

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.



UNIVERSITÉ DE LIÈGE
UNIVERSITÉ DE NAMUR



Faculté des Sciences

Master de Spécialisation en Gestion des Ressources Aquatiques et Aquaculture

Travail de fin d'étude

Effets de l'ingestion de microplastiques sur la santé des larves de poissons zèbres (*Danio rerio*)

Réalisé par :

Andry Ny Aina RABEZANAHARY

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

Encadrant : Jérôme LAMBERT (UNamur-URBE)

Jury :

- Docteur Sylvie GOBERT (ULiège)
- Professeur Marie-Louise SCIPPO (ULiège)

Année académique 2019-2020

Remerciements

Au terme de ce travail de fin d'étude, j'exprime mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont accompagné de près ou de loin.

Je pense :

A mes promoteurs, Professeur Patrick KESTEMONT et Docteur Valérie CORNET de l'Université de Namur pour la qualité de leur encadrement, pour le soin et l'abnégation dont ils ont fait preuve au cours de cette étude.

Au Professeur Patrick KESTEMONT, Directeur de l'Unité de Recherche en Biologie Environnementale et évolutive de l'Université de Namur pour m'avoir permis d'exécuter mon Travail de Fin d'Etude au sein de son unité.

A mon encadrant, Jérôme LAMBERT pour son assistance quotidienne, sa qualité d'écoute et ses conseils forts utiles pour la réussite de mon travail.

A tous le personnel de l'URBE/UNamur, merci pour vos conseils et orientations tout au long de mon travail.

A tout le corps professoral du Master GeRAA pour la qualité de l'enseignement reçu.

A l'ARES-CCD pour l'opportunité qui m'a été offerte afin de réaliser ce master.

A tous mes amis et collègues du Master GeRAA 2019-2020.

A toute ma famille et mes amis proches.

Résumé

L'effet du microplastique sur les premiers stades de développement chez les poissons zèbres (*Danio rerio*) est encore peu connu. Cette étude a pour but d'élucider la toxicité des microplastiques avant et après l'ouverture de la bouche des larves de poissons zèbres. Pour se faire, 4 types de traitement ont structuré le dispositif expérimental : exposition de 2 hpf à 4 jpf, exposition de 4 jpf à 7 jpf, exposition de 2 hpf à 7 jpf et le groupe contrôle (non exposé). Le microplastique utilisé a été les microbilles de 5 µm à une concentration de 1000 µg/l. Les paramètres OCDE ont été mesurés sur les larves à 48 hpf et 72 hpf. Ensuite, la surface du sac vitellin a été mesurée à 4 jpf. La longueur des poissons, le comportement et ainsi que certains gènes liés à la réponse au stress oxydatif, au métabolisme et à l'immunité ont été observés à 4 jpf et 7 jpf. Et enfin, un challenge bactérien de 6h a été effectué à 8 jpf pour revoir le changement d'expression de ces mêmes gènes. Comme résultats, les microplastiques n'avaient eu d'effet sur les larves avant l'ouverture de la bouche, hormis la réduction de la surface du sac vitellin des sujets exposés. Par contre, après l'ouverture de la bouche, les sujets exposés de 4 jpf à 7 jpf et 2 hpf à 7 jpf présentaient une modulation du gène en lien avec la réponse oxydative (*sod*). Outre cela, le challenge bactérien a accentué le stress oxydative des sujets exposés, surtout, ceux exposés de 2 hpf à 7 jpf. Par conséquent, notre étude a permis de mettre en évidence les potentiels effets des microplastiques sur les premiers stades de développement des larves de poissons zèbres.

Mots-clés : microbilles, stress oxydatif, challenge bactérien, larves de poissons zèbres

Abstract

Toxic effect of microplastics in the first stage of zebrafish larvae (*Danio rerio*) development is not well known. This research aims at elucidating the toxicity of microplastics before and after the opening mouth stage. To do so, the experimental unit was organized into 4 forms of treatment: exposure from 2 hpf to 4 dpf ; exposure from 4 dpf to 7 dpf, exposure from 2 hpf to 7 dpf and the control (non-exposed). 5 µm microbeads at a concentration of 1000 µg/l were used during the experimentation. OECD parameters was assessed at 48 hpf and 72 hpf. Yolk sac resorption surface was estimated at 4 dpf. Larvae length, behavior and some oxydative stress response, immunity and metabolism related genes were observed at 4 dpf and 7 dpf. And a 6 hours bacterial challenge was performed at 8 dpf to compare the gene expression deviation from 7 dpf. As a result, microplastics do not affect larvae development before the opening mouth stage, except lowering the yolk sac surface in the exposed group. Somehow, after the opening mouth stage, larvae exposed from 2 hpf to 7 dpf and 4 dpf to 7 dpf showed a gene modulation related to stress oxidative response (*sod*). In addition, the bacterial challenge increased significantly the rate of oxidative stress in the exposed group, especially those exposed from 2 hpf to 7 dpf. This study let us know about the microplastic toxicity on zebrafish larvae first stage of development.

Keywords : microbeads, oxydative stress, bacterial challenge, zebrafish larvae

Liste des abréviations et acronymes

ADN	: Acide désohyribonucléique
AIC	: Critère d'information d'Akaike
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
DBP	: Dibutyl phthalate
DEHP	: Di-(2-ethylhexyl)phthalate
DEP	: Diethyl phthalate
DNase	: Désoxyribonucléase
dpf	: Day post fecondation
HBCD	: Hexabromocyclododecane)
HDPE	: Polyéthylène à haute densité
hpf	: Heure post fécondation
jpf	: Jour post fécondation
MPs	: Microplastiques
MS 222	: Tricaine methanosulfonate
PA	: Polyamide
PAH	: Hydrocarbure aromatique polycyclique
PCB	: polychlorobiphényle
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PE	: Polyéthylène
PET	: Polyethylene terephthalate
PP	: Polypropylène
PS	: Polystyrène
PVC	: Polyvinyl chloride
RT-qPCR	: Real Time Quantitative PCR
UPVC	: Polyvinyl chloride non plastifié
UV	: Ultra-violet

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	ii
Abstract	ii
Liste des abréviations et acronymes	iii
Table des matières	ii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
I Contexte général.....	1
II Plastique	1
II.1 Origines du plastique et leur composition	1
II.2 Additifs sur les plastiques.....	3
II.3 Principales sources de déchets plastiques.....	3
II.3.1 Activités terrestres.....	3
II.3.2 Activités aquatiques	3
III Microplastiques	4
III.1 Microplastiques sources, distribution et concentration dans l'environnement aquatique	4
III.1.1 Sources de microplastiques	4
III.1.2 Distribution et concentration	4
III.1.3 Interaction entre les microplastiques et l'environnement aquatique	6
III.2 Effets directs de l'ingestion de microplastiques	6
III.2.1 Destinée des microplastiques ingérés dans l'organisme	7
III.2.2 Réponses cellulaires et effets de la présence de microplastiques dans l'organisme	8
IV Poisson zèbre.....	9
IV.1 Description du poisson zèbre	9
IV.1.1 Taxonomie.....	9
IV.1.2 Reproduction et croissance.....	9
IV.1.3 Écologie et comportement nutritionnel	10
IV.2 Études de la toxicité du microplastique sur le poisson zèbre adulte.....	10
IV.2.1 Destinée du microplastique dans l'organisme.....	11
IV.2.2 Réponses cellulaires et atteintes causées par la présence de microplastique dans l'organisme.....	11
IV.3 Études de la toxicité du microplastique pendant les premiers stades de développement des poissons zèbres	12
V Problématique et nouvelles hypothèses à vérifier	14
VI Matériels et méthodes.....	15

VI.1	Caractérisation du microplastique.....	15
VI.2	Étude des effets des microplastiques sur les premiers stades de développement ..	15
VI.2.1	Mode d'élevage des animaux, technique de reproduction et démarche expérimentale	15
VI.2.2	Solution mère	16
VI.2.3	Taux d'éclosion des œufs, fréquences cardiaques, longueur des larves (Protocole OCDE 236).....	17
VI.2.4	Analyses des comportements des animaux et nombres de microplastiques ingérés	17
VI.2.5	Challenge bactérien	18
VI.2.6	Extraction d'ARN	18
VI.2.7	Traitement DNASE et RT	19
VI.2.8	Analyse de l'expression des gènes en qPCR.....	19
VI.3	Analyses statistiques	20
VII	Résultats	21
VII.1	Suivi de 2 hpf à 4 jpf.....	21
VII.1.1	Survie et longueur des poissons.....	21
VII.1.2	Mortalité 24 h et Taux d'éclosion.....	21
VII.1.3	Surface du sac vitellin.....	21
VII.1.4	Fréquences cardiaques	22
VII.1.5	Analyses de comportements	22
VII.2	Suivi de 4 jpf à 7 jpf et du challenge bactérien.....	23
VII.2.1	Survie.....	23
VII.2.2	Longueur.....	23
VII.2.3	Analyses de comportements	24
VII.2.4	Microplastiques ingérés	25
VII.3	Expression des gènes	27
VIII	Discussions.....	30
VIII.1	Rappel sur les objectifs	30
VIII.2	Effet des microplastiques sur le développement larvaire (2hpf – 4 dpf)	30
VIII.3	Comportement des larves à 4jpf	31
VIII.4	Effet des microplastiques après l'ouverture de la bouche	31
VIII.5	Ingestion de microplastiques.....	31
VIII.6	Comportement des larves suite à l'ingestion des microplastiques.....	32
VIII.7	Expression des gènes suite à l'ingestion de microplastiques.....	33
VIII.8	Challenge bactérien.....	33
IX	Conclusion.....	35
	Bibliographie	36

Webographie	42
-------------------	----

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique des plastiques	2
Tableau 2: Principaux additifs.....	3
Tableau 3: Concentration en microplastiques dans la colonne d'eau	5
Tableau 4 : Ingestion des microplastiques par les organismes aquatiques	7
Tableau 5: Moyenne \pm erreur standard (n=6) de la survie (%) et moyenne \pm erreur standard (n=20) de la longueur (mm) des larves à 4 jpf	21
Tableau 6: Moyenne \pm erreur standard (n=20) de la fréquence cardiaque (bpm : battements par minute) des larves à 48 hpf et 72 hpf	22
Tableau 7: Survie moyenne des larves à 7 jpf (Moyenne \pm erreur standard, n=3)	23

Liste des figures

Figure 1: Modèle de prédiction de la densité des microplastiques (particules/km ²) pour chaque classe (0,33-1,00 mm, 1,01-4,75 mm, 4,76-200 mm, et >200 mm).....	6
Figure 2: Schéma expérimental.....	16
Figure 3: Mesure de la surface du sac vitellin et la longueur des larves avec ImageJ	17
Figure 4: Schéma expérimental après l'analyse de comportement à 4 jpf	18
Figure 5: (A) Surface du sac vitellin des larves à 4 jpf représenté en moyenne \pm erreur standard (n=20), (B) Mortalité à 24 h et taux d'éclosion (%) représenté en moyenne \pm erreur standard (n=6).....	22
Figure 6: Distribution de la distance totale parcourue en mm (A) et de la vitesse de nage en mm/s (B) des larves à 4 jpf pendant le test de comportement (n=120).....	23
Figure 7: Distribution de la longueur (mm) des larves à 7 jpf (n=20)	24
Figure 8 : Distribution de la distance totale parcourue (mm) (A) et de la vitesse moyenne (mm/s) (B) des larves à 7 jpf (n=60) - (*) indique la significativité de la différence de la moyenne par rapport aux contrôles	25
Figure 9: (A) larve à 7 jpf sous stéréomicroscope grossissement (x0,1) - (B) larve à 7 jpf sous microscope inversé grossissement (x32) - les particules de microplastiques dans le tube digestif sont indiquées par les flèches rouges	26
Figure 10: Moyenne \pm erreur standard du nombre de particules ingérées par les larves à 7 jpf (n=7) - les lettres abc indiquent le degré de significativité dans chaque traitement	26
Figure 11: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (ef1 α) à 7 jpf (n=3) – les lettres abc indique le degré de significativité de chaque traitement	28
Figure 12: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (ef1 α) après le challenge bactérien (n=3) - les lettres abc indique le degré de significativité de chaque traitement	29

I Contexte général

Le plastique a commencé sa production massive au cours de l'année 1950 (Unep, 2016). Des auteurs ont pu démontrer que sa production augmentait de 5% par an (Andrady & Neal, 2009), et si la situation ne change pas, nous atteindrons les barres de 2000 millions de tonnes par an d'ici 2050 (Unep, 2016). Le plastique, de par son caractère : solide, léger, durable, et peu cher à produire (Laist, 1987), est devenu rapidement un élément indispensable à la vie quotidienne. Sur certains aspects, il est même irremplaçable (conservation et transport de nourriture et de l'eau, ou comme barrière contre les agents altérants et pathogènes) (Andrady & Neal, 2009). De ce fait, il est si utile pour l'homme que les effets de son accumulation dans l'environnement ont été longtemps négligés (Goldberg, 1995). D'ailleurs, le danger associé à la pollution plastique n'a été levé que cinquante ans après son début de production (Stefatos et al., 1999).

Conscient de ce problème, la notion de 4 R (Réduire, Recycler, Réutiliser, Récupération d'énergie) a été introduite dans la technique de gestion de déchets plastiques. Ce principe a permis de réduire significativement l'extraction de pétrole dédié à la production de granulés ou pastilles de plastiques vierges, tout en soulageant les déchèteries de l'encombrement des débris plastiques (Hopewell et al., 2009).

Cependant, un autre type de déchets a émergé récemment malgré les systèmes de gestion de déchets déjà en place. Il s'agit du microplastique, des plastiques dont la taille est inférieure à 5 mm (Law & Thompson, 2014). Désormais, les intérêts scientifiques se sont tournés vers ce dernier (Blettler et al., 2018; Law & Thompson, 2014), parce que sa concentration dans l'environnement est en constante augmentation (Barnes et al., 2009).

II Plastique

II.1 Origines du plastique et leur composition

Les plastiques sont des polymères organiques synthétiques (Derraik, 2002). D'ailleurs, l'industrie plastique engage 4 à 5 % de la production mondiale de pétrole (Thompson et al., 2009). Les plus couramment synthétisés sont : les Polypropylènes (PPs), les Polyéthylènes (PEs), les Polyvinyl chlorides (PVCs), les Polystyrènes (PSs), les Polyethylene terephthalates (PETs), les Polyamides, les Résine Polyesters et les fibres de verre, et les celluloses acétates. Ces polymères sont synthétisés à partir de plus petites particules de 1 à 5mm de diamètre, portant aussi le nom de pastilles ou granulés de plastique (Veerasingam et al., 2016).

Les composants principaux du plastique ainsi que leurs usages sont illustrés dans le tableau 1.

Tableau 1: Composition chimique des plastiques

Noms	Densité (Kg.m ⁻³)	Utilisations
Polypropylène (PP)	0,91-0,92	<ul style="list-style-type: none"> - Film d'emballage - Caisses empilables pour les transports et stockages - Bouchons et fermeture pour conteneurs - Bouteilles et récipient à parois mince - Articles ménagers : bols, bouilloires, - Articles personnels, sèche-cheveux...
Polyéthylène (PE)	0,91-0,95	<ul style="list-style-type: none"> - Bouteilles soufflés - Sacs plastiques - Pellicules plastiques - Tuyaux d'irrigation - Verres et revêtements de champ - Isolants des câbles électriques
Polyvinyl chloride (PVC)	1,16-1,30	Dans la construction : <ul style="list-style-type: none"> - Meubles - Tuyauteries - Tapisseries - Film étirable pour le ménage - Diverses applications industrielles
Polystyrène (PS)	1,04-1,09	Isolent moyen Matériel d'emballage de protection modulable
Polyethylene terephthalate (PET)	1,34-1,39	<ul style="list-style-type: none"> - Remplacement de verre glace, bouteilles de verre - Bouteille d'oxygène résistante aux UV (ultraviolets)
Polyamide ou Nylon	1,13-1,15	<ul style="list-style-type: none"> - Filets de pêche - Cordes
Résine Polyester + Fibre de verre	>1,35	<ul style="list-style-type: none"> - Bateaux - Textiles
Cellulose acetate	1,22-1,24	- Filtre de cigarettes
Eau pur	1,000	
Eau de mer	1,027	

Source : (Andrady & Neal, 2009; Gesamp, 2016)

II.2 Additifs sur les plastiques

La plupart des plastiques sont associés à des additifs pour améliorer leur propriété par rapport à la flexibilité, à la résistance aux rayons ultra-violet, pour éviter le changement de couleur ou pour résister à une température élevée. Dans certains cas, les additifs sont utilisés comme opacifiant ou colorant (Andrady & Neal, 2009).

Les principaux additifs sont illustrés dans le tableau 2.

Tableau 2: Principaux additifs

Noms	Utilisation
Dibutyl phthalate (DBP)	- Anti-fissures des vernis à ongles
Diethyl phthalate (DEP)	- Adoucisseur de peau - Fixateur de parfums et de couleurs
Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	- Plastifiant sur le PVC
Hexabromocyclododecane (HBCD)	- Retardateur de flammes
Polybromé diphenyl ethers (penta, octa & deca forms) nonyphenol (PBDE)	- Retardateur de flammes - Stabilisateur sur le PPs et PSs
Phthalates esters (Phthalates)	- Améliore la flexibilité et durabilité

Source : (Gesamp, 2016)

II.3 Principales sources de déchets plastiques

Les déchets plastiques sont liés à l'activité anthropique. Ils proviennent essentiellement des systèmes de recyclage inadaptés ou des comportements impropres de l'homme (Barnes et al., 2009). Ces plastiques sont ensuite transportés par les systèmes d'évacuation pour finir dans l'environnement aquatique (Lac, rivière, mers, océans) (Williamst & Simmons, 1997).

II.3.1 Activités terrestres

Les déchets plastiques terrestres sont surtout composés par des emballages, des articles ménagers, des biens de consommation, et des matériaux de conservation des denrées alimentaires issus des ménages, des vendeurs détaillants ou des industries du tourisme (Unep, 2016). Par ailleurs, il y a aussi les tuyaux d'irrigation et les matériaux utilisés en agriculture et dans les industries de construction (Kohler et al., 2005).

En outre, les plastiques vierges qui sont les matières premières utilisées pour la fabrication des matériaux plastiques (les pastilles et les microbilles) sont aussi retrouvés dans l'environnement (Veerasingam et al., 2016). Ils sont émis par déversement accidentel durant leurs transports marins ou terrestres (Turner & Holmes, 2011). Ces pastilles sont les plus sujettes à la dégradation une fois dans l'environnement, et contribuent énormément par la même occasion à l'émission de microplastiques (Veerasingam et al., 2016).

II.3.2 Activités aquatiques

Les activités marines (Pêche et Aquaculture) sont aussi responsables de la pollution plastique surtout dans l'écosystème marin. D'ailleurs, 76% des plastiques trouvés en mer sont issus des matériels de pêches (les cordes, les flotteurs, les fils de pêche et les cordes au sol) (Derraik, 2002). Les polymères les plus utilisés sont ceux issus du polyamide (PA) ou nylon (Bergmann et al., 2015). D'une autre part, les bateaux commerciaux et les bateaux de croisières qui se

comportent comme des villes flottantes ajoutent aussi une part non négligeable des débris plastiques dans l'océan (Derraik, 2002).

III Microplastiques

Les microplastiques sont des particules de plastiques ayant une taille inférieure à 2mm entre ses 2 extrémités la plus longue (Costa et al., 2010), certains auteurs associent aussi dans le rang de microplastiques les polymères ayant une taille inférieure à 5 mm (Ryan et al., 2009). En outre, Blair et al., (2017) ont distingué les microplastiques comme les débris plastiques ayant une taille variant de 100 nm à 5 mm. Les intentions se sont tournées vers ces microplastiques récemment parce que les analyses de données compilées ont indiqué l'augmentation alarmante de leur concentration dans l'environnement (Barnes et al., 2009; Blettler et al., 2018).

III.1 Microplastiques sources, distribution et concentration dans l'environnement aquatique

III.1.1 Sources de microplastiques

Les microplastiques peuvent être classés dans deux grandes catégories.

III.1.1.1 Microplastique primaire

[Les microplastiques primaires sont des plastiques manufacturés pour avoir des tailles microscopiques dans leur utilisation] note de traduction Cole et al., (2011), comme l'exemple des granulés et les microbilles (PP, PE, PS). Ils sont surtout utilisés dans le monde du cosmétique (nettoyant de peau et visage (polyéthylènes et polypropylènes granulés <5 mm)), la technologie de sablage (utilisation d'acrylique, mélamine ou polyester (0,25 - 1,7 mm) (Cole et al., 2011), la médecine humaine comme vecteur de médicament, et la médecine dentaire comme nettoyant, et aussi utilisé comme exfoliant épurateur des mains et des visages (Sharma & Chatterjee, 2017). A part ces utilisations quotidiennes, les microplastiques sont aussi manufacturés pour être les matières premières à destinée des industries de fabrication de matériaux plastiques (Sharma & Chatterjee, 2017).

III.1.1.2 Microplastique secondaire

Les microplastiques secondaires sont le résultat de la dégradation des débris plastiques de plus grande taille (Ryan et al., 2009; Thompson, 2004). Ils sont composés surtout d'acrylique, d'alkyde, de polyéthylène-propylène, de polyamide, de polyester, de polyéthylène, et de polyvinyl alcool (Thompson, 2004) qui donne naissance aux fragments et les fibres de microplastiques. Outre cela, les eaux usées venant des industries textiles et les lavoirs sont aussi classés comme sources de microplastiques (Polyester, fibre acrylique) (Browne et al., 2011).

III.1.2 Distribution et concentration

Les principaux points d'entrée des microplastiques dans l'environnement aquatique sont les eaux usées et les eaux pluviales (Bergmann et al., 2015). Une fois dans l'environnement, leur répartition dépend principalement de la force du vent, la circulation géostrophique, les vagues dominantes et leurs densités comparées à celle de l'eau (Eerkes-Medrano et al., 2015). Les microplastiques peuvent flotter en surface ou dans la colonne, ou directement coloniser les fonds aquatiques selon leur densité (Eerkes-Medrano et al., 2015). Cette omniprésence du microplastique a suscité plusieurs études à quantifier leur concentration dans l'environnement.

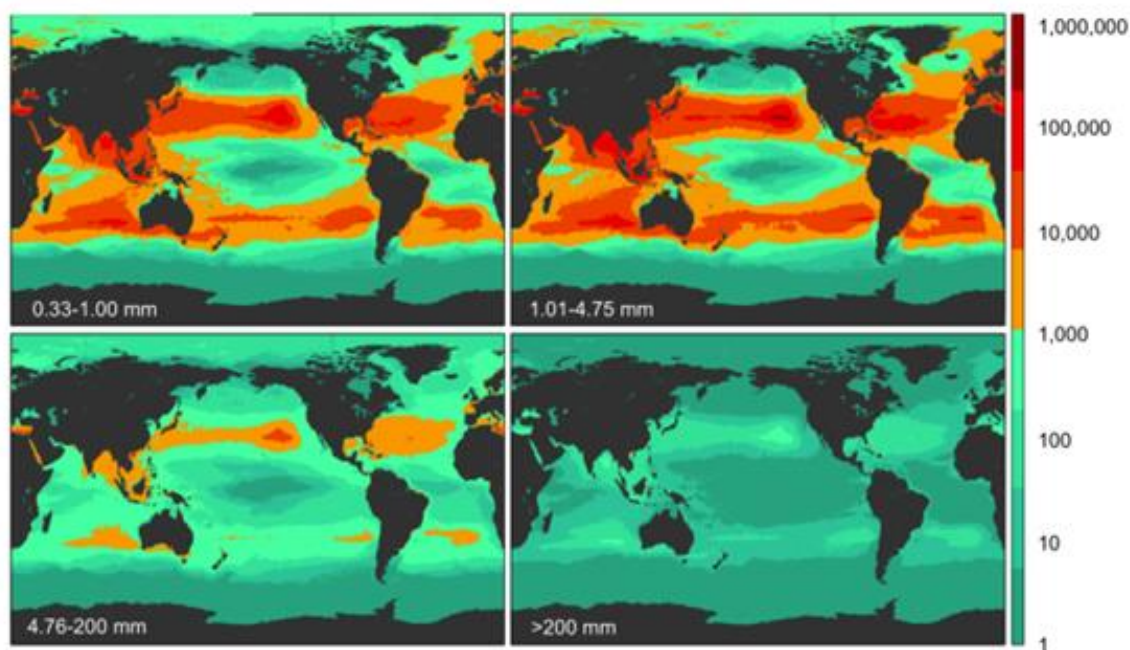
Le tableau 3 nous illustre les différentes concentrations que nous pouvons rencontrer dans l'environnement. Par ailleurs, dans les océans, ce sont surtout les particules de très petites tailles (0,33-1,00 mm, 1,01-4,75 mm) qui ont la concentration la plus élevée, variant de 1000 à 100 000 particules/km² (figure 1).

Tableau 3: Concentration en microplastiques dans la colonne d'eau

Zone d'étude	Concentration dans la colonne d'eau	Source bibliographique
Le Lac taihu en Chine	3,4 - 25,8 particules/l	(Horton et al., 2017)
Le Lac Hovsgol en Mongolie	0,00012 particules/l	(Horton et al., 2017)
Les grands lacs des Etats unis	0,00027 particules/l	(Horton et al., 2017)
Le lac Chiusi en Italie	0,03 particules/l	(Horton et al., 2017)
La Seine en zone urbain (Paris – France)	0,03 particules/l * 0,00035 particules/l **	(Horton et al., 2017)
Des rivières en Suisse	0,007 particules/l	(Horton et al., 2017)
Le Danube en Autriche	0,32 particules/l	(Horton et al., 2017)
Le Rhin sur plusieurs points d'échantillonnage	0,005 particules/l	(Horton et al., 2017)
Océan Atlantique Nord-Est	2,46 particules/m ³	(Auta et al., 2017)
Eau polaire d'Arctique	0 à 1,31 particules/m ³	(Auta et al., 2017)
Mer Méditerranée	0,90 ± 0,10 microplastiques/g	(Auta et al., 2017)
Estuaire de la rivière Yangtze en Chine	0 à 144 particules/m ³	(Auta et al., 2017)

* Échantillonnage effectué avec un chalut à plancton

** Échantillonnage effectué avec un chalut manta



Source : Eriksen et al., (2014)

Figure 1: Modèle de prédiction de la densité des microplastiques (particules/km²) pour chaque classe (0,33-1,00 mm, 1,01-4,75 mm, 4,76-200 mm, et >200 mm)

III.1.3 Interaction entre les microplastiques et l'environnement aquatique

Les microplastiques sont omniprésents dans l'environnement aquatique. Leurs couleurs et leurs densités les rendent biodisponibles pour les organismes (Wright et al., 2013). D'ailleurs, ils sont ingérés volontairement par une diversité d'organismes (Eerkes-Medrano et al., 2015; Wright et al., 2013), à défaut de les associer à des nourritures naturelles ou être mélangés à forte concentration avec ces dernières (Bergmann et al., 2015). De plus, les microplastiques ingérés peuvent être transférés d'un niveau trophique à un autre (entre prédateurs et proies) (Farrell & Nelson, 2013). Chez le poisson, Lusher et al., (2013) ont observé que 92% de plastiques ingérés sont des microplastiques, caractérisés par les polymères semi-synthétiques, les polyamides, les polyester ou les polystyrènes. Les poissons destinés à la commercialisation en contiennent aussi avec une concentration variant de 1 à 1,75 particule (taille variant de 0,38 à 3,1 mm) par poisson (Bellas et al., 2016). Ainsi, les microplastiques, via leur ingestion, sont susceptibles d'atteindre tous les niveaux trophiques des organismes aquatiques, d'où l'intérêt d'étudier les effets de leur présence dans le tube digestif.

III.2 Effets directs de l'ingestion de microplastiques

Contrairement aux mésoplastiques et aux macroplastiques, les effets de l'ingestion de microplastiques ne sont pas encore bien compris (Bergmann et al., 2015; Lusher et al., 2013). Conscient de la présence de microplastiques dans l'environnement aquatique et leur ingestion par les organismes, le monde scientifique s'est d'abord penché sur leurs impacts physiques sur le tube digestif (Eerkes-Medrano et al., 2015). Mais déjà, les résultats des recherches ont été limités dans leur reproductibilité *in situ*, faute de l'insuffisance de données sur la concentration des microplastiques dans l'environnement, surtout les particules inférieures à 50 μ m (Ribeiro et al., 2017). Cependant, cela n'empêche qu'en jouant sur les facteurs de biodisponibilité (taille,

densité, couleur, concentration et durée d'exposition en microplastique, et biologie et comportement de l'animal ciblé) (Walkinshaw et al., 2020), beaucoup de résultats ont donné des avancées indispensables. Les études se sont ainsi focalisées d'une part sur la destinée de ces microplastiques dans l'organisme, et d'autre part sur les réponses cellulaires combinées avec les effets de leur présence dans l'organisme.

III.2.1 Destinée des microplastiques ingérés dans l'organisme

Le tableau 4 nous résume les destinations probables des microplastiques dans l'organisme suite à leur ingestion.

Tableau 4 : Ingestion des microplastiques par les organismes aquatiques

Espèces	Type de microplastiques et concentration utilisée	Temps d'exposition	Destinée des microplastiques	Références bibliographiques
Zooplanctons (copépodes, larve de bivalve, larve de décapodes)	PE fluorescent (7,3 µm et 30,6 µm de diamètre) à une concentration de 3000 grains/ml (7,3 µm) et 635 grains/ml (30,6 µm)	24h	Ingéré et retrouvé dans le tube digestif	(Cole et al., 2013)
Holothuries (<i>T. gemmata</i>)	PVC de 0,25 mm et 15 mm de diamètre ; Nylon de 0,25 mm de diamètre et 0,25 mm - 1,5 mm de longueur, et des granulé de PVC 4,0 mm à une concentration de 2 g à 65 g dans 600ml de sédiment	4h	Ingéré et retrouvé dans le tube digestif	(Graham & Thompson, 2009)
Décapodes (<i>Nephrops</i>)	PE de taille 5 mm ensemencés sur des poissons	24h	Ingéré et accumulé dans le tube digestif	(Murray & Cowie, 2011)
Moules (<i>Mytilus edulis</i> de 3 cm à 4 cm de taille)	PS de 3,0 et 9,9 µm de diamètre à une concentration de 15000 particules dans 50ml d'eau	3 jours	Ingéré et traverse la barrière intestinale pour se retrouver dans l'hémolymphe	(Browne et al., 2008)
Moules (<i>Mytilus edulis</i>) et des crabes (<i>Carcinus maenas</i>)	PS fluorescent de 0,5 µm de diamètre à une concentration de 50 µl/400 ml d'eau	1h d'exposition aux MPs pour les moules et 30 mn d'exposition aux moules contaminées pour les crabes	Transmis vers un niveau trophique supérieur et accumulé dans leur hémolymphe à après 24h post ingestion *	(Farrell & Nelson, 2013)

* Ingestion de microplastique par les moules et transfert vers les crabes suite à leur ingestion des moules contaminés

III.2.2 Réponses cellulaires et effets de la présence de microplastiques dans l'organisme

Le fait de seulement démontrer que les microplastiques peuvent s'accumuler dans le tube digestif ou être transférés dans l'hémolymphe ou encore vers un niveau trophique supérieur n'est pas suffisant pour s'alarmer de ses potentiels effets. Des études plus poussées ont été effectuées pour connaître les réponses cellulaires et les effets de leur présence. Dans ce cas, von Moos et al., (2012), suite à une exposition courte (96 h) sur les moules (*Mytilus edulis*) au HDPE (Polyéthylène de haute densité) (de taille comprise entre 0 et 80 µm) à une concentration de 2,5 g/l, ont pu mettre en évidence des réponses cellulaires après l'ingestion de microplastique. Les réponses se sont manifestées par une formation de granulome au niveau du tissu épithélial du tube digestif, suivi d'une déstabilisation des membranes lysosomales. Cependant, le temps d'exposition n'était pas assez long et n'a pas permis d'observer des effets sur la survie de l'animal. Par contre, Wright et al., (2013), en procédant avec une durée d'exposition plus longue (4 semaines) sur des vers marins (*A. marina*) exposés à l'UPVC (PVC non plastifié) (130 µm de diamètre) à une concentration de 1 % et 5 % de la biomasse, ont trouvé que la présence de microplastiques a réduit significativement la capacité d'ingestion de l'animal. Et aussi, ils ont provoqué des réponses inflammatoires caractérisées par l'augmentation significative des activités phagocytaires dans le tube digestif. Tout cela a mené à la réduction des réserves énergétiques pouvant affecter le fitness de l'animal. Dans cette même optique, Sussarellu et al., (2016), dans leur essai sur des huitres adultes en phase de maturité sexuelle (18 mois, 16,9 g) exposés au PS fluorescent (de taille de 2 µm et de 6 µm) à une concentration de 0,023 mg/l pendant 2 mois, ont pu démontrer que l'exposition a réduit significativement la fertilité ainsi que la taille des œufs et a induit un effet négatif sur la croissance des progénitures. Par ailleurs, ils ont aussi effectué des analyses transcriptomiques¹ qui ont montré une augmentation significative des ARNm codant pour le glucocorticoïde, qui est une hormone impliquée suite à une réponse au stress. Leur analyse de la dynamique de l'énergie a permis de conclure que la majorité de l'énergie était allouée à l'entretien et la croissance, au détriment de la reproduction.

En se référant à ces auteurs, il est évident d'affirmer que la durée d'exposition est un facteur important pour mettre en évidence les effets du microplastique sur le fitness² de l'animal. Cependant, Mazurais et al., (2015), en exposant des larves de loups de mer (*Anarhichas lupus*) au PE (10-45 µm) intégrés dans l'aliment à une dose de 1,2 et 12 mg par gramme pendant 43 jours (3^e jour post éclosion à 43^e jour post éclosion), n'ont pas mis en évidence des signes d'inflammation dans le tube digestif, ni des effets négatifs sur la croissance, et seulement un effet léger sur la mortalité. Cependant, ils ont quand même pu observer une l'accumulation de microplastiques par ces larves malgré le rapide transit dans l'intestin. Ainsi, l'auteur a bien souligné que des études plus approfondies sont nécessaires sur la toxicité des microplastiques en les essayant sur plusieurs espèces et sous différentes forme et taille.

¹ **transcriptomiques** est l'étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription d'un génome (Wikipédia)

² **fitness** est l'aptitude à la survie des êtres vivants, y compris en environnement non favorable demandant des efforts ou des adaptations (aquaportail.com)

IV Poisson zèbre

Après différentes expérimentations sur plusieurs espèces, les potentiels effets du microplastique ne pouvaient pas être généralisés. Vu l'intention surtout portée sur les animaux filtreurs, les effets du microplastique sur les vertébrés aquatiques et les poissons n'étaient pas mis en avant (LeMoine et al., 2018). Cependant, la présence de microplastique dans les tubes digestifs des poissons est aussi prouvée (Bergmann et al., 2015). Compte tenu de tout cela, une tendance était née sur l'utilisation d'un animal de laboratoire modèle qui est le poisson zèbre (*Danio rerio*). Il s'agit d'un poisson d'eau continentale, mais ses atouts dans l'expérimentation lui ont permis d'être la référence. Par ailleurs, la concentration de microplastiques dans l'écosystème d'eau continentale est plus élevée comparée à celle de l'écosystème marin (Horton et al., 2017), encore une raison de plus pour justifier le choix du poisson zèbre comme animal d'essai pour l'étude de la toxicité du microplastique.

Le poisson zèbre est devenu un animal de laboratoire parce que, d'une part, son coût d'élevage en laboratoire est largement plus faible que celui des rongeurs (Spitsbergen & Kent, 2007). De plus, son mode d'élevage et de reproduction est déjà maîtrisé (Lawrence, 2007). D'une autre part, sa fertilité élevée permet d'écarter les effets de la diversité génétique dans une étude (Stephens et al., 2016). Du point de vue anatomique, les œufs et les larves sont transparents, facilitant leur observation et manipulation (Spitsbergen & Kent, 2007). Par ailleurs, la maturation sexuelle est très courte (3 mois), permettant l'obtention de plusieurs générations en une très courte période (Spitsbergen & Kent, 2007). En outre, les poissons zèbres ont des similarités génétiques, anatomiques et physiologiques importantes avec les mammifères (Tanguay, 2018). D'ailleurs, 70% des gènes humains possèdent au moins un gène orthologue du poisson zèbre (Howe et al., 2013).

Outre cela, le poisson zèbre est devenu un modèle en toxicologie grâce à sa particularité à être très sensible aux différents polluants dans l'environnement (Dai et al., 2014). En plus, la richesse de ses bases de données génomiques (Howe et al., 2012; Spitsbergen & Kent, 2007) facilite les approches génomiques, protéomiques³ et transcriptomiques dans les études de toxicité d'un polluant, tant sur le développement embryonnaire jusqu'à l'éclosion que sur le stade adulte (Dai et al., 2014)

IV.1 Description du poisson zèbre

IV.1.1 Taxonomie

Selon Rowena Spence et al., (2007) le poisson zèbre fait partie de la Famille (Cyprinidae) - Sous-famille : (Danioninae) - Espèce : *Danio rerio* (Hamilton, 1822) . Il est caractérisé par sa petite taille (longueur < 120 mm) et l'alternance de stries horizontales de couleur sombre et claire sur son corps.

IV.1.2 Reproduction et croissance

Le poisson zèbre est une espèce ovipare (Rowena Spence et al., 2007). La femelle a une reproduction annuelle dans son environnement naturel, se situant au début de la mousson (Kalueff & Cachat, 2011). En captivité, elle devient asynchrone et la ponte peut se faire tous

³ **protéomique** désigne la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organite, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un moment donné et sous des conditions données (Wikipédia)

les 2 à 3 jours (Rowena Spence et al., 2007) variant avec l'âge de l'animal. La maturité sexuelle varie entre 3 à 4 mois (Rowena Spence et al., 2007). Cette maturité sexuelle est surtout dépendante de la condition du milieu, et de la taille de l'animal. À 25°C, les poissons de laboratoire peuvent être mature à 75 jours post éclosion avec une taille de 24,9 mm pour la femelle et 23,1 mm pour le mâle (Kalueff & Cachat, 2011). L'intervalle de ponte d'un couple est de 1,5 jour, avec une moyenne variant de 158-195 œufs par ponte (Kalueff & Cachat, 2011). Les pontes des femelles sont provoquées par la présence des mâles qui sont plus ou moins territoriaux. La ponte sur substrat gravier est la préférée des femelles dans l'environnement (Rowena Spence et al., 2007).

L'éclosion s'effectue 48 à 72 hpf (heure post fécondation) (Kalueff & Cachat, 2011) et les larves sont déjà de grande taille (3 mm). [le développement des œufs sont très rapides, les larves sont déjà à la recherche de nourriture et ont des réflexes de fuite à après 5jpf (jours post fécondation)] note de traduction Kimmel et al., (1995). Les larves connaissent un développement rapide dans les 3 premiers mois de sa vie, et après la croissance diminue jusqu'à plus ou moins s'arrêter au 18^e mois. Les souches de laboratoire ont une meilleure performance de croissance comparées aux souches sauvages (soit 183 mm/an comparé à 72 mm/an durant les deux premiers mois) (Kalueff & Cachat, 2011). La taille maximale observée des adultes est de 35 mm et la durée de vie moyenne des spécimens domestiqués est environ 42 mois (R. Spence et al., 2007).

IV.1.3 Écologie et comportement nutritionnel

Selon la description de R. Spence et al., (2007), les poissons zèbres sont des poissons d'eau douce, originaire de l'Asie centrale (Nord-est de l'Inde, Népal et Bangladesh). Ils sont résistants à de larges gammes de température (5°C à 34°C). Son principal habitat est dans les eaux stagnantes, surtout dans les rizières. Ils occupent toute la colonne d'eau, et passent la majorité de leur temps dans les eaux bordées de végétations aquatiques. Ils ont aussi la particularité de nager en banc. Cette technique de nage est leur moyen de défense face au prédateur.

Du point de vue nutritionnel, les poissons zèbres sont omnivores. Ils consomment une large variété d'espèces, surtout des zooplanctons, des larves d'insectes aquatiques (diptères, hemiptères, hymenoptère, coléoptères), des larves d'insectes terrestres (arachnides), des phytoplanctons et des algues filamenteuses, des plantes aquatiques et des œufs de cladocères (R. Spence et al., 2007). Ils se nourrissent surtout dans la colonne d'eau, mais aussi à la surface de l'eau (R. Spence et al., 2007).

IV.2 Études de la toxicité du microplastique sur le poisson zèbre adulte

L'approche était identique à celle effectuée aux autres espèces. Plusieurs études se sont d'abord orientées vers la mise en évidence de l'ingestion et l'accumulation du microplastique en jouant sur les facteurs de biodisponibilité, et s'en suivent les études des effets de leur accumulation dans l'organisme.

IV.2.1 Destinée du microplastique dans l'organisme

D'après Kim et al., (2019), les microplastiques peuvent être reconnus comme des particules non comestibles par les poissons zèbres. Pourtant, quand ils sont mélangés avec des aliments, cette capacité de distinction diminue, et leur accumulation dans le tube digestif augmente significativement. Ainsi, l'ingestion de microplastiques dépend principalement de ce rapport aliment/microplastiques distribués. En plus du fait d'être ingéré, Lu et al., (2016) ont aussi évalué leurs destinations. Ce faisant, ils ont exposé des poissons zèbres adultes à des polystyrènes fluorescents (5 µm et 20 µm) à une concentration 20 mg/l. Suite à des observations avec spectrophotomètre, ils ont mis en évidence que les microplastiques sont accumulés dans les branchies, l'intestin et le foie après 7 jours d'exposition. Les microplastiques de 5 µm sont observés dans le foie, branchie et intestin, alors que ceux de 20µm se sont seulement retrouvés dans l'intestin et branchie. Donc, en fonction de leur taille, les microplastiques peuvent entrer dans le système circulatoire et se retrouver dans le foie.

IV.2.2 Réponses cellulaires et atteintes causées par la présence de microplastique dans l'organisme

Le fait de connaître les destinées microplastiques ont incité les analyses sur les réponses de l'organisme et les atteintes causées par leur présence.

Selon Jin et al., (2018), l'exposition des adultes de poisson zèbre (6 mois) à des PS sphérique (0,5 et 50 µm) à une concentration de 100 et 1000 µg/l pendant 14 jours, peut provoquer une sur-excrétion de mucus dans l'intestin qui s'associe avec un déséquilibre du microbiote intestinal. Par ailleurs, Lei et al., (2018) ont pu mettre en évidence que la nature des microplastiques importe peu sur leur capacité à causer des effets. C'est leur habilité à être biodisponible et être accumulé dans l'intestin qui est le facteur déterminant. En utilisant différents microplastiques (PA, PE, PP, PVC, PS) à différente taille (0,1 – 1,0 – 5,0 µm), ils ont démontré que les microplastiques peuvent causer des lésions au niveau des tissus intestinaux (inflammation, destruction des entérocytes, destruction des structures des tissus). Les poissons morts durant leur expérimentation ont présenté des ventres gonflés dus à une forte accumulation de microplastiques. Pourtant, la présence de microplastiques dans le tube digestif n'a pas apporté pas de différence significative sur la survie des animaux durant la durée d'exposition (10 jours).

D'une autre part, Qiao, Sheng, et al., (2019) en adoptant des approches pas seulement au niveau cellulaire, mais aussi au niveau moléculaire ont réussi à préciser les effets du microplastique. Ils ont exposé des poissons zèbres adultes (5 mois) à une concentration de PS (taille 5 µm) 50 µg/l et 500 µg/l pendant 21 jours. Comme résultats : d'abord, les analyses histologiques ont montré des atteintes significatives au niveau des tissus intestinaux. Et ensuite, l'activité des enzymes (*cat* (catalase) et *sod* (superoxyde dismutase)) a été significativement élevée par rapport au contrôle, confirmant la réponse au stress oxydatif causé par la présence de microplastiques. Par contre l'activité de la *dao* (Diamine oxydase) a diminué, indiquant une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale. En outre, les analyses métabolomiques⁴ ont montré des changements de profil des métabolites intestinaux. Et enfin, la perturbation de la structure du

⁴ **métabolomique** est une science très récente qui étudie l'ensemble des métabolites primaires (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) présents dans une cellule, un organe, un organisme (Wikipédia)

microbiote intestinal ⁵a été aussi perçue par séquençage d'ADN contenu dans les tubes digestifs. Ils ont observé une tendance à la réduction de la diversité du microbiote intestinal. Une perturbation qui est probablement causée par l'inflammation des tissus intestinaux.

À côté de cela, Qiao, Deng, et al., (2019) ont aussi trouvé que la forme de microplastiques joue un facteur déterminant pour leur toxicité. En faisant l'expérimentation sur plusieurs formes de microplastiques (fibres, fragments, granulés), ils ont pu déterminer que les fibres de microplastique sont capables de provoquer des plus importants effets comparés aux autres formes de microplastiques. D'ailleurs, ces derniers sont largement accumulés dans le tube digestif comparé aux autres, avec une concentration de 8 µg/mg⁶, alors que c'est seulement 1,7 µg/mg et 0,5 µg/mg pour les fragments et les granulés.

De même, Limonta et al., (2019) ont trouvé des résultats intéressants en exposant des poissons zèbre adultes à des concentrations proches de celle trouvée dans l'environnement (100 et 1000 µg/l) avec des microplastiques (PE et PS) de taille irrégulière (90% <90 µm, 50% <50 µm, 10% < 25 µm) pendant 20 jours. Outre le fait que les microplastiques ont provoqué des lésions sur la paroi intestinale, ils ont aussi réussi à démontrer que ces derniers ont favorisé la perméabilité de la barrière intestinale rendant les sujets plus exposés aux agents pathogènes. D'une autre part, les analyses transcriptomiques combinés ont déduit que les microplastiques ont causé une dérégulation de l'expression des gènes impliqués à la réponse immunitaire, en l'occurrence, l'augmentation significatif du *cmhII*, des cellules présentatrice d'antigène (*cd74a*) et de l'activation des lymphocytes (*ccr7*), ou la diminution significative des gènes impliqués à la réponse antimicrobienne (*marco*) et antiviraux (*ift8*). Par ailleurs, les gènes impliqués au métabolisme lipidique ont été aussi perturbés par l'exposition. Ils ont pu observer la diminution significative de l'expression des gènes liés au processus métabolique des stéroïdes et à la biosynthèse des acides gras, ainsi que l'expression des gènes impliqués au stockage des gouttelettes lipidiques (*fitm2*, *gpr84*) menant à la diminution de la production de cholestérol.

IV.3 Études de la toxicité du microplastique pendant les premiers stades de développement des poissons zèbres

Vu l'évidence de ces effets sur le stade adulte, la question s'est aussi posée sur les stades plus jeunes, pendant lesquels les poissons sont plus fragiles (Atherton & McCormick, 2017; Smith & Blumstein, 2008). D'ailleurs, des effets similaires au stade adulte sont aussi rencontrés chez les stades plus jeunes. En voulant les mettre en évidence, Veneman et al., (2017) ont injecté des PS (0,7 µm) dans le sac vitellin des larves à 2 jour post fécondation. Par la suite, au 3^e jour post injection, ils ont pu observer que les microplastiques sont aussi absorbés par les vaisseaux sanguins et distribués dans le corps de l'animal, pour s'accumuler dans les petits vaisseaux. Également, leurs analyses transcriptomiques ont permis de savoir que ces microplastiques dans le sang ont provoqué l'activation des réponses immunitaires ainsi que les voies les gènes impliqués à la réponse au stress oxydative.

Par ailleurs, LeMoine et al., (2018), suite à leur expérimentation ont pu aussi observer l'accumulation de microplastique (PE de taille 10 µm et 45 µm à une concentration de 5 et 20

⁵ **microbiote intestinal** est l'ensemble des microorganismes du tube digestif (Wikipédia)

⁶ Microgramme de microplastiques par milligramme de contenus intestinaux des poissons

mg/l) dans l'estomac des larves de poisson zèbre. L'accumulation débute à 5 jours post fécondation, âge auquel le poisson commence à se nourrir des aliments exogènes. Cependant, cette accumulation n'augmente pas proportionnellement avec la durée d'exposition, grâce à leur capacité d'élimination fécale. Malgré cette accumulation, aucun effet sur la croissance et la survie n'a été mis en évidence durant la période d'exposition (5 à 19 jours post fécondation). En outre, les analyses transcriptomiques ont montré des modifications de l'expression des gènes liés aux multiples processus de développement et de croissance, à savoir la diminution de l'expression des gènes impliqués au développement cérébral, le développement de la tête et des organes sensoriels, ceux liés à différentes voies métaboliques de l'animal, en l'occurrence, la diminution de l'expression des gènes impliqués à la voie glycolytique (hexokinase, pyruvate kinase...), ou encore le métabolisme de la purine (adenylate cyclase) et de la lysine (*ash1*).

D'une autre part, Qiang & Cheng, (2019) ont mené une expérimentation sur les embryons et larves de poisson zèbre, pour les exposer à une concentration de microplastiques (PE de taille 1 μm et de densité 1,05 g/m^3) à 0-100-1000 $\mu\text{g/l}$ de 4 à 120 heures post fécondation. Par la suite, ils ont mis en évidence que l'exposition à des microplastiques à partir de 100 μl affecte significativement la capacité de nage et la réactivité des poissons. D'autre part, une augmentation significative des gènes associés à l'inflammation (*il1 β*) et aux réponses dues au stress oxydatif (*cat*) ont été aussi observés.

Enfin, Wan et al., (2019) sont parmi les premiers chercheurs qui ont approfondi les potentiels effets des microplastiques sur le microbiote intestinal des premiers stades développement des poissons zèbres. Ils ont exposé des larves au PS sphérique (de taille 5 et 50 μm) à des concentrations de 0-100-1000 $\mu\text{g/l}$ de 2 heure post fécondation à 7 jours post fécondation. Comme résultats, ils ont mis en évidence suite à des extractions et séquençages d'ADN que l'exposition a complètement changé la composition du microbiote intestinal. Après des analyses métabolomiques, ils ont observé que les sujets exposés aux microplastiques ont présenté des changements dans leur profil métabolomique, les changements sont surtout observés dans les métabolites liés au métabolisme énergétique, le métabolisme glycolipidique, et les réponses inflammatoires et neurotoxiques. Au niveau transcriptomique, ce changement du profil métabolomique lié au métabolisme énergétique et glycolipidique a été expliqué par la diminution de l'expression de l'ARNm du pyruvate kinase (*pk*) et l'hexokinase (*hk1*) qui sont les premières étapes dans le métabolisme des glucoses. En plus, concernant le métabolisme lipidique, ils ont observé une diminution significative de l'expression de l'ARNm de l'acyl-CoA oxydase (*aco*) un enzyme qui joue un rôle important dans la β -oxydation des chaînes lipidiques. Ceci pour affirmer que les microplastiques à part le fait de provoquer la perturbation du microbiote intestinal, altèrent aussi le métabolisme énergétique de l'animal.

V Problématique et nouvelles hypothèses à vérifier

Les microplastiques sont omniprésents et biodisponibles dans l'écosystème aquatique (Wright et al., 2013). En se basant sur des caractéristiques similaires aux microplastiques trouvés dans l'environnement (tailles, couleurs, formes, densités, concentrations), des expérimentations ont pu mettre en lumière les effets de leur ingestion, tant sur les invertébrés que sur les vertébrés aquatiques (Browne et al., 2008; Cole et al., 2013; Farrell & Nelson, 2013; Mazurais et al., 2015; Ribeiro et al., 2017; Sussarellu et al., 2016; von Moos et al., 2012). D'ailleurs, les essais sur les poissons zèbres ont aussi confirmé ces résultats antérieurs. Les microplastiques ingérés provoquent principalement **un stress oxydatif** (Choi et al., 2018) et associé avec **l'inflammation voire la destruction de la paroi intestinale** (Lei et al., 2018; Limonta et al., 2019), et induisent **les troubles de la réponse immunitaire** à cause de l'augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale (Limonta et al., 2019; Qiao, Deng, et al., 2019; Veneman et al., 2017). Ensuite, s'ajoute à cela **les troubles métaboliques** qui s'associent avec **le déséquilibre du microbiote intestinal** (Jin et al., 2018; Limonta et al., 2019; Wan et al., 2019). Logiquement, ces effets doivent avoir des conséquences considérables sur le fitness de l'animal (la croissance, la survie et la reproduction). Cependant, la plupart des études n'ont pu rien prouver dans ce sens (Kim et al., 2019; Lei et al., 2018; Lu et al., 2016; Mazurais et al., 2015; von Moos et al., 2012) et encore moins chez les premiers stades de développement (LeMoine et al., 2018; Wan et al., 2019) qui sont considérés comme les plus fragiles (Atherton and McCormick, 2017; Smith and Blumstein, 2008). Par conséquent, la nouvelle perspective de plusieurs auteurs s'oriente dorénavant vers la mise en évidence des effets chroniques suite à l'exposition aux microplastiques (LeMoine et al., 2018; Mazurais et al., 2015; Qiang & Cheng, 2019; Wan et al., 2019).

Dans cette même optique, notre étude a été élaborée pour élucider les effets des microplastiques vierges sur les premiers stades de développement des poissons zèbres avant et après l'ouverture de la bouche. En prenant en compte de la biodisponibilité des microplastiques, nous allons vérifier si ces derniers pourraient induire des effets néfastes avant l'ouverture de la bouche des larves. Par la suite, nous allons vérifier les effets de leur ingestion sur le système immunitaire et les différentes voies métaboliques de l'animal.

Ainsi, nous allons vérifier ou confirmer les hypothèses suivantes :

- **Hypothèse 1** : Les microplastiques ayant une taille de 5 μm n'ont aucun effet sur développement larvaire avant l'ouverture de la bouche à 5 jpf.
- **Hypothèse 2** : Les microplastiques sont ingérés par les larves de poisson zèbre dès l'ouverture de la bouche ;
- **Hypothèse 3** : Les microplastiques sont accumulés dans le tube digestif et provoquent la perturbation qui peut porter atteinte à la fragilité du système immunitaire et au métabolisme de l'animal.

VI Matériels et méthodes

VI.1 Caractérisation du microplastique

Les microplastiques utilisés sont des microbilles de polystyrène de 5µm de densité 1,05 g/cm³ (produit n°: 79633, lot n°: BCCC9286, Sigma-Aldrich - Suisse). La calibration des tailles a été respectivement de 5,05±0,16 µm (CV = 3,1%).

VI.2 Étude des effets des microplastiques sur les premiers stades de développement

VI.2.1 Mode d'élevage des animaux, technique de reproduction et démarche expérimentale

Les géniteurs utilisés sont des zebrafish wild type AB (circ) issus de l'élevage du laboratoire URBE. Ils sont maintenus au sein d'un système recirculé (armoire à zebrafish ,techniplast) dans des bassins de 3L à une densité de 15 à 20 individus par bassins. La température moyenne varie autour de 28°C, la conductivité et le pH sont maintenus à 500µS/cm et 7,2 UpH respectivement, et un cycle jour-nuit (14h :10h) est appliqué. Les poissons sont nourris deux fois par jour à satiété apparente avec des larves d'artémias (1 fois par jour) et de l'aliment sec Zm-400 (deux fois par jour). La technique de reproduction appliquée est celle décrite par Lawrence, (2007) en utilisant une cuve de un litre de volume muni d'une grille dans laquelle étaient mis les géniteurs mâles et femelles à un ratio 1:1 , soit deux couples par cuve. Les géniteurs sont introduits dans cette cuve la veille de la reproduction (mâles et femelles séparés), et la ponte et la fertilisation des œufs s'effectuent au matin après la réunification des couples trente minutes avant l'allumage de l'éclairage. À 1 hpf, les œufs sont collectés pour l'expérimentation.

En se basant sur le fait que l'ouverture de la bouche s'effectue à 5 jpf chez les larves des poissons zèbres (Kimmel et al., 1995), nous avons constitué quatre groupes d'individus dans notre expérimentation (figure 2). Le premier était le groupe témoin exposé à 0 µg/l de microplastiques durant toute l'expérimentation, le deuxième groupe a été exposé de 4 hpf à 4 jpf pour connaître si les microplastiques avaient des effets même avant l'ouverture de la bouche de l'animal, le troisième a été exposé de 4 jpf à 7 jpf, pour mettre en évidence les effets des microplastiques après l'ouverture de la bouche, et le quatrième a été exposé de 4 hpf à 7 jpf. À 8 jpf, un challenge bactérien avec la bactérie *Aeromonas salminicida achromogenes* a été réalisé sur chaque groupe avec les larves restantes afin de déterminer l'effet des microplastiques sur les réponses immunitaires. L'eau utilisée durant l'expérimentation était de l'eau du circuit d'élevage des géniteurs, filtrée avec un filtre à 0,2µm. La concentration de microplastiques pour les expositions était de 1000 µg/l soit 14 particules/ µl.

Ainsi, nous avons eu 4 types de traitements (figure 2), à savoir :

- Contrôle : les groupes exposés à 0 µg/l de microplastiques ;
- Traitement A : les groupes exposés de 4 hpf à 4 jpf à des microplastiques à une taille 5 µm et une concentration de 1000 µg/l ;
- Traitement B : les groupes exposés de 4 jpf à 8 jpf à des microplastiques à une taille 5 µm et une concentration de 1000 µg/l ;

- Traitement C : les groupes exposés de 4 hpf à 8 jpf à des microplastiques à une taille 5 μm et une concentration de 1000 $\mu\text{g/l}$.

Trois réplicas (n=3) ont été constitués pour chaque exposition. Pour chaque réplica, 60 œufs ont été incubés dans une boîte de pétri (100 x 15 mm) à un volume standardisé de 20 ml. L'expérimentation s'est effectuée dans un incubateur à 27°C et un cycle jour-nuit (14 h- 10 h). Les œufs et larves morts sont retirés quotidiennement, et le milieu dans chaque réplica changé à hauteur de 50%. Ces changements d'eau ont été réalisés à l'aide d'une balance de précision (Sartorius BP2100 S, max 2100 g d=0,01 g), afin que les volumes remplacés soient exactement identiques, gardant ainsi une même masse avant et après l'intervention pour limiter au maximum les pertes.

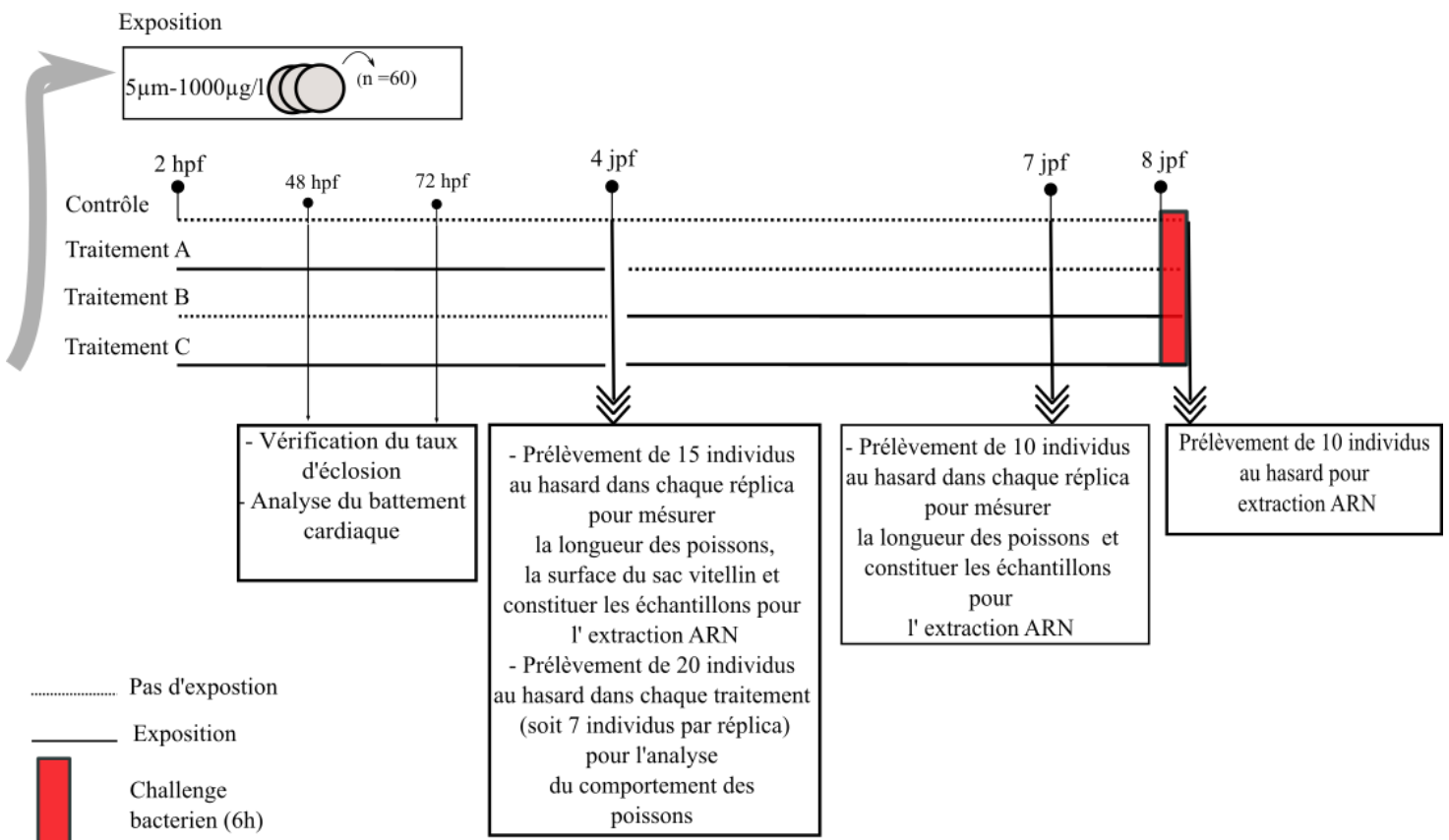


Figure 2: Schéma expérimental

VI.2.2 Solution mère

Pour constituer la solution mère utilisée durant l'expérimentation, 100 μl de la solution stock (10% w/v) a été ajouté dans 200 ml d'eau filtrés à 0,2 μm . Cette solution a été ainsi théoriquement concentrée à 50 000 $\mu\text{g/l}$ soit 727,57 particules/ μl . Ensuite, 1 ml de cette solution a été prélevé et analysé en cytométrie de flux avec un FACS Verse TM (BD Bioscience) pour avoir une estimation du nombre de particules. Après cela, la concentration à 1000 $\mu\text{g/l}$ a été obtenue par dilution sériée de cette solution mère.

VI.2.3 Taux d'éclosion des œufs, fréquences cardiaques, longueur des larves (Protocole OCDE 236)

À 24 hpf, les œufs coagulés ont été comptés et retiré du milieu. La fréquence des battements cardiaques et le taux d'éclosion ont été vérifié dans chaque réplica dès 48 hpf jusqu'à 72 hpf à l'aide d'un stéréomicroscope (Nikon SMZ1270).

À 4 jpf et 7 jpf, 15 et 10 larves ont été respectivement prélevées au hasard dans chaque réplica (soit 45 et 30 individus par traitement) et euthanasiées avec du MS 222 à 200 mg/l. Pour la mesure de leur longueur et la surface du sac vitellin (à 4 jpf), 20 individus par traitement parmi ces larves euthanasiées ont été d'abord photographiés sous un stéréomicroscope (Nikon SMZ1270) et les photos ont été traitées sous ImageJ 1.53a (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) pour obtenir la longueur des larves et la surface du sac vitellin (figure 3). Ensuite, les larves ont été poolé par réplica et conservé à – 80°C pour constituer les échantillons destinés à l'extraction ARN et la Q-PCR.

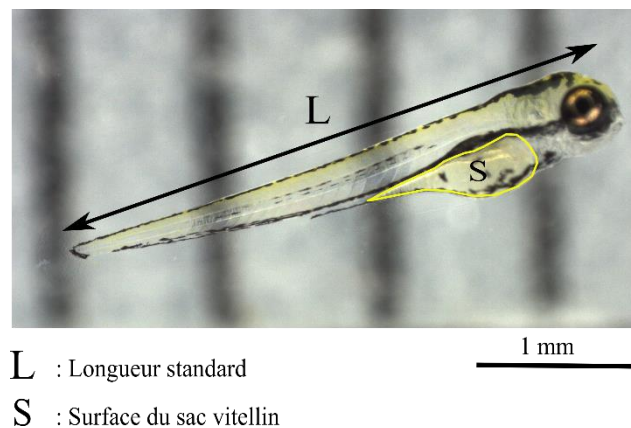


Figure 3: Mesure de la surface du sac vitellin et la longueur des larves avec ImageJ

VI.2.4 Analyses des comportements des animaux et nombres de microplastiques ingérés

Le protocole d'analyse de comportement des larves a été effectué selon Qiang et Cheng, (2019). À 4jpf, 20 poissons par traitement ont été prélevés au hasard pour évaluer leur comportement et leur capacité de nage. Pour se faire, ces larves ont été mises dans des plaques 48 puits contenant 1 ml d'eau identique à celle du réplica dont les larves étaient issues. Après une période d'acclimatation de 10 mn dans l'obscurité, l'activité des larves lors de l'alternance de trois phases jour/nuit (cycles 10 mn lumière et 10 mn obscurité) a été observée sous DanioVision video-track system (Noldus, Netherlands), et par la suite les données ont été traitées dans Ethovision XT 15 software package (Noldus Information Technology, USA) et exporté sous format Excel pour le traitement sous R.

Ces poissons ont été ensuite regroupés dans une boîte de pétri contenant 10 ml de solution pour chaque traitement (figure 4). À 7 jpf, leur comportement et leur capacité de nage ont été analysés à nouveau selon le protocole utilisé à 4 jpf. Par la suite, 7 larves par traitement ont été euthanasiées et observées sous microscope inversé (Axiovert 25 CA Carl Zeiss, Germany) avec un grossissement 32x pour dénombrer les particules ingérées.

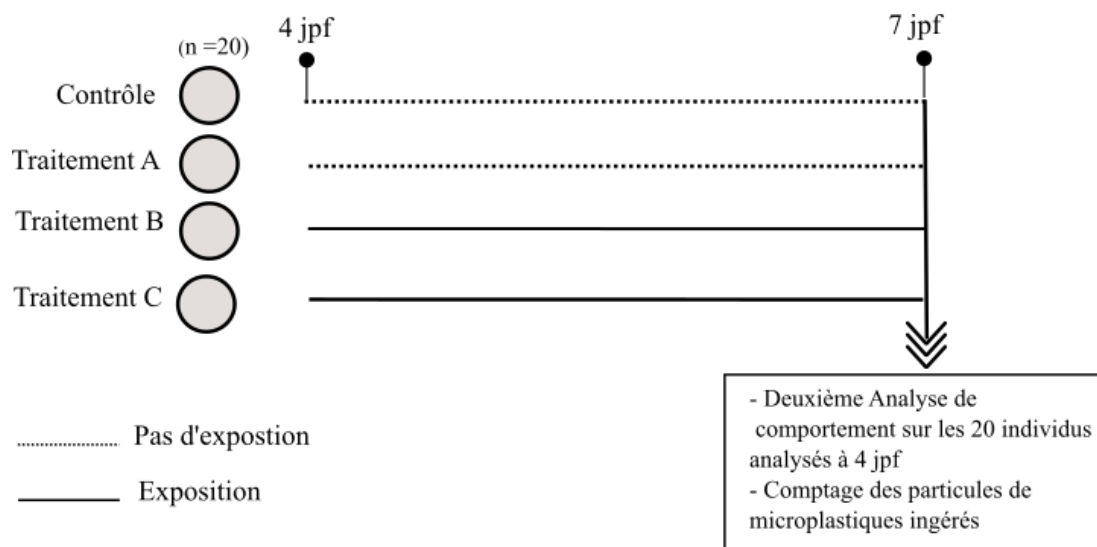


Figure 4: Schéma expérimental après l'analyse de comportement à 4 jpf

VI.2.5 Challenge bactérien

L'infection a été réalisée avec une souche pathogène d'*Aeromonas salmonicida achromogenes*, fournie par le groupe du Centre d'Economie Rurale (CER) (Marloie, Belgique). A partir de plusieurs colonies prélevées sur une gélose de BHI agar (infusion cœur-cerveau), les bactéries ont été cultivées dans un milieu liquide stérile (BHI) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et incubées à 26 °C pendant 18 h. Le jour de l'infection, 200 µl équivalent à $3,1 \times 10^7$ CFU l⁻¹ ont été ajoutés dans chaque boîte de pétri en verre de 20 ml. Après 6 h d'infection par baignoire, les larves ont été euthanasiées avec une surdose de 200 mg l⁻¹ de MS222 puis et des pools de 10 larves par réplica on était formé et stocké au -80°C.

VI.2.6 Extraction d'ARN

Pour l'extraction d'ARN, 500 µl de Trizol reagent a été ajouté dans les tubes ependorf contenant les échantillons (10 larves/tubes). Ensuite, les pools ont été broyés avec des billes de zircon dans une dans un broyeur pendant 2 mn vitesse 12. Après cela, l'homogénat a été laissée à température ambiante pendant 5 mn. Puis, 50 µl de Bromo -3 – chloropropane a été ajouté dans chaque tube, et le mélange a été vorté pendant 15 secondes. À ce stade, la séparation des deux phases (phase aqueuse et phase phénolique) commence a été visible. Par la suite les échantillons ont été centrifugés à 4°C à 12000 g pendant 15 mn pour séparer la phase aqueuse (en dessus) de la phase phénolique (en dessous). Après la centrifugation, la phase aqueuse contenant l'ARN a été prélevée minutieusement sans perturber l'interface et ajoutée à 250 µl de solution d'isopropanol et glycolblue (78µl de glycolblue et 13ml d'isopropanol). Après un temps de réaction de 5 mn, la solution d'isopropanol induit la précipitation de l'ARN et suite au passage dans la centrifugation à 12 000 g à 4°C pendant 10mn, un culot bleu est visible. Le surnageant a été éliminé et le précipité d'ARN a été rincé avec 500µl d'éthanol 75% froid et centrifugé pendant 5 mn à 12 000 g à 4°C. Par après, l'éthanol a été enlevé et l'échantillon a été laissé pendant 5 mn pour assurer l'évaporation totale de l'éthanol. Enfin, la remise en suspension a été faite avec 23 µl d'eau sans nucléase. Les ARN extraits ont été conservés à -80°C en attendant les traitements DNASE, RT et la qPCR.

VI.2.7 Traitement DNase et RT

Afin de dégrader l'ADN génomique restant, un traitement DNase a été effectué. Le protocole du kit DNA-free (AM1906, Ambion©, USA) a été utilisé. Pour cela, 2,5 µl du Buffer DNase I 10x et 0,5 µl de rDNase I ont été ajoutés au 22 µl d'ARN contenu dans les tubes et incubés pendant 20 min à 37°C. Puis, 2,5 µl de DNase Inactivation Reagent ont été ajoutés pour inhiber la réaction de la DNase. Après une agitation et incubation de 2 minutes à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés pendant 2 minutes à 12000 g. Le surnageant contenant l'ARN a été transféré dans une plaque 96 puits. La quantité d'ARN finale a été mesurée à l'aide du Nanodrop 2000C UV-Vis Spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

L'étape de rétro-transcription a été faite sur les ARN totaux, afin de produire de l'ADNc à partir du kit RevertAid™ RT (K1691, ThermoFisher Scientific™, Scientific, Wilmington, DE, USA). 1 µg d'ARN totaux ont été mélangés avec 1 µL de Random Hexamer Primer. Une incubation à 65°C pendant 5 minutes a été nécessaire pour hybrider les primers et pour linéariser les ARN possédant une éventuelle structure secondaire, les échantillons ont ensuite immédiatement été posés sur glace. Puis, un mix contenant 4 µl de Buffer 5X contenant du MgCl₂, 1 µl de l'enzyme Ribolock RNase (20 U/µl), 2 µl de dNTP Mix à 10mM et 1 µl de l'enzyme RevertAid RT (200U/µl) ont été ajoutés aux échantillons. Ces derniers ont alors été incubés dans un thermocycleur pendant 60 minutes à 42°C, 5 minutes à 25°C, 60 minutes à 42°C et finalement 5 minutes à 70°C.

VI.2.8 Analyse de l'expression des gènes en qPCR

Pour préciser l'effet de l'exposition aux microplastiques sur les larves, l'expression des certains gènes liés à l'immunité et les voies métaboliques de l'animal ont été mesurés par rt Q-PCR. Les gènes ciblés sont : *bcl2* qui est parmi les gènes liés à la production de ROS (Reactive Oxygen species) et NO (Nitrite oxide) (Jin et al., 2011), la *cyp3* qui est une enzyme entrant dans le métabolisme des xénobiotiques dans l'organisme, la *sod* qui est liée à la réponse au stress oxydatif (Wan et al., 2019), le *tnfa* qui est un gène lié au recrutement des phagocytes dans les cellules infectées (Jin et al., 2011), l'*il8* qui est un gène lié à la sécrétion de cytokines et chemokines (Xu et al., 2018), *hsp70* qui sont des protéines chaperonnes assurant la bonne conformation des protéines cellulaires, la *lysozyme* qui est une protéine impliqué dans la défense contre les infections bactériennes, la *myéloperoxydase (mpo)* qui participe à l'explosion oxydative de certains phagocytes du système immunitaire, l'*igf* qui est hormone de croissance (insuline like growth factor), l'*aldolase* qui est une enzyme intervenant dans la glycolyse.

Les qPCRs ont été faites sur des plaques 384 puits. Une courbe standard a été réalisée en triplicats à partir d'un pool contenant 3 µl de chaque échantillon et dilué au 1/10^e, 1/50^e, 1/100^e, 1/200^e et 1/400^e, ainsi que chaque échantillon (dilué au 1/100^e). Un contrôle négatif a également été réalisé en triplicat. Le volume total par puit était de 10 µl (2,5 µl d'échantillon/standard, 2,5 µl du mix de primers à 2,5 µM (sens et anti-sens) et finalement 5 µl de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix). La qPCR a été faite à l'aide du ThermoFisher QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems. L'amplification des ADN complémentaires s'est effectuée selon le protocole suivant : 3 mn à 90°C pour la dénaturation et ensuite suivi de 40 cycles de 10s à 95°C et 20s à 60°C. Le calcul de l'expression des gènes a été faite grâce à la

courbe standard puis normalisé avec le gène de référence ayant la plus faible variabilité entre les échantillons (*efla*). Au total, les expressions de 10 gènes ont été mesurées.

VI.3 Analyses statistiques

Les traitements des données ont été faits sous R Version 4.0.2 (2020-06-22) de par son interface Rstudio version 1.3.1073.

Une ANOVA à un facteur en prenant comme facteur l'exposition (Contrôle – 1000 µg/l) a été appliquée pour connaître les effets du microplastiques sur la survie, la longueur, la surface du sac vitellin et les comportements des poissons à 4 dpf, après avoir vérifié l'homogénéité de la variance par le test de Bartlett.

Une ANOVA à deux facteurs en prenant comme facteur la concentration en microplastiques (0 µg/l – 1000 µg) et les heures de prélèvement (48 hpf et 72 hpf) a été appliquée pour savoir l'effet du microplastique sur l'évolution du battement cardiaque des larves et leurs taux d'éclosion, après avoir vérifié l'homogénéité de la variance par le test de Bartlett.

Une ANOVA à deux facteurs en prenant comme facteur la concentration en microplastiques (0 µg/l – 1000 µg) et les phases (jour – nuit) ont été appliquée pour savoir l'effet du microplastique sur le comportement des larves, après avoir vérifié l'homogénéité de la variance par le test de Bartlett, et les variables de sorties ont été la distance totale parcourue et la vitesse de nage moyenne des poissons durant l'expérimentation.

Une ANOVA à un facteur en prenant comme facteur les traitements (Contrôle – A – B – C) a été utilisée pour vérifier si l'exposition aux microplastiques avait un effet sur la survie des larves à 7 dpf, après avoir vérifié l'homogénéité de la variance par le test de Bartlett.

L'effet du microplastique sur la longueur des larves à 7 jpf a été analysé à l'aide d'une modélisation dans GLM (Modèle linéaire Généralisé), en prenant comme famille de distribution la famille de distribution gaussienne, comme facteur les traitements (Contrôle – A – B – C) et comme variable de réponse la longueur des larves. Ce modèle a été ensuite validé après avoir observé son AIC (Critère d'Information Akaike) et testé la normalité des résidus. Une ANOVA sur ce modèle nous a permis de savoir si les microplastiques avaient des effets significatifs sur la longueur des poissons à 7 jpf, suivi d'un Tukey Test pour identifier les traitements significativement différents du contrôle. Ce même procédé a été appliqué pour analyser les données sur le comportement (la vitesse de nage et la distance totale parcourue), les nombres de particules ingérés par les larves à 7 jpf et la variation de l'expression des différents gènes ciblés.

VII Résultats

VII.1 Suivi de 2 hpf à 4 jpf

VII.1.1 Survie et longueur des poissons

À 4 jpf, aucune différence significative n'a été mise en évidence sur la survie des larves ($p=0,164$). La survie qui semblait être la plus élevée a été celle des groupes exposés avec une moyenne de $74,243 \pm 2,151$ % ($n=6$) contre $66,411 \pm 4,752$ % ($n=6$) pour le groupe contrôle (Tableau 5). Par contre, sur la longueur des poissons à 4 jpf, les groupes contrôles avaient une longueur plus élevée par rapport aux groupes exposés malgré l'absence de différence significative entre les deux groupes. La longueur moyenne des groupes contrôles a été de $3,853 \pm 0,030$ mm ($n=20$) et celle des groupes exposées a été de $3,812 \pm 0,039$ mm ($n=20$) (Tableau 5).

Tableau 5: Moyenne \pm erreur standard ($n=6$) de la survie (%) et moyenne \pm erreur standard ($n=20$) de la longueur (mm) des larves à 4 jpf

Expositions	Survie (%)	Longueur Standard (mm)
Contrôle	$66,411 \pm 4,752$ %	$3,853 \pm 0,030$
1000 $\mu\text{g/l}$	$74,2433 \pm 2,151$ %	$3,812 \pm 0,039$

VII.1.2 Mortalité 24 h et Taux d'éclosion

Après 24h d'exposition, le taux d'œufs coagulés a été de $29,422 \pm 3,727$ % ($n=6$) pour les groupes contrôles et $23,534 \pm 2,831$ % ($n=6$) pour les groupes exposés, mais leur différence n'est pas significative (figure 5B).

Pour le taux d'éclosion, nous avons pu observer que les larves ont commencé à éclore à 48 hpf et la majorité avait éclos à 72 hpf. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes contrôles et les groupes exposés pendant les 2 périodes de prélèvement ($p=0,181$). Cependant, les larves dans les groupes exposés ont eu tendance à éclore plus rapidement par rapport aux groupes contrôles, avec un taux d'éclosion moyenne de $5,025 \pm 2,733$ % ($n=6$) contre $3,608 \pm 0,985$ % ($n=6$) à 48 hpf et $93,990 \pm 0,995$ % ($n=6$) contre $89,255 \pm 3,208$ % ($n=6$) à 72 hpf (figure 5B).

VII.1.3 Surface du sac vitellin

Contrairement à la longueur des poissons, la surface moyenne des sacs vitellins restant pour les larves exposées a été significativement inférieure à celle des groupes contrôles ($p=0,026$) (figure 5A). D'ailleurs, cette dernière a été seulement de $0,207 \pm 0,005$ mm² ($n=20$) pour les groupes exposés, tandis qu'aux groupes contrôles, elle a atteint $0,226 \pm 0,005$ mm² ($n=20$).

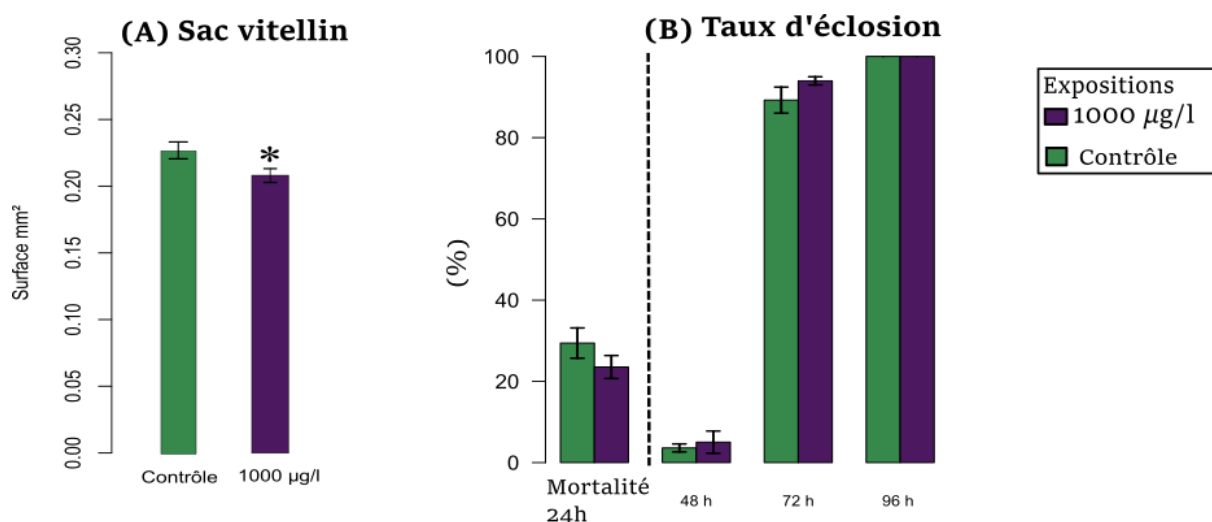


Figure 5: (A) Surface du sac vitellin des larves à 4 jpf représenté en moyenne \pm erreur standard ($n=20$), (B) Mortalité à 24 h et taux d'éclosion (%) représenté en moyenne \pm erreur standard ($n=6$)

VII.1.4 Fréquences cardiaques

Pour la fréquence cardiaque, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes exposés et les groupes contrôles pendant les deux périodes de prélèvement ($p=0,280$). Les groupes contrôles ont eu des battements cardiaques qui ont varié de $169,905 \pm 3,982$ bpm entre 48 h et 72 h, tandis que ceux des groupes exposés ont varié de $171,871 \pm 3,234$ bpm à $162,798 \pm 3,175$ bpm (tableau 6).

Tableau 6: Moyenne \pm erreur standard ($n=20$) de la fréquence cardiaque (bpm : battements par minute) des larves à 48 hpf et 72 hpf

Expositions	48 hpf	72 hpf
Contrôle	$169,905 \pm 3,982$	$172,635 \pm 3,472$
1000 µg /l	$171,871 \pm 3,234$	$162,798 \pm 3,175$

VII.1.5 Analyses de comportements

La distance totale parcourue et la vitesse de nage ont été significativement différentes entre les phases pour toutes expositions confondues ($p < 2 \times 10^{-16}$); c'est-à-dire que les poissons ont parcouru plus de distance avec une vitesse plus élevée pendant la phase nuit comparée à la phase jour. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les expositions pour toutes phases confondues ($p=0,191$) et de même pour l'interaction des deux facteurs ($p=0,541$). La distance totale parcourue par le groupe contrôle a été de $129,866 \pm 10,841$ mm ($n=120$) avec une vitesse moyenne de $0,216 \pm 0,018$ mm/s ($n=120$) pendant la phase jour contre $1318,955 \pm 55,643$ mm ($n=120$) avec une vitesse moyenne de $2,200 \pm 0,92$ mm/s pendant la phase nuit. Concernant les groupes exposés, la distance totale parcourue a été de $210,483 \pm 33,724$ mm ($n=120$) avec une vitesse moyenne de $0,351 \pm 0,056$ mm/s ($n=120$) pendant la phase jour contre $1348,201 \pm 51,963$ mm ($n=120$) avec une vitesse moyenne de $2,248 \pm 0,08$ mm/s ($n=120$) pendant la phase nuit (figure 6).

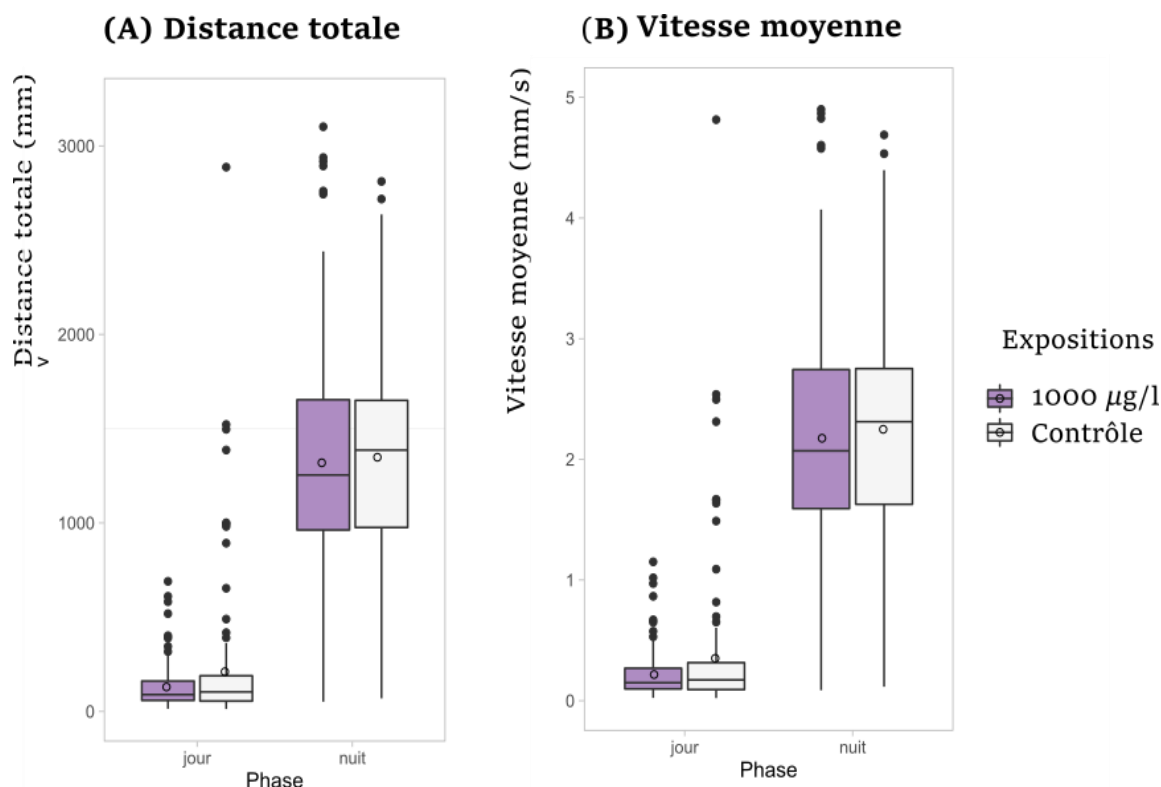


Figure 6: Distribution de la distance totale parcourue en mm (A) et de la vitesse de nage en mm/s (B) des larves à 4 jpf pendant le test de comportement (n=120)

> Expression des gènes

À 4 jpf, aucune différence n'a été trouvée entre les groupes exposés et le contrôle parmi les gènes ciblés (*lyso*, *mpo*, *cyp3*, *tnfa*, *bcl2*, *il8*, *sod*, *aldo*, *hsp70*, et *igf*). Les valeurs relatives de l'expression de ces gènes par rapport au gène de référence sont détaillés en annexe 1.

VII.2 Suivi de 4 jpf à 7 jpf et du challenge bactérien

VII.2.1 Survie

Dans notre expérimentation, les microplastiques n'ont pas impacté d'une manière significative la survie des larves jusqu'à 7 jpf tous traitements confondus ($p=0,135$). La survie minimale a été observée dans le traitement B avec un ratio de $59,446 \pm 4,339$ % (n=3), tandis que celle la plus élevée a été observée dans le traitement C avec une valeur de $75,000 \pm 0,964$ % (n=3) (Tableau 7).

Tableau 7: Survie moyenne des larves à 7 jpf (Moyenne \pm erreur standard, n=3)

Traitements	Moyenne \pm se
Contrôle	$72,820 \pm 6,425$ %
A	$71,816 \pm 4,265$ %
B	$59,446 \pm 4,339$ %
C	$75,000 \pm 0,964$ %

VII.2.2 Longueur

À 7 jpf, les différents traitements ne semblaient pas avoir des effets significatifs sur la croissance en longueur des larves. Les larves ayant une longueur moyenne la plus élevée ont été observées dans le groupe A, avec une valeur de $3,900 \pm 0,060$ mm (n=20), tandis que celle

la plus faible a été observée dans le groupe contrôle, avec une valeur de $3,815 \pm 0,044$ mm (n=20) (figure 7).

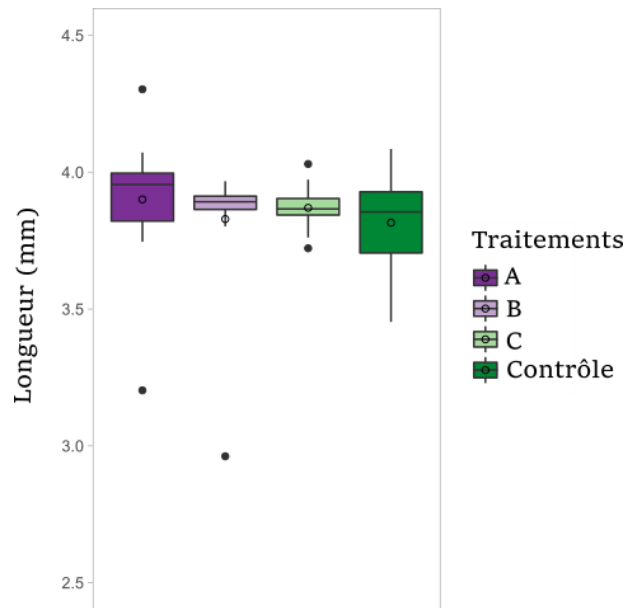


Figure 7: Distribution de la longueur (mm) des larves à 7 jpf (n=20)

VII.2.3 Analyses de comportements

Pour l'analyse du comportement des larves à 7 jpf, nous avons pu observer que pour tous traitements confondus, il y a eu une différence très significative entre les phases nuit et jour ($p=2*10^{-16}$), c'est-à-dire que les larves ont parcouru beaucoup plus de distance avec une vitesse plus élevée pendant la phase nuit. Outre cela, pour toutes les phases confondues, il y a eu aussi une différence significative entre les traitements ($p=1,9*10^{-6}$), c'est-à-dire que dans certains traitements les poissons ont parcouru des distances plus courtes et ont nagé plus lentement par rapport au contrôle.

Durant les phases jours, aucune différence significative n'a été observé entre les traitements tant sur la vitesse de nage que la distance parcourue ($p=0,070$). Néanmoins, la distance parcourue la plus élevée a été observée dans le groupe contrôle avec $801,645 \pm 83,569$ mm (n=57) et celle la plus faible a été observée dans le traitement C avec $602,831 \pm 48,964$ mm (n=42). Durant la phase nuit, nous avons observé une différence très significative entre les traitements tant sur la distance totale parcourue que la vitesse moyenne ($p=3,23*10^{-6}$). Après le Tukey test, nous avons observé que les larves dans les traitements B et C ont eu une vitesse de nage et une distance parcourue significativement inférieures au groupe contrôle, soit une distance parcourue de $1743,040 \pm 45,595$ mm (n=54) et une vitesse moyenne de $2,906 \pm 0,076$ mm/s (n=54) pour les larves dans le traitement B et une distance parcourue de $1702,427 \pm 52,462$ mm (n=42) et une vitesse moyenne de $2,838 \pm 0,087$ mm/s (n=42) pour les larves dans le traitement C, comparés à une distance parcourue de $2134,970 \pm 78,418$ mm (n=57) et une vitesse moyenne de $3,559 \pm 0,130$ mm/s (n=57) pour les larves dans le groupe contrôle (figure 8).

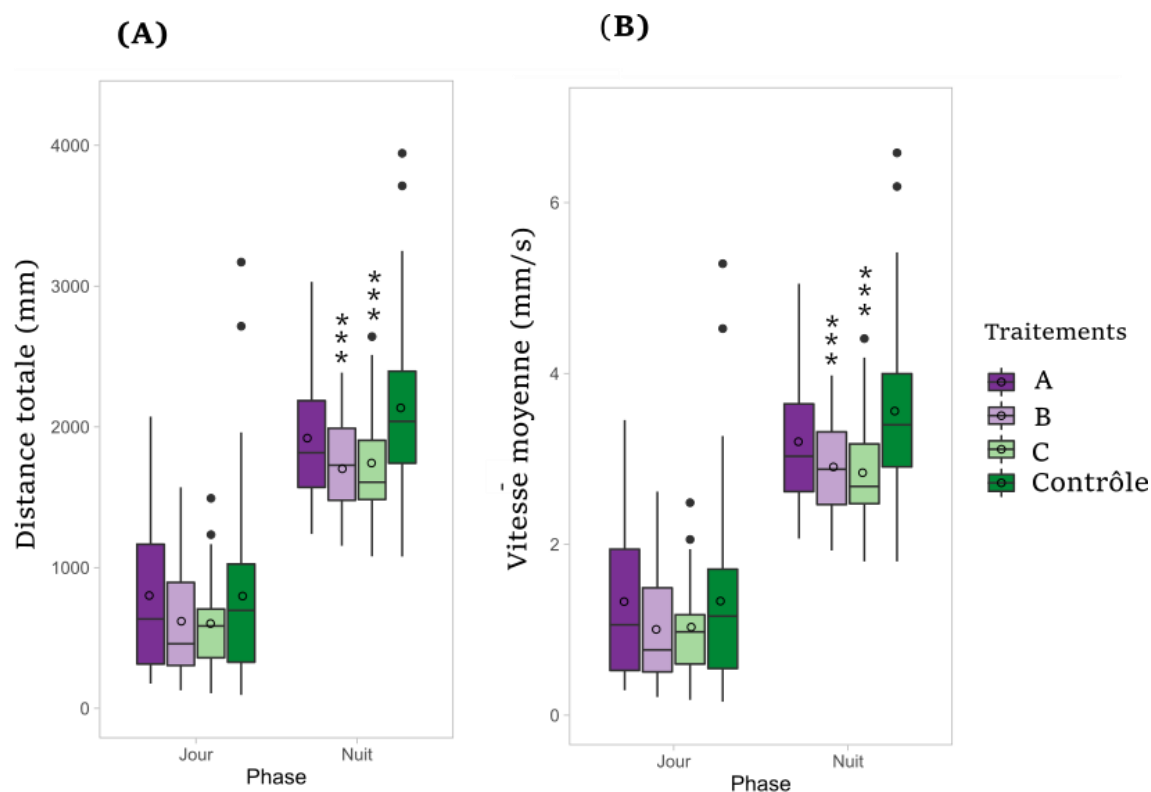


Figure 8 : Distribution de la distance totale parcourue (mm) (A) et de la vitesse moyenne (mm/s) (B) des larves à 7 jpf (n=60) - (*) indique la significativité de la différence de la moyenne par rapport aux contrôles

VII.2.4 Microplastiques ingérés

L'observation au microscope inversé (grossissement x32) a permis d'identifier et de compter le nombre de particules de microplastiques ingérés par les larves (figure 9). Après l'analyse des données, nous avons pu mettre en évidence que le nombre de particules ingérées par les larves dans le traitement C a été significativement supérieure à celles du contrôle (p=0,037). Les larves dans le traitement C ont avalé en moyenne $19,000 \pm 9,641$ particules/larves (n=7), tandis que dans le traitement B, il y en avait $3,142 \pm 2,676$ particules/larves (n=7) et aucune particule n'a été observé à l'intérieur des larves dans les groupes contrôles et le traitement A (figure 10).

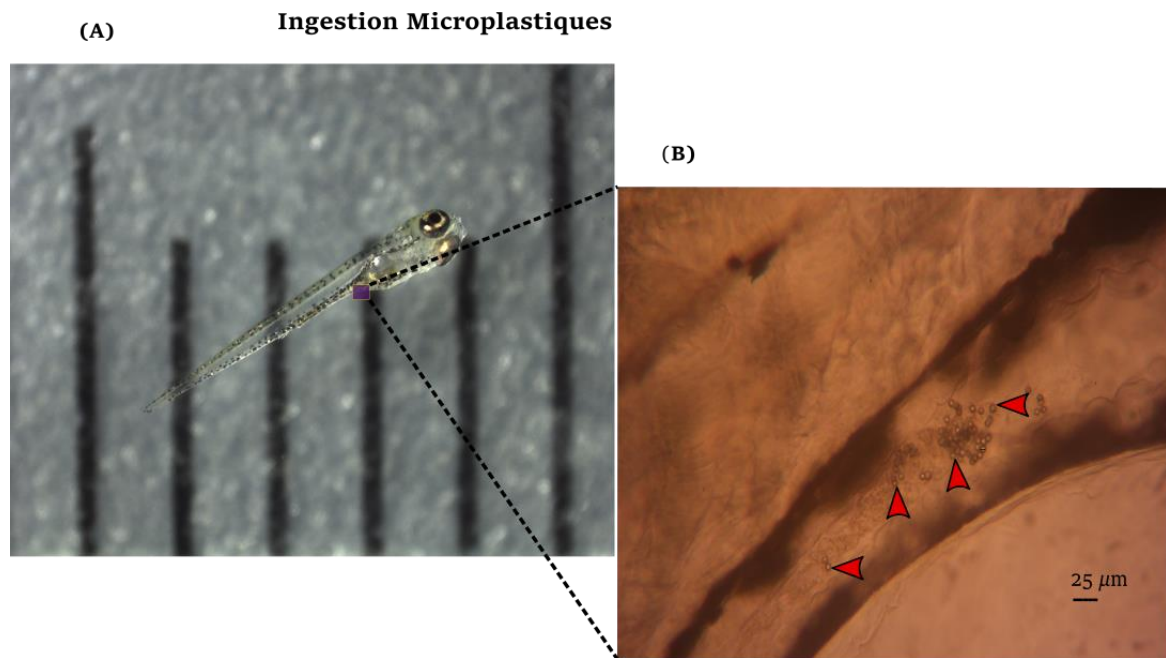


Figure 9: (A) larve à 7 jpf sous stéréomicroscope grossissement (x0,1) - (B) larve à 7 jpf sous microscope inversé grossissement (x32) - les particules de microplastiques dans le tube digestif sont indiquées par les flèches rouges

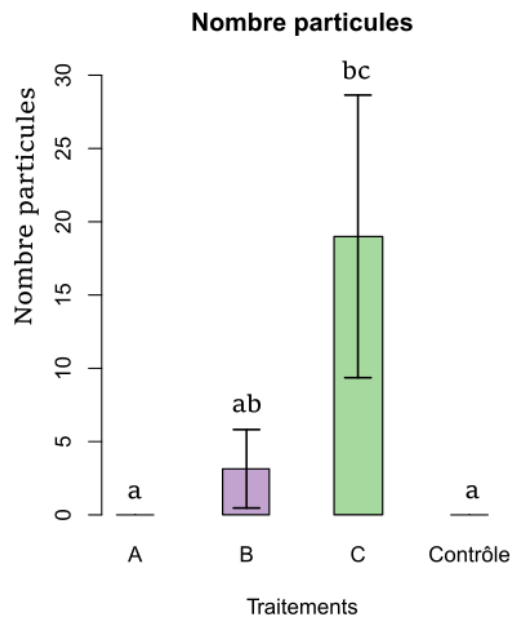


Figure 10: Moyenne \pm erreur standard du nombre de particules ingérées par les larves à 7 jpf ($n=7$) - les lettres abc indiquent le degré de significativité dans chaque traitement

VII.3 Expression des gènes

A 7 jpf et après le challenge bactérien à 8 jpf, les expressions de la *mpo*, *lyso*, *tnfa*, *cyp3* et *il8* n'ont pas été significativement différentes entre les traitements. Les valeurs relatives de l'expression de ces gènes par rapport au gène de référence sont détaillées en annexe 2A et 2B. Outre cela, l'expression du *bcl2* n'était pas significativement différent entre les traitements à 7 jpf ($p=0,350$), mais suite au challenge bactérien, l'expression de *bcl2* des larves du traitement C a été significativement surexprimée par rapport aux autres groupes soit 57% plus élevée par rapport au contrôle. De même pour l'*igf*, aucune différence significative sur son expression n'a été mise en évidence à 7 jpf entre les traitements ($p=0,140$), mais suite au challenge bactérien, ceux du traitement C ont été significativement stimulés C ($p=9,77 \times 10^{-8}$), soit 61% plus élevée par rapport au contrôle. Par ailleurs, l'expression du gène en lien avec la *sod* a été toujours différentes entre les traitements à 7 jpf et après le challenge bactérien ($p=0,05$ et $p=0,00143$), mais force est de noter que la différence est devenue très significative après le challenge bactérien. A 7 jpf, l'expression du gène *sod* a été significativement modulée dans les traitements B et C par rapport au contrôle, soit une différence de 75 % plus élevée pour le traitement B et 74% plus élevée pour le groupe C par rapport au contrôle. Par contre, après le challenge bactérien, seuls les individus dans le traitement C avaient une expression significativement plus élevée par rapport au contrôle, (soit 43%).

D'une autre part, la *hsp70* a été exprimé de manière identique entre les groupes à 7 jpf, puisque la différence entre eux n'était pas significative ($p=0,184$) ; mais après le challenge bactérien, nous avons constaté surexpression de ce dernier dans les traitements B et C par rapport au contrôle ($p=0,002$), soit 55% plus élevé pour le traitement B et 63% plus élevé pour le traitement C.

Et enfin, concernant l'*aldolase*, aucune différence significative son expressions n'a été mise en évidence à 7 jpf entre les traitements ($p=0,460$), mais suite au challenge bactérien, l'expression de l'*aldolase* a été significativement réduite chez les individus des traitement B et C ($p=0,025$), soit 46 % plus faible pour les individus dans le traitement B et 51 % plus faible pour les individus dans les traitements C par rapport au contrôle.

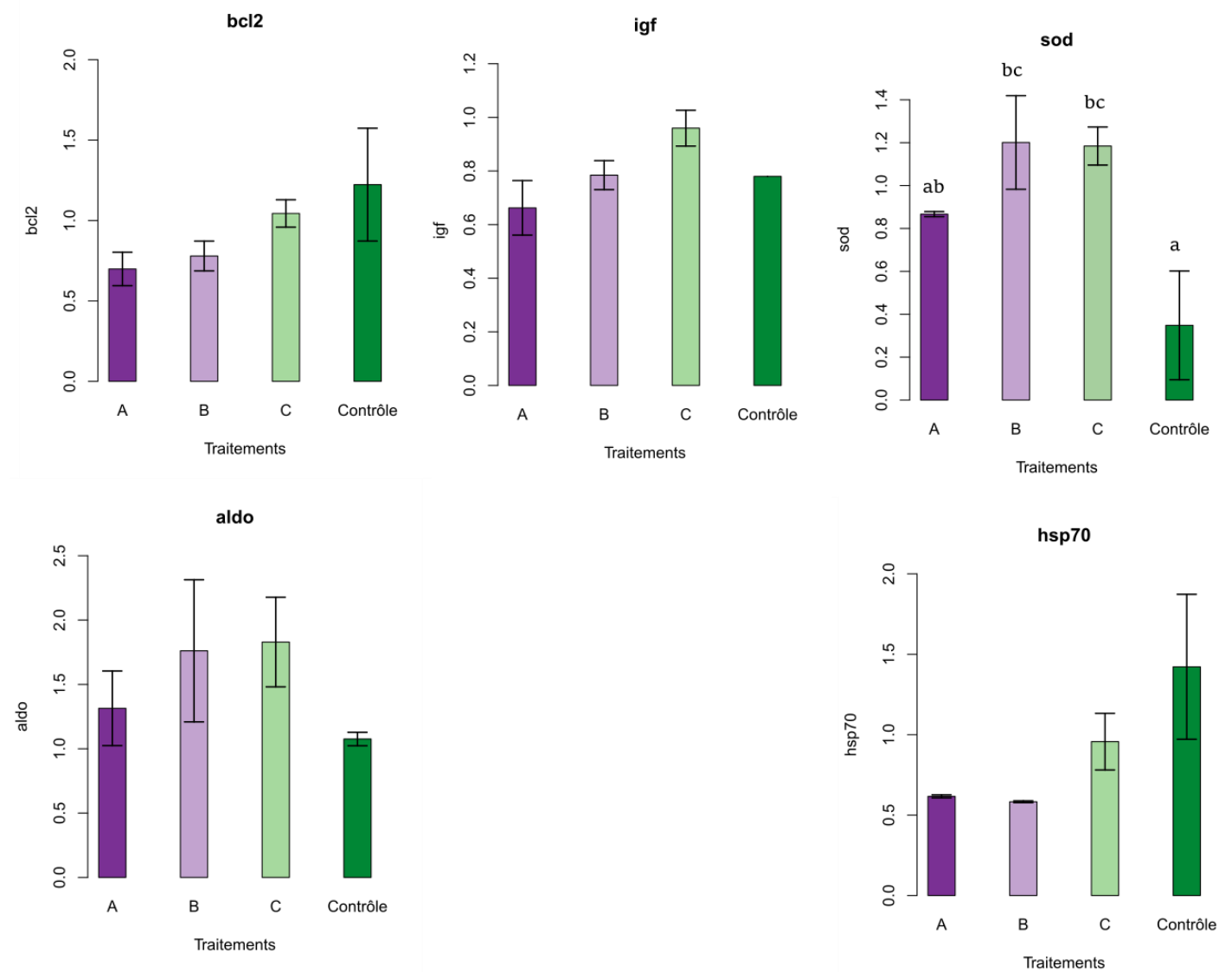


Figure 11: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (*ef1a*) à 7 jpf ($n=3$) – les lettres abc indique le degré de significativité de chaque traitement

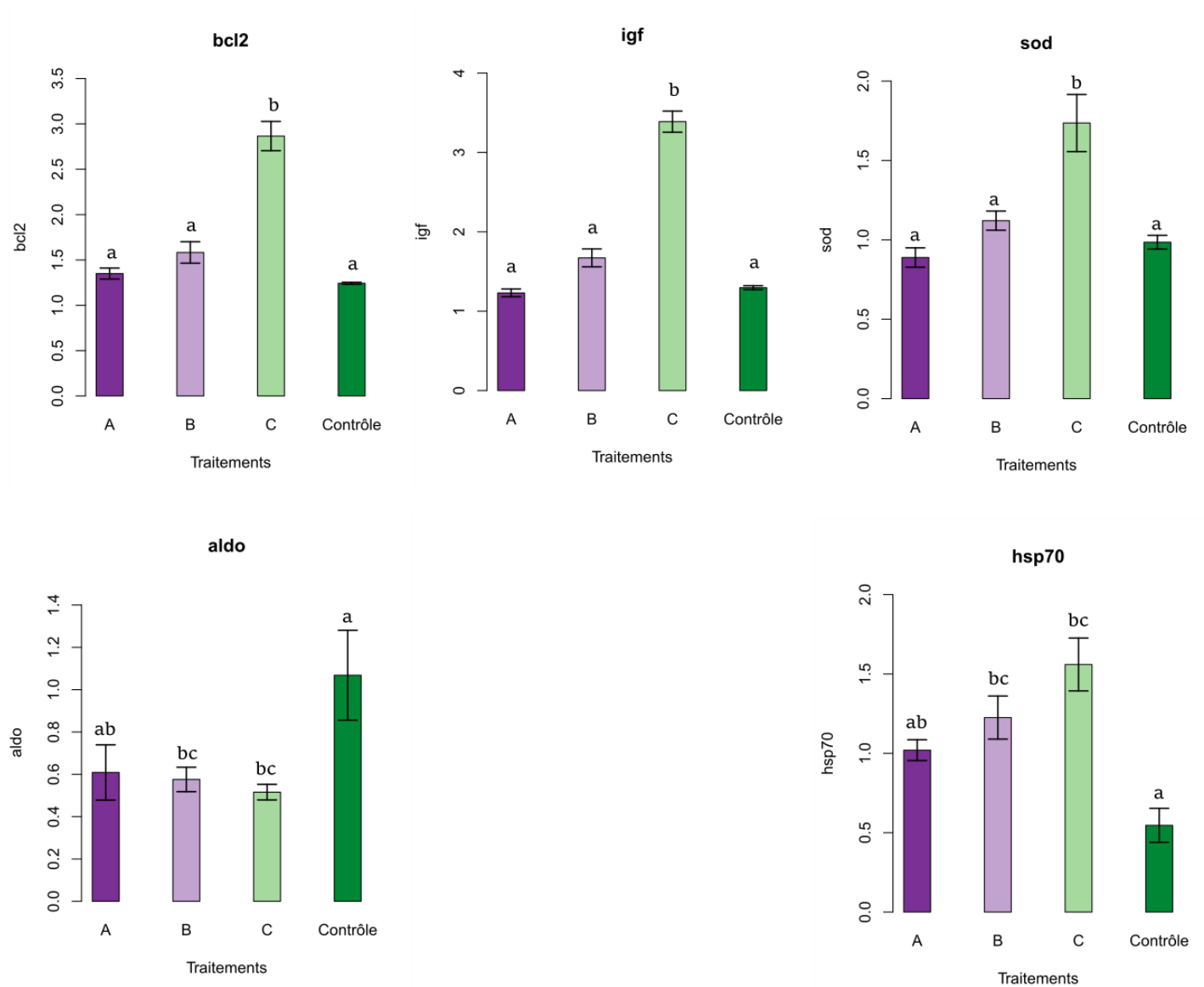


Figure 12: Moyenne \pm erreur standard de la valeur relative des expressions des gènes par rapport au gène de référence (*ef1a*) après le challenge bactérien ($n=3$) - les lettres abc indique le degré de significativité de chaque traitement

VIII Discussions

VIII.1 Rappel sur les objectifs

Notre étude a été élaborée afin d'élucider les effets des microplastiques vierges sur les premiers stades de développement des poissons zèbres. Selon nos résultats, nous allons discuter les effets des microplastiques avant et après l'ouverture de la bouche de la larve et ensuite nous vérifierons les hypothèses suivantes :

- **Hypothèse 1** : Les microplastiques ayant une taille de 5 μm n'ont aucun effet sur développement larvaire avant l'ouverture de la bouche à 5 jpf.
- **Hypothèse 2** : Les microplastiques sont ingérés par les larves de poisson zèbre dès l'ouverture de la bouche ;
- **Hypothèse 3** : Les microplastiques sont accumulés dans le tube digestif et provoquent la perturbation qui peut porter atteinte à la fragilité du système immunitaire et au métabolisme de l'animal.

VIII.2 Effet des microplastiques sur le développement larvaire (2hpf – 4 dpf)

Dans notre expérimentation, l'exposition aux microplastiques d'une taille de 5 μm à une concentration de 1000 $\mu\text{g/l}$ au premier stade de développement larvaire du poisson zèbre n'a pas eu d'effet significatif sur la mortalité à 24h, ni à 96h, et de même pour le taux d'éclosion et les battements cardiaques à 48 hpf et 72 hpf. Nos résultats s'alignent avec ceux trouvés par LeMoine et al., (2018); Qiang & Cheng, (2019), qui avaient stipulé que le diamètre des pores du chorion est inférieur à 1 μm , ainsi tous corps étrangers ayant une taille supérieure à 1 μm ne pourraient pas y entrer et perturber le développement des œufs. Ainsi, tant que la larve est à l'intérieur des œufs, nous pouvons affirmer qu'elle n'est pas encore exposée aux microplastiques. Le même résultat est observé concernant la longueur des larves, à 4 jpf l'exposition aux microplastiques n'apporte pas d'effet significatif. Ce résultat a aussi été trouvé dans l'étude de Chen et al., (2017).

En outre, à l'opposé de ce que Qiang & Cheng, (2019) ont démontré, nous avons pu observer que la surface du sac vitellin des larves exposées a été significativement inférieure à celle des groupes contrôles à 4 jpf. Le sac vitellin est surtout composé de lipide qui s'amenuisent au fur et à mesure du développement larvaire (Fraher et al., 2016). Ces lipides ont pour principale rôle d'assurer l'apport en substrats essentiels pour le développement et la croissance de l'animal (Fraher et al., 2016). Une surface de sac vitellin significativement inférieure par rapport au groupe contrôle peut ainsi être assimilée à : (1) une accélération du métabolisme de l'animal au cours de son développement, ce qui est dû à une diffusion insuffisante de l'oxygène dans le chorion obligeant l'animal à sortir le plus rapidement possible (Jacob et al., 2002) ; c'est-à-dire, les microplastiques pourraient se comporter comme une barrière autour de l'œuf empêchant ainsi la diffusion de l'oxygène. D'ailleurs, Qiang & Cheng, (2019) ont bien démontré que les microplastiques s'accrochaient sur la paroi des œufs. (2) Un changement radical de voies métaboliques suite à l'exposition aux microplastiques, c'est-à-dire un basculement vers la voie impliquant la cytochrome oxydase qui est un indicateur de stress métabolique (LeMoine et al., 2018). Par ailleurs, durant l'expérimentation, à 4 jpf les larves ont déjà été exposées au moins pendant 24 h. Cependant, l'analyse de l'expression du *cyp3* à 4 jpf n'a pas montré de changement significatif. Outre cela, il est important de souligner que la mobilisation énergétique est une des réponses au stress caractéristique des téléostéens (Bonga, 1997). Ainsi, cette réduction de la surface du sac vitellin des sujets exposés pourrait être assimilée à

l'accélération du métabolisme à cause de l'environnement plus ou moins stressant dans lequel ils se trouvent. Des suivis sur l'expression des gènes liés au métabolisme lipidique seront tout de même nécessaires pour confirmer cette hypothèse, à savoir: les gènes liés à l'expression des groupes des apolipoprotéines (Quinlivan & Farber, 2017), *clebpa* (pré-adipocyte marqueur favorisant la liaison avec les protéines alpha), *fabp11a* (transporteur de protéine), *lpl* (lipoprotéine lipase) (Fraher et al., 2016).

VIII.3 Comportement des larves à 4jpf

A 4 jpf, les poissons ont parcouru plus de distance avec une vitesse plus élevée pendant la phase nuit comparée à la phase jour pour toutes expositions confondues. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les expositions pour toutes phases confondues et de même pour l'interaction entre la phase et les expositions. Notre résultat rejoint ceux trouvés par Chen et al., (2017) qui ont exposé ces larves aux microplastiques d'une taille de $41,011 \pm 420$ nm de 3 hpf à 5 jpf. L'étude du comportement des animaux est une nouvelle approche toxicologique permettant d'apprécier l'effet d'une substance toxique sur le système de locomotion, son développement et croissance, et aussi, le système visuel et le système nerveux de l'animal (Zhu et al., 2016). Ainsi, nous pouvons en déduire qu'à 4 jpf les microplastiques de 5 μ m n'auraient pas encore d'effet concret sur le comportement de l'animal.

VIII.4 Effet des microplastiques après l'ouverture de la bouche

De même qu'à 4 jpf, l'exposition au microplastique n'a pas non plus eu d'effet significatif sur la survie et la croissance en longueur des larves pour tous traitements confondus à 7 jpf. Dans les études de toxicité, c'est surtout les nanoparticules qui provoquent le retard de la croissance et la mortalité chez les larves de poissons zèbre (Bai et al., 2010; Chen et al., 2017). Cela est surtout dû à la production excessive de ROS ou encore à l'inhibition de l'activité de l'AChE (Acetyl Choline Esterase) entraînant un dysfonctionnement du système nerveux et menant au retard de la croissance ou même à la mort de l'animal (Bai et al., 2010; Chen et al., 2017). Dans notre cas, nous pouvons affirmer que les microplastiques n'ont pas la taille ni la forme adéquate pour induire ces effets à 7 jpf, même si à cet âge, ces derniers sont ingérés et peuvent s'accumuler dans le tube digestif des poissons.

VIII.5 Ingestion de microplastiques

A 7 jpf, le groupe exposé aux microplastiques depuis 2 hpf jusqu'à 7 jpf (traitement C) avait ingéré significativement plus de microplastiques comparés au groupe contrôle, tandis que le groupe exposé de 4 jpf à 7 jpf (traitement B) en a ingéré moins, et dans le groupe exposé seulement de 2 hpf à 4 jpf (Traitement A), aucun microplastique n'a été observé dans le tube digestif. D'abord, il faut noter que notre observation était une observation ponctuelle, nous n'avons pas pris en compte le transit intestinal des larves, alors que ces derniers ont une capacité élevée d'éliminer les microbilles (LeMoine et al., 2018). Ensuite, la forme des microplastiques est l'un des facteurs déterminant pour son accumulation dans l'intestin. Ce sont les granulés qui s'accumulent le moins (Qiao, Deng, et al., 2019). Néanmoins, les résultats de Qiang & Cheng, (2019), Wan et al., (2019), Lemoine et al., (2018) qui stipulent que les larves ont déjà la capacité d'ingérer des particules de microplastiques dès l'ouverture de leur bouche à 5 jpf ont été vérifiés dans notre étude. Par ailleurs, dans notre expérimentation, les larves exposées de 2 hpf à 7 jpf semblaient ingérer plus de particules comparées à celles exposées à partir de 4 jpf à 7 jpf. Cela pourrait être dû à l'adaptation précoce de ces larves à la présence de microplastiques dans leur environnement qui a éveillé rapidement leur comportement de prédateur. D'ailleurs, Best et al., (2010) ont pu observer le même phénomène en distribuant des rotifères à leurs larves. Néanmoins, des nouvelles expérimentations sont nécessaires pour mettre au point les techniques de détermination des concentrations de microplastiques et permettre leur suivi dans le tube

digestif de l'animal, notamment, la technique de marquage des microbilles au Nil red que nous avons déjà initiée durant nos pretests (protocole en annexe 3).

VIII.6 Comportement des larves suite à l'ingestion des microplastiques

A 7 jpf, les larves exposées aux microplastiques de 2 hpf à 7 jpf (Traitement C) et celles exposées de 4 jpf à 7 jpf (Traitement B) étaient moins actives pendant la phase nuit par rapport aux larves exposées de 2 hpf à 4 jpf (traitement A) et celles du groupes contrôle. Nos résultats confirment ceux trouvés par Qiang & Cheng et al., (2019), qui ont exposés des larves de 2 hpf à 5 jpf à des microplastiques de 1 μm à 1000 $\mu\text{g/l}$. L'obscurité provoque un phénomène d'anxiété chez les larves des poissons zèbres d'où leur hyperactivité pendant la phase nuit comparée à la phase jour (Lau et al., 2011). Une déviation de nos sujets exposés par rapport à ce comportement normal pourrait être ainsi associée à :

(1) Un trouble de développement du système nerveux dû à l'inhibition de l'AChE dans le cerveaux provoquant la surstimulation des récepteurs cholinergiques menant par la suite à la depletion significative des reflexes de contrôle musculaire (Pereira et al., 2012) ou un stress oxydatif intense affectant le système nerveux (Zhu et al., 2016). Ainsi, l'animal n'arrive plus à adapter son comportements vis-à-vis de stress (Lau et al., 2011).

(2) Une trouble de la vision qui empêche la larve d'identifier clairement la phase nuit de la phase jours. D'ailleurs, (LeMoine et al., 2018) en exposant des larves de poissons zèbres à des microplastiques de 10-40 μm à une concentration de 5 mg/l, ont pu mettre en évidence la sous expression de plusieurs gènes liés au développement du cerveau et des organes de sens, notamment ceux associés au développement de l'œil. D'autre part, Chen et al., (2017) ont pu observer la surexpression des gènes liés à la pigmentation de la rétine *zfrho* (rdofopsine) - et *zfbblue* suite à l'exposition des larves aux microplastiques, et selon Xu et al., (2013), la surexpression de ces gènes pourrait aussi être associée à la détérioration du fonctionnement de la rétine.

Le lien entre la toxicité due aux microplastiques et le comportement des larves de poissons zèbre reste encore peu exploré. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour mettre en évidence cette relation, en tenant compte surtout des gènes concernés durant ce stade de développement de la larve ; c'est-à-dire les gènes liés aux développement du cerveau et les organes de sens (LeMoine et al., 2018), et les gènes liés à la neurotoxicité (*mbp*, *α 1-tubulin*, et *gfap*) (Zhu et al., 2016), et enfin, les gènes liés au pigment visuel (*zfrho*, *zfuv*, *zfred*, *zfbblue*, and *zfgr1*) (Xu et al., 2013).

VIII.7 Expression des gènes suite à l'ingestion de microplastiques

A 4 jpf, l'exposition aux microplastiques ne montrait aucun effet sur les expressions des gènes immunitaires que nous avons testés. Par contre à 7 jpf, le gène en lien avec la *sod* était significativement surexprimé dans les sujets exposés de 2 hpf à 7 jpf (traitements C) et ceux exposés de 4 jpf à 7 jpf (traitements B). Ces résultats s'alignent avec ceux trouvés par Chen et al., (2017), Qiao, Sheng, et al., (2019), Choi et al., (2018). En effet, la *sod* est la première défense des cellules contre les agents toxiques (Chen et al., 2016). Elle participe à la capture des radicaux libres dans les cellules pour les transformer en H_2O_2 et s'en suit la réaction avec la catalase pour le transformer en H_2O (Chen et al., 2017). Cet équilibre entre radicaux libres et *sod* + *cat* est toujours maintenu dans les cellules, à moins qu'il y ait une peroxydation des membranes, une perte d'ions ou une dénaturation des protéines (Di Giulio et al., 1989). Dans notre étude, ce stress oxydatif est surtout causé par l'accumulation des microplastiques dans le tube digestif de l'animal qui provoque la formation des ROS et induit le stress oxydatif (Qiang & cheng, 2019, Chen et al., 2017). Par ailleurs, certains auteurs ont aussi mis en évidence que ce stress oxydatif s'associe toujours à une réponse inflammatoire. Jin et al., (2018) ont utilisé des microplastiques de 0,5 μm à 1000 $\mu g/l$ avec lesquels ils ont pu mettre en évidence une surexpression du *il1 β* et *il1 α* dans les individus traités. De même, Qiang & cheng, (2019) ont utilisé des microplastiques 1 μm à 1000 $\mu g/l$, et qui ont pu observer une surexpression du *il1 β* dans les sujets traités. Cependant, dans notre expérience, les gènes que nous avons sélectionné (*il8*, *tnfa*) ne semblaient pas refléter cette réponse due à l'inflammation. Cela pourrait être associé au fait que la forme des microplastiques importe aussi sur la capacité à provoquer des effets, c'est-à-dire que ce sont les fragments de microplastiques qui sont les plus aptes à causer des lésions au niveau du tube digestif comparés au microbilles, et que malgré l'expression significative de la *sod* aucune signe d'inflammation n'est perçu dans le tube digestif pour les sujet exposés aux microbilles (Qiao, Deng, et al., 2019). Ainsi, dans notre cas nous ne saurons pas confirmer l'absence ou non d'inflammation dans nos groupes exposés.

VIII.8 Challenge bactérien

Après le challenge bactérien, la *bcl2*, l'*igf* et la *sod* ont été significativement surexprimées dans les larves qui ont avalés plus de microplastiques, c'est-à-dire, celles qui étaient exposées de 2 hpf à 7 jpf (traitement C). Le challenge par balnéation est la pratique la plus possible d'une infection dans le milieu naturel (Saraceni et al., 2016). Dans notre expérimentation, la bouche est déjà ouverte bien avant le challenge bactérien. Ainsi, la pénétration des bactéries à l'intérieur des larves est bien assurée (Saraceni et al., 2016). Les premiers gènes qui entrent en action lors d'une infection bactérienne sont les acteurs de l'immunité innée dont les cytokines *il1 β* et le *tnfa*. Ils induisent l'activation des leucocytes et le recrutement des neutrophiles dans les sites infectés (Saraceni et al., 2016). Ensuite, vient la *myéloxyperoxydase* qui est une enzyme excrétée par les neutrophiles pour neutraliser les bactéries pathogènes (Gobi et al., 2016). Cependant, nos résultats n'ont donnée aucune différence significative entre l'expression des ces gènes après le challenge bactérien. L'absence d'inflammation dans les larves exposées pourrait en être la cause, de ce fait, les bactéries ont affecté le système de défense immunitaire de la même manière dans tous les traitements. D'ailleurs, les gènes *il1 β* et le *tnfa* sont d'autant plus sensible lorsqu'il y a des points de pénétration (lésion ou blessure) sur les sujets infectés (Saraceni et al., 2016). Néanmoins, la surexpression de la *bcl2* et l'*igf* associée à la *sod* dans le groupe exposé de 2 hpf à 7 jpf est un indicateur de stress supplémentaire suite au challenge bactérien. Selon Lei et al., (2018), l'exposition au microplastique réduit la capacité des poissons à lutter contre les bactéries et les rendent plus susceptible au stress oxydatif d'où la surexpression de la *sod* (Chen et al., 2016) et l'*igf* qui est aussi un gène lié à la réponse dû au stress oxydatif (Sukhanov et al., 2007). Par la suite, la production excessif des ROS peut conduire à l'apoptose (Ott et al., 2007),

d'où la surexpression de la *bcl2* qui est un gène modérateur de l'apoptose⁷ cellulaire (Hockenbery et al., 1993). En plus, la *hsp70* a été singifiquement surexprimée dans les groupes exposé de 2 hpf à 7 jpf et ceux exposés de 4 jpf à 7 jpf. La *hsp70* est classée comme un indicateur de stress suite à l'exposition aux molécules toxiques des espèces aquatiques (Iwama et al., 1998). Elle participe à la réorganisation des protéines cellulaires (Li et al., 2009). En outre, elles sont aussi impliquées fortement aux différentes réponses immunitaires, leurs sur surexpression facilite la présentation des antigènes et l'activation des lymphocytes T (Van Eden & Young, 1996 in Li et al., 2009). La *hsp70* participe aussi à la suppression de l'apoptose en s'associant avec *Apaf-1* (Beere et al., 2000). Compte tenu de tout cela, nous pouvons affirmer que le challenge bactérien a révélé de nouveaux effets sur les sujets exposée au microplastiques, surtout dans les sujets exposés de 2 hpf à 7 jpf. Ce dernier a mené la production de ROS dans les sujets exposés à un tel point que il y a eu surexpression de la *bcl2*, signe d'un stress oxydatif intense.

Enfin, l'expression du gène en lien avec l'*aldolase* n'a pas présenté de différence significative à 7 jpf entre les traitements , mais suite au challenge bactérien, son expression a été significativement réduite chez les individus exposés de 2 hpf à 7 jpf et ceux exposés de 4 jpf à 7 jpf. L'*aldolase* est une enzyme qui participe à la glycolyse et au néoglycogénèse (Hu et al., 2016), sa modulation suite à l'exposition au microplastiques à été aussi observé par LeMoine et al., (2018). Par ailleurs, Wan et al., (2019) ont aussi mis en évidence que l'exposition aux microplastiques de 5 µm de 2pf à 7 jpf à une concentration de 1000 µg/l peut porter atteinte à l'expression des gènes en lien avec le métabolisme énergétique et glycolipidique. Xia et al., (2018), associent ce phénomène à un trouble métabolique dû à l'intoxification du foie. Dans notre experimentation, il est impossible de déterminer si le foie a été affecté par les microplastiques. Cependant, nous pouvons confirmer que le challenge bactérien accentue les troubles métaboliques des sujets traités aux microplastiques, fait qui est probablement dû à l'augmentation du stress oxydatif suite à l'infection bactérienne (Lei et al., 2018).

⁷ **apoptose** (ou mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal (Wikipédia)

IX Conclusion

Les microplastiques sont omniprésents dans l'environnement aquatique. Leurs effets sur les premiers stades de développement restent encore très peu connus. Durant les stades embryonnaires, les microplastiques de 5 μm ne se présentent pas encore comme des agents toxiques pour les larves parce qu'ils n'arrivent pas à pénétrer les pores du chorion, hormis la réduction du sac vitellin par rapport au sujet contrôle. Ensuite, à 4 jpf, les microplastiques n'induisent pas d'effets significatifs sur la croissance et la survie des larves, ni sur le comportement. Et enfin, à 7 jpf, les larves sont bien capables d'ingérer les microplastiques et leur accumulation dans le tube digestif provoque des troubles de comportements et des stress oxydatifs et déstabilise les principales voies métaboliques. Les effets sont surtout très remarqués dans les groupes qui avaient eu la plus longue durée d'exposition (de 2 hpf à 7 jpf).

Cette étude nous a permis de confirmer que l'impact des microplastiques survient surtout après l'ouverture de la bouche, et que les effets peuvent significativement porter atteinte au fitness de l'animal. Cependant, des suivis rapprochés sur le métabolisme lipidique des sujets exposés sont nécessaires pour confirmer les effets indirects des microplastiques durant les premières 48 heures post-fécondation. Ensuite, il est indispensable d'évaluer l'expression des gènes en lien avec le développement cérébrale et du système visuel à 4 jpf pour ainsi élucider les troubles de comportement liés à l'ingestion de microplastiques. En outre, nous avons mis évidence que les sujets ayant une durée d'exposition plus longue (2 hpf à 7 jpf) ont ingérés plus de microplastiques, compte tenu du fait que l'ouverture de la bouche est supposée avoir lieu à 5 jpf. Des auteurs ont aussi démontré que la quantité de particules ingérées est dépendante de la concentration d'exposition (Qiang & Cheng, 2019). En conséquence, il est nécessaire de suivre la concentration et le comportement des particules dans le milieu et dans le tube digestif des animaux pour expliquer tous les effets possibles.

Notre étude était seulement axée sur les microbilles de 5 μm et à une concentration de 1000 $\mu\text{g/l}$. Pour avoir plus de représentabilité et de pertinence, il est indispensable de mener des expérimentations avec d'autre taille (1 μm – 10 μm – 30 μm) et forme (fragments, fibres, billes) de microplastiques à une concentration proche de celle retrouvées dans l'environnement (100 $\mu\text{g/l}$ à 1000 $\mu\text{g/l}$) (Limonta et al., 2019). A part le fait que les microplastiques provoquent des effets sur le comportement, le métabolisme et le système immunitaire de l'animale, des études sur l'effet des microplastiques sur le microbiote intestinal durant les premiers stades de développement sont aussi nécessaires. D'ailleurs, leur mise en place durant ces premiers stades est cruciale pour le fitness de l'animal (Kanter & Rawls, 2010; Stephens et al., 2016). Outre que les études des effets des microplastiques soient déjà initiées, il est important de considérer par la même occasion les nanoplastiques (plastiques de taille inférieure à 100 nm (Blair et al., (2017)), qui sont autant biodisponibles pour les animaux aquatiques et possèdent une surface d'échange nettement plus élevée. (Sarasamma et al., 2020).

Bibliographie

- Andrady AL and Neal MA (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1977–1984. DOI: 10.1098/rstb.2008.0304.
- Atherton JA and McCormick MI (2017) Kin recognition in embryonic damselfishes. *Oikos* 126(7): 1062–1069. DOI: 10.1111/oik.03597.
- Auta HS, Emenike CU and Fauziah SH (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. DOI: 10.1016/j.envint.2017.02.013.
- Bai W, Zhang Z, Tian W, et al. (2010) Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research* 12(5): 1645–1654. DOI: 10.1007/s11051-009-9740-9.
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, et al. (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1985–1998. DOI: 10.1098/rstb.2008.0205.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology* 2(8): 469–475. DOI: 10.1038/35019501.
- Bellas J, Martínez-Armental J, Martínez-Cámara A, et al. (2016) Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine Pollution Bulletin* 109(1): 55–60. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.026.
- Bergmann M, Gutow L, Klages M, et al. (eds.) (2015) *Marine Anthropogenic Litter*. Springer Open. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer.
- Best J, Adatto I, Cockington J, et al. (2010) A Novel Method for Rearing First-Feeding Larval Zebrafish: Polyculture with Type L Saltwater Rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Zebrafish* 7(3): 289–295. DOI: 10.1089/zeb.2010.0667.
- Blair RM, Waldron S, Phoenix V, et al. (2017) Micro- and Nanoplastic Pollution of Freshwater and Wastewater Treatment Systems. *Springer Science Reviews* 5(1–2): 19–30. DOI: 10.1007/s40362-017-0044-7.
- Blettler MCM, Abrial E, Khan FR, et al. (2018) Freshwater plastic pollution: Recognizing research biases and identifying knowledge gaps. *Water Research* 143: 416–424. DOI: 10.1016/j.watres.2018.06.015.
- Bonga SEW (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, et al. (2008) Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology* 42(13): 5026–5031. DOI: 10.1021/es800249a.
- Browne MA, Crump P, Niven SJ, et al. (2011) Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology* 45(21): 9175–9179. DOI: 10.1021/es201811s.
- Chen M, Yin J, Liang Y, et al. (2016) Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *Aquatic Toxicology* 174: 54–60. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.02.015.

- Chen Q, Gundlach M, Yang S, et al. (2017) Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Science of The Total Environment* 584–585: 1022–1031. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.156.
- Choi JS, Jung Y-J, Hong N-H, et al. (2018) Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Pollution Bulletin* 129(1): 231–240. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.039.
- Cole M (2016) A novel method for preparing microplastic fibers. *Scientific Reports* 6(1): 34519. DOI: 10.1038/srep34519.
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, et al. (2011) Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* 62(12): 2588–2597. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- Cole M, Lindeque P, Fileman E, et al. (2013) Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science & Technology* 47(12): 6646–6655. DOI: 10.1021/es400663f.
- Costa MF, Ivar do Sul JA, Silva-Cavalcanti JS, et al. (2010) On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. *Environmental Monitoring and Assessment* 168(1–4): 299–304. DOI: 10.1007/s10661-009-1113-4.
- Dai Y-J, Jia Y-F, Chen N, et al. (2014) Zebrafish as a model system to study toxicology: Zebrafish toxicology monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33(1): 11–17. DOI: 10.1002/etc.2406.
- Derraik JGB (2002) The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin* 44(9): 842–852. DOI: 10.1016/S0025-326X(02)00220-5.
- Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, et al. (1989) Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8(12): 1103–1123. DOI: 10.1002/etc.5620081203.
- Eerkes-Medrano D, Thompson RC and Aldridge DC (2015) Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* 75: 63–82. DOI: 10.1016/j.watres.2015.02.012.
- Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, et al. (2014) Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE* Dam HG (ed.) 9(12): e111913. DOI: 10.1371/journal.pone.0111913.
- Farrell P and Nelson K (2013) Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution* 177: 1–3. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.01.046.
- Fraher D, Sanigorski A, Mellett NA, et al. (2016) Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Reports* 14(6): 1317–1329. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.016.
- Gesamp (2016) *Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment: Part Two of a Global Assessment*. (Kershaw, P.J., and Rochman, C.M., eds). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/ UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud.
- Gobi N, Ramya C, Vaseeharan B, et al. (2016) *Oreochromis mossambicus* diet supplementation with *Psidium guajava* leaf extracts enhance growth, immune, antioxidant response and

- resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 58: 572–583. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.09.062.
- Goldberg ED (1995) The Health of the Oceans - A 1994 Update. *Chemistry and Ecology* 10(1–2): 3–8. DOI: 10.1080/02757549508035325.
- Graham ER and Thompson JT (2009) Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 368(1): 22–29. DOI: 10.1016/j.jembe.2008.09.007.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, et al. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75(2): 241–251. DOI: 10.1016/0092-8674(93)80066-N.
- Hopewell J, Dvorak R and Kosior E (2009) Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 2115–2126. DOI: 10.1098/rstb.2008.0311.
- Horton AA, Walton A, Spurgeon DJ, et al. (2017) Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of The Total Environment* 586: 127–141. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.190.
- Howe DG, Bradford YM, Conlin T, et al. (2012) ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic Acids Research* 41(D1): D854–D860. DOI: 10.1093/nar/gks938.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446): 498–503. DOI: 10.1038/nature12111.
- Hu H, Juvekar A, Lyssiotis CA, et al. (2016) Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Glycolysis through Mobilization of Aldolase from the Actin Cytoskeleton. *Cell* 164(3): 433–446. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.042.
- Iwama GK, Thomas PT, Forsyth RB, et al. (1998) Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 8(1): 35–56. DOI: 10.1023/A:1008812500650.
- Jacob E, Drexel M, Schwerte T, et al. (2002) Influence of hypoxia and of hypoxemia on the development of cardiac activity in zebrafish larvae. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 283(4): R911–R917. DOI: 10.1152/ajpregu.00673.2001.
- Jin Y, Zheng S and Fu Z (2011) Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology* 30(4–5): 1049–1054. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.02.001.
- Jin Y, Xia J, Pan Z, et al. (2018) Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution* 235: 322–329. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.088.
- Kalueff AV and Cachat JM (eds.) (2011) *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*. Neuromethods. Totowa, NJ: Humana Press. DOI: 10.1007/978-1-60761-922-2.
- Kanther M and Rawls JF (2010) Host-microbe interactions in the developing zebrafish. *Current Opinion in Immunology* 22(1): 10–19. DOI: 10.1016/j.coi.2010.01.006.

- Kim SW, Chae Y, Kim D, et al. (2019) Zebrafish can recognize microplastics as inedible materials: Quantitative evidence of ingestion behavior. *Science of The Total Environment* 649: 156–162. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.310.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203(3): 253–310. DOI: 10.1002/aja.1002030302.
- Kohler M, Tremp J, Zennegg M, et al. (2005) Joint Sealants: An Overlooked Diffuse Source of Polychlorinated Biphenyls in Buildings. *Environmental Science & Technology* 39(7): 1967–1973. DOI: 10.1021/es048632z.
- Laist DW (1987) Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 18(6): 319–326. DOI: 10.1016/S0025-326X(87)80019-X.
- Lau BYB, Mathur P, Gould GG, et al. (2011) Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(6): 2581–2586. DOI: 10.1073/pnas.1018275108.
- Law KL and Thompson RC (2014) Microplastics in the seas. *Science* 345(6193): 144–145. DOI: 10.1126/science.1254065.
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269(1–4): 1–20. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
- Lei L, Wu S, Lu S, et al. (2018) Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of The Total Environment* 619–620: 1–8. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.103.
- LeMoine CMR, Kelleher BM, Lagarde R, et al. (2018) Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution* 243: 591–600. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.08.084.
- Li Y, Sun B, Wu H, et al. (2009) Effects of pure microcystin-LR on the transcription of immune related genes and heat shock proteins in larval stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* 289(1–2): 154–160. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.12.029.
- Limonta G, Mancina A, Benkhalqui A, et al. (2019) Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish. *Scientific Reports* 9(1): 15775. DOI: 10.1038/s41598-019-52292-5.
- Lu Y, Zhang Y, Deng Y, et al. (2016) Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver. *Environmental Science & Technology* 50(7): 4054–4060. DOI: 10.1021/acs.est.6b00183.
- Lusher AL, McHugh M and Thompson RC (2013) Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin* 67(1–2): 94–99. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.11.028.
- Mazurais D, Ernande B, Quazuguel P, et al. (2015) Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine Environmental Research* 112: 78–85. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.09.009.
- Murray F and Cowie PR (2011) Plastic contamination in the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). *Marine Pollution Bulletin* 62(6): 1207–1217. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.032.

- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12(5): 913–922. DOI: 10.1007/s10495-007-0756-2.
- Pereira VM, Bortolotto JW, Kist LW, et al. (2012) Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *NeuroToxicology* 33(3): 469–475. DOI: 10.1016/j.neuro.2012.03.005.
- Qiang L and Cheng J (2019) Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 176: 226–233. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.088.
- Qiao R, Deng Y, Zhang S, et al. (2019) Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere* 236: 124334. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.065.
- Qiao R, Sheng C, Lu Y, et al. (2019) Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of The Total Environment* 662: 246–253. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.245.
- Quinlivan VH and Farber SA (2017) Lipid Uptake, Metabolism, and Transport in the Larval Zebrafish. *Frontiers in Endocrinology* 8: 319. DOI: 10.3389/fendo.2017.00319.
- Ribeiro F, Garcia AR, Pereira BP, et al. (2017) Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine Pollution Bulletin* 122(1–2): 379–391. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.078.
- Ryan PG, Moore CJ, van Franeker JA, et al. (2009) Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 1999–2012. DOI: 10.1098/rstb.2008.0207.
- Saraceni PR, Romero A, Figueras A, et al. (2016) Establishment of Infection Models in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*) to Study the Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila*. *Frontiers in Microbiology* 7. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01219.
- Sarasamma S, Audira G, Siregar P, et al. (2020) Nanoplastics Cause Neurobehavioral Impairments, Reproductive and Oxidative Damages, and Biomarker Responses in Zebrafish: Throwing up Alarms of Wide Spread Health Risk of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1410. DOI: 10.3390/ijms21041410.
- Sharma S and Chatterjee S (2017) Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research* 24(27): 21530–21547. DOI: 10.1007/s11356-017-9910-8.
- Smith BR and Blumstein DT (2008) Fitness consequences of personality: a meta-analysis. *Behavioral Ecology* 19(2): 448–455. DOI: 10.1093/beheco/arm144.
- Spence R., Fatema MK, Ellis S, et al. (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 71(1): 304–309. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x.
- Spence Rowena, Gerlach G, Lawrence C, et al. (2007) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83(1): 13–34. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
- Spitsbergen JM and Kent ML (2007) The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations.: 49.

- Stefatos A, Charalampakis M, Papatheodorou G, et al. (1999) Marine Debris on the Sea-floor of the Mediterranean Sea: Examples from Two Enclosed Gulfs in Western Greece. *Marine Pollution Bulletin* 38(5): 5.
- Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, et al. (2016) The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *The ISME journal* 10(3): 644–654. DOI: 10.1038/ismej.2015.140.
- Sukhanov S, Higashi Y, Shai S-Y, et al. (2007) IGF-1 Reduces Inflammatory Responses, Suppresses Oxidative Stress, and Decreases Atherosclerosis Progression in ApoE-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(12): 2684–2690. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.156257.
- Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, et al. (2016) Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(9): 2430–2435. DOI: 10.1073/pnas.1519019113.
- Tanguay RL (2018) The Rise of Zebrafish as a Model for Toxicology. *Toxicological Sciences* 163(1): 3–4. DOI: 10.1093/toxsci/kfx295.
- Thompson RC (2004) Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science* 304(5672): 838–838. DOI: 10.1126/science.1094559.
- Thompson RC, Moore CJ, vom Saal FS, et al. (2009) Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526): 2153–2166. DOI: 10.1098/rstb.2009.0053.
- Turner A and Holmes L (2011) Occurrence, distribution and characteristics of beached plastic production pellets on the island of Malta (central Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 62(2): 377–381. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2010.09.027.
- Unep (2016) *Marine Plastic Debris and Microplastics – Global Lessons and Research to Inspire Action and Guide Policy Change*. Nairobi: United Nations Environment Programme.
- Veerasingam S, Saha M, Suneel V, et al. (2016) Characteristics, seasonal distribution and surface degradation features of microplastic pellets along the Goa coast, India. *Chemosphere* 159: 496–505. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.06.056.
- Veneman WJ, Spaink HP, Brun NR, et al. (2017) Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 190: 112–120. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.06.014.
- von Moos N, Burkhardt-Holm P and Köhler A (2012) Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology* 46(20): 11327–11335. DOI: 10.1021/es302332w.
- Walkinshaw C, Lindeque PK, Thompson R, et al. (2020) Microplastics and seafood: lower trophic organisms at highest risk of contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 190: 110066. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.110066.
- Wan Z, Wang C, Zhou J, et al. (2019) Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. *Chemosphere* 217: 646–658. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.070.
- Williamst AT and Simmons SL (1997) Estuarine Litter at the River/Beach Interface in the Bristol Channel, United Kingdom. *Journal of coastal research* 13(4): 1159–1165.

- Wright SL, Thompson RC and Galloway TS (2013) The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution* 178: 483–492. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- Xia J, Lu L, Jin C, et al. (2018) Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 209: 1–8. DOI: 10.1016/j.cbpc.2018.03.007.
- Xu C, Li X, Jin M, et al. (2018) Early life exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to synthetic pyrethroids and their metabolites: a comparison of phenotypic and behavioral indicators and gene expression involved in the HPT axis and innate immune system. *Environmental Science and Pollution Research* 25(13): 12992–13003. DOI: 10.1007/s11356-018-1542-0.
- Xu T, Chen L, Hu C, et al. (2013) Effects of acute exposure to polybrominated diphenyl ethers on retinoid signaling in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 35(1): 13–20. DOI: 10.1016/j.etap.2012.10.004.
- Zhu B, Wang Q, Shi X, et al. (2016) Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae. *Chemosphere* 144: 1646–1654. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.056.

Webographie

<https://fr.wikipedia.org/>

<https://www.aquaportail.com/>