de Nile red est solubilisé dans 1 ml d'éthanol ultra-pur (99.8%) ce qui donne une solution mère concentrée à 1mg/ml.

On forme ensuite 10 aliquots de la solution mère de chacun qui sont ensuite prélevés pour usage ultérieur.

À partir de cette solution tirée d'un aliquot, 250 μ l sont prélevés et coupé à 500 μ l d'éthanol (99.8%).

NB : Une centrifugation de ces aliquot suivi du prélèvement du surnageant peut s'avérer nécessaire si la solution est trop foncée.

Une quantité de 100 μ l des deux solution mère de microbilles plastique sont ajouté dans deux des 10 aliquots.

Ceux-ci sont vortexé puis incubé à 4°C pendant 10 minutes

La teinture est ensuite enlevé par un cycle de centrifugation 5 minutes à 5000g et de rinçage à l'éthanol puis re-suspension au vortex jusqu'à clarification du milieu.

Le surnageant initial est conservé.

Après le dernier rinçage, le milieu est retiré et le restant est mis à l'évaporation sous hotte pour 1h.

Les billes sont ensuite resolubilisée à l'eau pure.

NB : La technique du séchage de l'Ethanol n'est pas optimale pour le diamètre de 5 μ m car des grumeaux se forment.

NB : Idéalement une pesée des Eppendorf après le séchage permettrait de définir la concentration massique et le nombre de particules en solution aqueuse.

Une vérification de la teinture est ensuite réalisée sous microscopie à fluorescence.