

Quels sont les impacts des microplastiques sur le système immunitaire des larves de poisson-zèbre (*Danio rerio*) ?

PIETTE Mathilde

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Écologie

Promoteurs : Professeur P. Kestemont (URBE – UNamur)

Docteur V. Cornet (URBE – UNamur)

Année scolaire 2021-2022

Abstract

Microplastics (MPs) are pollutants that are currently the subject of much debate about their presence and potential toxicity in the environment. They are widely found in all types of ecosystems and a large number of studies on the subject have shown that MPs are capable of being ingested and/or filtered by organisms.

In this thesis, we focused on the effects of MPs on the immune system of larval zebrafish (*Danio rerio*) before and after exposure to a bacterial challenge. To do this, the larvae were exposed to two concentrations (100 and 1000µg/L) of 5µm polystyrene (PS) microbeads before (0-4dpf) and after mouth opening (4-8dpf and 0-8dpf). Then, a bacterial challenge (*Aeromonas Salmonicida achromogenes*) was carried out at 8 dpf on half of the larvae, knowing that, in the environment, additives and bacteria can adhere to the surface of these MPs. This challenge is performed in order to stimulate the immune system of the zebrafish larvae. The results indicated that, firstly, the survival of zebrafish larvae was greater when exposed to 0-4 dpf MPs with or without pathogenic bacteria. Secondly, it appears that exposure to PMs after mouth opening causes an increase in the expression of genes related to apoptosis (*bcl2*), immunity (*illβ*, *nfkB*) and the activity of enzymes related to detoxification (GST) and metabolism (LDH). When a bacterial challenge is added to stimulate the immune system showing increased expression of an immune gene (*mipo*) in larvae exposed to 1000µg/L of 4-8dpf and a detoxification gene (*cat*) in larvae exposed to 1000µg/L of 0-8dpf. However, a gene involved in the establishment of the microbiota (*fiab*) saw its expression decrease when exposed to 100µg/L. All these results showed that MPs, whether or not associated with bacteria, induced oxidative stress of varying degrees capable of damaging fish tissue. This damage caused either by stress or by lesions linked to the ingestion of the MPs causes inflammation and/or infection, thus activating the various detoxification mechanisms and the innate immunity of the larvae. Finally, the normalized fold change of gene expression was calculated to determine the impact of the presence of pathogenic bacteria on the different systems. The latter did indeed show that the bacterium stimulated the immune system and metabolism of zebrafish larvae by increasing the expression of certain genes (*nfkB*, *illβ* and *hkl1*) in larvae that had been exposed to 0-4 dpf MPs. This would reveal the presence of MPs on the surface of the larvae causing skin lesions and allowing the entry of bacteria into the body.

Résumé

Les microplastiques (MPs) sont des polluants qui font actuellement l'objet de nombreux débats à propos de leur présence et de leur toxicité potentielle dans l'environnement. Ils sont largement retrouvés dans tous les types d'écosystèmes et un grand nombre d'études sur le sujet a mis en évidence que les MPs étaient capables d'être ingérés et/ou filtrés par les organismes.

Dans ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur les effets des MPs sur le système immunitaire des larves de poisson-zèbre (*Danio rerio*) avant et après l'exposition à un challenge bactérien. Pour cela, les larves ont été exposées à deux concentrations (100 et 1000µg/L) de microbilles de polystyrène (PS) de 5 µm avant (0-4jpf) et après l'ouverture de la bouche (4-8jpf et 0-8jpf). Puis, un challenge bactérien (*Aeromonas Salmonicida achromogenes*) a été réalisé à 8jpf sur la moitié des larves, sachant que, dans l'environnement, des additifs et des bactéries peuvent adhérer à la surface de ces MPs. Ce challenge est réalisé dans le but de stimuler le système immunitaire des larves de poisson-zèbre. Les résultats ont indiqué que, d'abord, la survie des larves de poisson-zèbre était plus grande lors d'une exposition aux MPs de 0-4jpf associée ou non à une bactérie pathogène. Ensuite, il semblerait que l'exposition aux MPs après l'ouverture de la bouche cause une augmentation de l'expression des gènes liés à l'apoptose (*bcl2*), à l'immunité (*il1β*, *nfkb*) et de l'activité d'enzymes liés à la détoxification (GST) et au métabolisme (LDH). Lorsqu'un challenge bactérien est ajouté afin de stimuler le système immunitaire montrant ainsi l'augmentation de l'expression d'un gène immunitaire (*mpo*) chez les larves exposées à 1000µg/L de 4-8jpf et d'un gène de détoxification (*cat*) chez les larves exposées à 1000µg/L de 0-8jpf. Cependant, un gène impliqué dans la mise en place du microbiote (*fiaf*) voit son expression diminuer lors d'une exposition à 100µg/L. Tous ces résultats ont permis de mettre en évidence que les MPs associés ou non à une bactérie induisaient un stress oxydatif plus ou moins important capable d'endommager les tissus des poissons. Ces dommages causés soit par le stress soit par les lésions liées à l'ingestion des MPs causent une inflammation et/ou une infection activant ainsi les différents mécanismes de détoxification et l'immunité innée des larves. Enfin, le fold change normalisé de l'expression des gènes a été calculé afin de déterminer l'impact de la présence d'une bactérie pathogène sur les différents systèmes. Ces derniers ont montré effectivement que la bactérie stimulait le système immunitaire et le métabolisme des larves de poisson-zèbre en augmentant l'expression de certains gènes (*nfkb*, *il1β* et *hk1*) chez les larves ayant été exposé aux MPs de 0-4jpf. Cela permettrait de mettre en évidence la présence de MPs à la surface des larves causant ainsi des lésions cutanées et permettant l'entrée des bactéries dans l'organisme.

Table des matières

| | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Introduction..... | 5 |
| 1.1 | La pollution..... | 5 |
| 1.2 | La pollution plastique | 6 |
| 1.3 | Les microplastiques | 9 |
| 1.3.1 | Généralités | 9 |
| 1.3.2 | Accumulation des MPs dans l'environnement | 10 |
| 1.3.3 | Les impacts des MPs sur les organismes aquatiques | 12 |
| 1.3.3.1 | Généralités | 12 |
| 1.3.3.2 | Impacts des MPs sur les poissons | 13 |
| 1.4 | Le poisson-zèbre, <i>Danio rerio</i> | 23 |
| 1.5 | Objectifs..... | 28 |
| 2 | Matériel et méthodes..... | 30 |
| 2.1 | Modèle d'expérimentation et microplastiques utilisés | 30 |
| 2.2 | Reproduction..... | 30 |
| 2.3 | Exposition aux MPs (J0 à J8)..... | 31 |
| 2.4 | Challenge bactérien..... | 33 |
| 2.5 | Prélèvement des larves..... | 34 |
| 2.6 | Analyse de l'expression des gènes par qPCR..... | 34 |
| 2.6.1 | Extraction ARN | 34 |
| 2.6.2 | Traitement DNase | 34 |
| 2.6.3 | Rétro-transcription | 35 |
| 2.6.4 | qPCR..... | 35 |
| 2.7 | Tests enzymatiques | 39 |
| 2.7.1 | Dosage de Bradford | 39 |
| 2.7.2 | Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)..... | 39 |
| 2.7.3 | Mesure de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) | 40 |
| 2.7.4 | Mesure de l'activité de la catalase | 40 |
| 2.8 | Analyses statistiques | 41 |
| 3 | Résultats..... | 43 |
| 3.1 | Effet des MPs sur la survie des larves de poisson-zèbre | 43 |
| 3.2 | Effets des MPs seuls sur l'activité enzymatique des larves de poisson-zèbre..... | 43 |
| 3.2.1 | La lactate déshydrogénase (LDH) | 43 |
| 3.2.2 | La glutathion-S-Transférase (GST) | 44 |
| 3.2.3 | La catalase..... | 44 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 | Effets de l'exposition des MPs combinés à un challenge bactérien sur l'activité spécifique des enzymes chez les larves de poisson-zèbre | 45 |
| 3.4 | Effets de l'exposition des MPs seuls sur l'expression relative des gènes..... | 45 |
| 3.4.1 | Les gènes de détoxification et apoptotiques | 45 |
| 3.4.2 | Les gènes liés aux fonctions immunitaires | 46 |
| 3.4.3 | Les gènes liés à la mise en place du microbiote | 47 |
| 3.4.4 | Le gène marqueur de la neurotoxicité..... | 47 |
| 3.4.5 | Les gènes liés au métabolisme..... | 47 |
| 3.4.6 | Analyses en composantes principales de l'expression relatives des gènes lors d'une exposition aux MPs..... | 48 |
| 3.5 | Effets de l'exposition des MPs combinés à un challenge bactérien sur le niveau d'expression relative des gènes..... | 49 |
| 3.5.1 | Les gènes de détoxification et apoptotique..... | 49 |
| 3.5.2 | Les gènes liés aux fonctions immunitaires | 51 |
| 3.5.3 | Les gènes liés à la mise en place du microbiote | 52 |
| 3.5.4 | Le gène marqueur de la neurotoxicité..... | 53 |
| 3.5.5 | Les gènes liés au métabolisme..... | 53 |
| 3.5.6 | Analyse en composantes principales des expressions relatives des gènes | 53 |
| 4 | Discussion..... | 56 |
| 4.1 | La survie..... | 56 |
| 4.2 | L'exposition aux MPs affecte l'immunité innée..... | 57 |
| 4.3 | L'association d'une bactérie pathogène aux MPs affecte l'immunité innée | 60 |
| 4.4 | L'exposition aux MPs associée ou non à une bactérie pathogène impacte d'autres mécanismes et systèmes physiologiques | 63 |
| 4.4.1 | Les systèmes de détoxification | 63 |
| 4.4.1.1 | Les activités de la GST et la catalase..... | 63 |
| 4.4.1.2 | Les gènes liés à la détoxification et à l'apoptose..... | 64 |
| 4.4.2 | Le métabolisme..... | 68 |
| 4.4.2.1 | L'activité de la LDH..... | 68 |
| 4.4.2.2 | Les gènes liés au métabolisme..... | 69 |
| 4.4.3 | Le système nerveux..... | 71 |
| 4.5 | L'analyse en composantes principales de l'expression relative des gènes | 71 |
| 5 | Conclusion et perspectives..... | 73 |
| 6 | Bibliographie..... | 76 |
| 7 | Remerciements..... | 86 |
| 8 | Annexes..... | 87 |

1 Introduction

1.1 La pollution

Depuis que l'Homme est sur la Terre, celle-ci a subi de nombreux changements, la population induite par l'Homme ne cesse d'augmenter (Figure 1) et a doublé au cours du dernier siècle (Finley 2020). Pour subvenir aux besoins de la population, il a fallu détruire beaucoup d'écosystèmes pour les remplacer par des cultures, des habitations, des magasins, etc. (Finlayson 2018; Windsor et al. 2019).

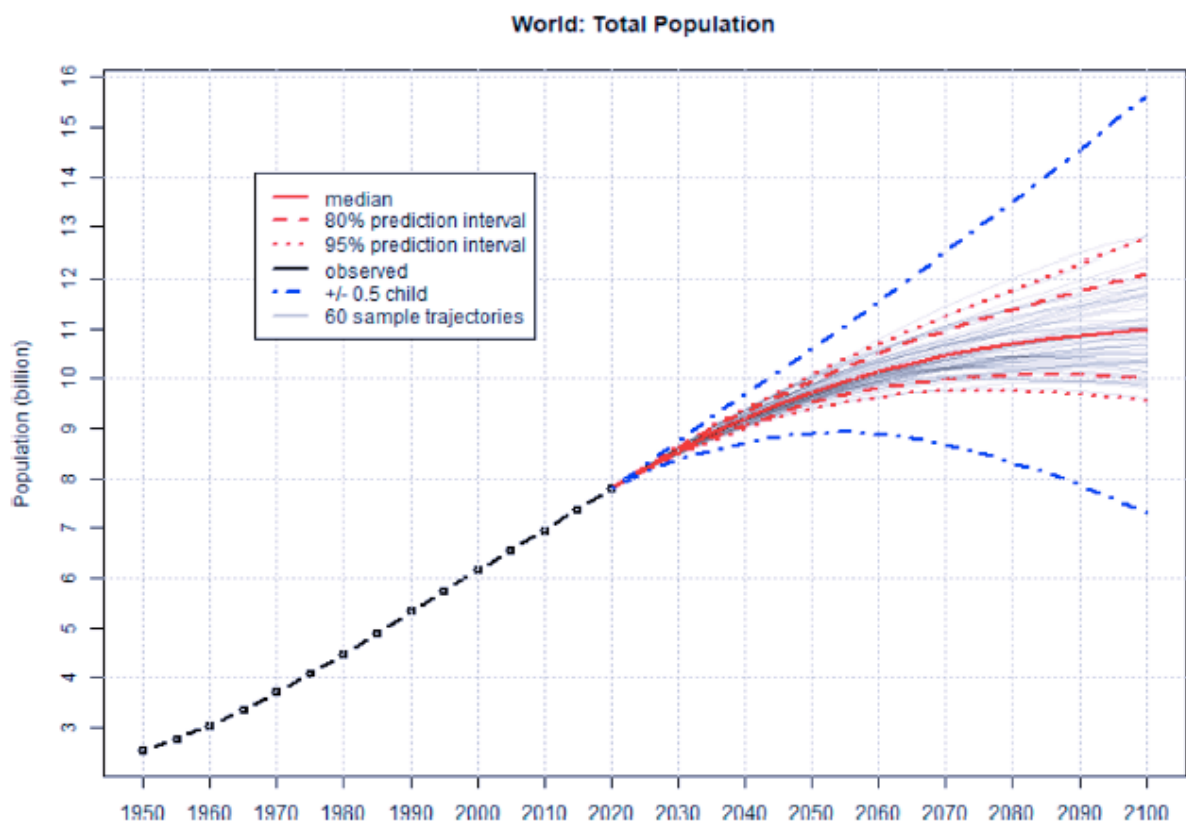


Figure 1 : Graphique représentant les prédictions de l'augmentation de la population mondiale à partir de 1950 jusqu'en 2100 (Finley 2020).

Un des changements principaux auquel est soumise la planète est celui de la pollution sous toutes ses formes car elle peut être par exemple organique, chimique, thermique, lumineuse (Lavers et Bond 2017; Potters 2013). Ce phénomène, avec les changements des habitats naturels, voit ses impacts sur l'environnement augmenter rapidement. De ce fait, les différents types de pollutions se trouvent au cœur de nombreux débats tentant de trouver des solutions afin de diminuer leurs effets qui menacent la biodiversité terrestre et aquatique (Millennium Ecosystem Assessment (Program) 2005).

1.2 La pollution plastique

Le type de pollution qui préoccupe de plus en plus la communauté scientifique est celui de la pollution plastique (Andrady 2011; Sharma et Chatterjee 2017). En effet, par l'utilisation quotidienne de plastique, les industries et la société ne cessent d'augmenter leur demande en plastique entraînant un accroissement de la production d'environ 10 millions de tonnes supplémentaires entre 2018 et 2019 (Figure 2) (« Plastics - The facts » 2020). En 2019, 368 millions de tonnes de plastique ont été produites dans le monde alors qu'en 2018, 359 millions de tonnes étaient produites (Andrady 2011; Sharma et Chatterjee 2017).

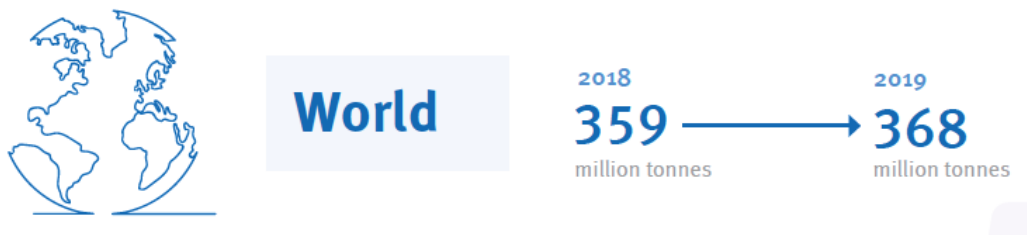


Figure 2 : Quantité de plastique produite mondialement en 2018 et 2019 indiquant une augmentation d'environ 10 millions de tonnes (« Plastics - The facts » 2020).

Puisque l'espèce humaine est à l'origine de ces déchets, certains scientifiques s'entendent pour dire que ce sont des marqueurs concernant l'ère de l'Anthropocène dont les géologues parlent de plus en plus souvent (Geyer, Jambeck, et Law 2017). En effet, les plastiques sont utilisés à diverses fins tels que les emballages de nourritures et de boissons (Andrady 2011; « Plastics - The facts » 2020). A eux seuls, ils représentent environ 146 millions de tonnes de plastique par an (Figure 3) et pratiquement la même quantité se retrouve dans les déchets car ces emballages en plastique ne sont utilisés qu'un court instant avant d'être jetés (Ritchie et Roser 2018). Un cinquième des plastiques produits sont destinés au secteur de la construction (Figure 3). Les industries textile et cosmétique emploient, elles aussi, des plastiques mais dans de moindre proportion. Pourtant, il s'agit d'une des principales sources de contamination des eaux (Andrady 2011; Lavers et Bond 2017; Ritchie et Roser 2018).

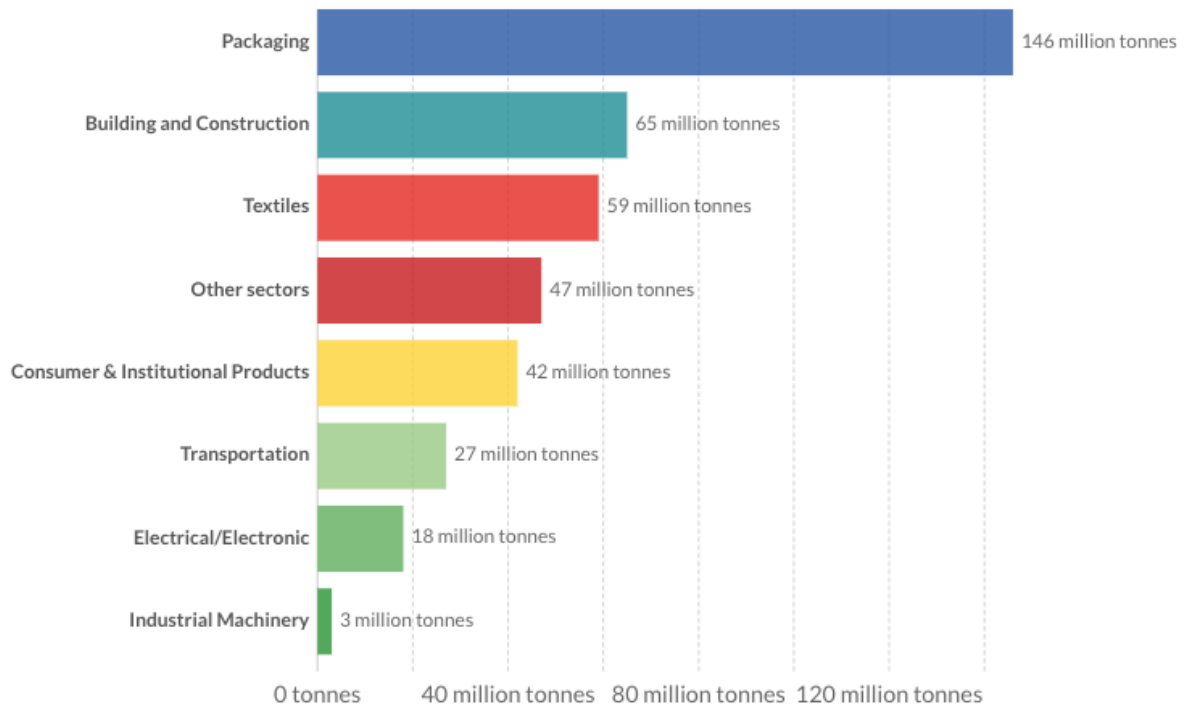


Figure 3 : Quantité de plastique utilisée dans les différents secteurs industriels selon les données recensées en 2015 (Ritchie et Roser 2018).

Une raison de cette grande utilisation de plastiques est le fait que ce soit un matériel bon marché. Ils sont également très légers et très résistants dans le temps (Andrady 2011; Foley et al. 2018; Ritchie et Roser 2018). Leur dégradation est lente et dépend du type, ou du mélange, de polymères utilisés pour la fabrication du plastique, citons notamment : le caoutchouc (CTR), le polychlorure de vinyle (PVC), le polystyrène (PS), le polypropylène (PP), le polyéthylène téréphtalate (PET). Pour les emballages, les plastiques s'avèrent être un assemblage de PE (polyéthylène), PP et PET alors que dans la construction, le polymère le plus utilisé est le PVC (Capolupo et al. 2020; Geyer, Jambeck, et Law 2017; Windsor et al. 2019).

Après leur utilisation, les plastiques peuvent être traités de trois façons : le recyclage, l'incinération ou le stockage dans des décharges (Figure 4)(Geyer, Jambeck, et Law 2017; « Plastics - The facts » 2020). Dans le cas de l'incinération (pyrolyse), il y a un certain coût au niveau de l'environnement à cause des émissions de gaz à effet de serre que cela entraîne. Mais l'énergie dégagée par cette dégradation thermique peut être utilisée, ou non, afin de produire de l'électricité. Lorsque les plastiques sont placés dans des décharges, ils s'accumulent et sont soumis aux événements météorologiques et aux UVs (Geyer, Jambeck, et Law 2017; Sharma et Chatterjee 2017). La décomposition des matériaux en plastique prend des années une fois dans l'environnement. Leur dégradation peut se faire alors via différents processus physiques, chimiques et biologiques (biodégradation à l'aide de micro-organismes), par la lumière

(photodégradation), par l'eau (hydrolyse), par des températures élevées (dégradation thermique) ou encore via l'oxydation à des températures raisonnables (Andrady 2011). Les débris de plastiques sont alors fragilisés contribuant à leur morcellement en fragments plus petits et plus légers facilitant ainsi leur transport atmosphérique, c'est-à-dire par les airs. Ce type de transport peut s'effectuer sur de grandes distances et constitue une des voies par lesquelles les plastiques finissent dans l'environnement. Ces polluants pénètrent tant les écosystèmes terrestres qu'aquatiques par différents canaux notamment via les cours d'eau, les eaux profondes, les eaux de ruissellement et les glaciers (Rochman et Hoellein 2020; Windsor et al. 2019). Dans les milieux aquatiques, les déchets de plastique s'accumulent au niveau des gyres en raison de leur propriété de flottabilité, et ce, peu importe leur taille. Les gyres sont des endroits où les courants marins se rejoignent et environ 268 000 tonnes de plastiques s'y trouvent alors qu'environ 10 millions de tonnes de plastiques se trouvent dans les écosystèmes marins (Eriksen et al. 2014; Lavers et Bond 2017; Sharma et Chatterjee 2017). Une étude de Bucknall (2020) a montré qu'environ 1,4 à 3,6% des plastiques produit annuellement terminent au niveau des océans, échappant donc au recyclage ou à l'incinération.

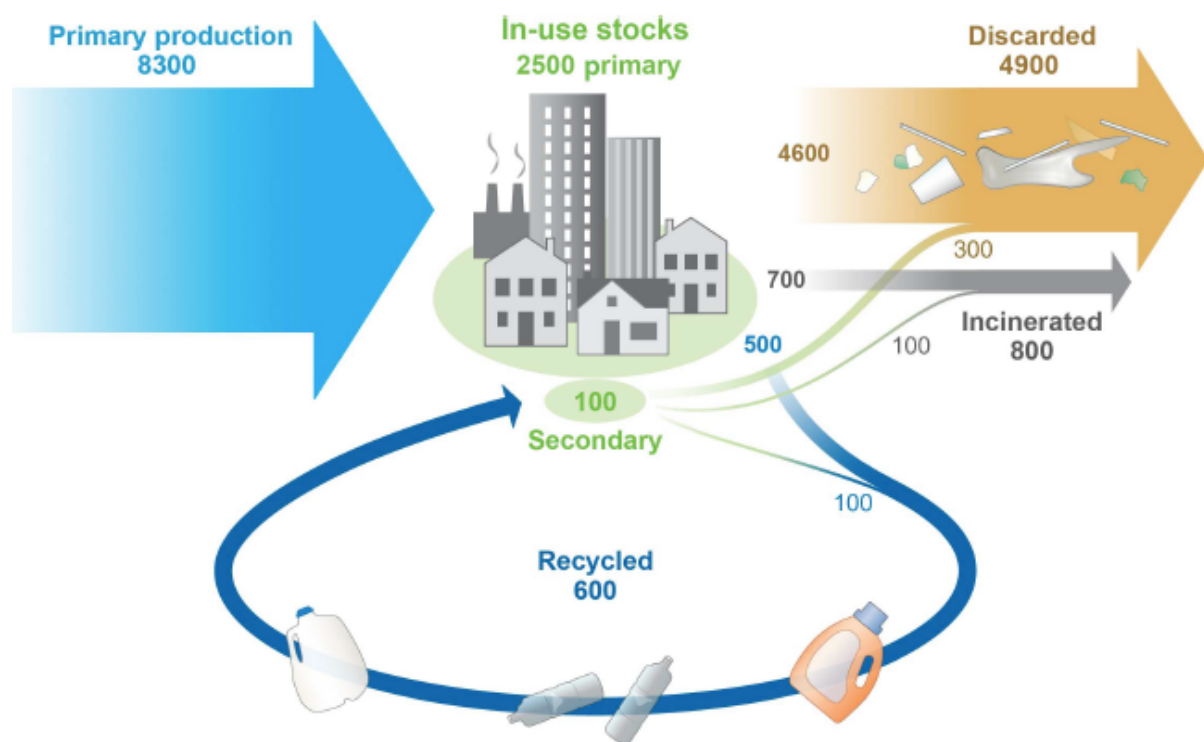


Figure 4 : Les trois techniques de gestion des déchets plastiques : le recyclage, l'incinération et mise en décharge. Les chiffres sur l'image représentent les quantités en millions de tonnes (Geyer et al. 2017).

1.3 Les microplastiques

1.3.1 Généralités

Il existe différents types de plastiques caractérisés par leur taille : macroplastiques (supérieures à 1m), mésoplastiques (entre 2,5 et 5cm), microplastiques (inférieures à 5mm) et nanoplastiques (inférieures à 1 μ m ou 100nm). La gamme de taille des nanoplastiques est néanmoins fortement discutée (Capolupo et al. 2020; Windsor et al. 2019).

Dans le cadre de cette recherche, ce sont les microplastiques (MPs) qui seront abordés car étant donné leur abondance actuelle, leurs impacts sur les organismes vivants, ils se retrouvent au cœur de nombreuses études. Ces MPs sont issus de secteurs terrestres car ils étaient utilisés dans les produits cosmétiques et de lessive, actuellement interdits. Ils correspondent également aux constituants de base utilisés dans des matériaux ou objets de grande taille (pneus ou fibres textiles) ou aux particules venant des poussières émises par les usines. Ce sont les MPs primaires et ils représentent 15% de la quantité totale de plastique finissant dans le milieu aquatique. De plus, les MPs peuvent provenir de la dégradation de macroplastiques via des phénomènes naturels (intempéries) ou via des différents mécanismes décrits ci-dessus. Ce sont les MPs secondaires. En général, ils ont une taille légèrement plus grande que les MPs primaires et proviennent des déchets contenus dans une décharge ou dans l'environnement (Boucher et Friot 2020; Laskar et Kumar 2019; Lassen et al. 2015; Lehtiniemi et al. 2018). Dans le milieu naturel, les MPs produits peuvent avoir plusieurs formes telles que des billes, des fibres ou des fragments, les fibres étant la forme la plus répandue (Bucci, Tulio, et Rochman 2020; de Sá et al. 2018).

Comme pour tous les plastiques, les MPs sont composés d'un seul ou de plusieurs polymères (Capolupo et al. 2020). Certaines études, comme celles menées par Franzellitti et al. (2019), Capolupo et al. (2020) et Jovanović (2017), ont démontré que des substances toxiques appelées additifs peuvent adhérer aux MPs, bien qu'ils ne soient pas systématiquement fixés à ces derniers. Ils peuvent passer d'un plastique à un autre ou rester libres dans l'environnement. Des exemples d'additifs sont les bisphénols A, les polychlorobiphényles (PCBs), le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) (Jin et al. 2018; Sharma et Chatterjee 2017). Ces composés sont donc, avec les MPs, au centre de beaucoup de recherches laboratoires dont celles citées ci-dessus pour lesquelles, il est essentiel de considérer toutes leurs caractéristiques

afin que ce soit le plus réaliste possible. Cela signifie qu'il faut savoir le type de MPs et/ou d'additifs, la composition des MPs, leurs concentrations et leurs temps d'exposition (Bucci, Tulio, et Rochman 2020). En effet, nous pouvons retrouver des additifs dans différentes étapes du cycle du plastique tel qu'au cours de la production, afin de les rendre plus résistants, plus flexibles par exemple (Franzellitti et al. 2019). Dans la plupart des études incluant ces composés chimiques, les chercheurs tentent de mettre en évidence les impacts physiologiques sur la biodiversité. Par exemple, une étude menée sur le bisphénol A par Oehlmann et al. (2009) a montré que l'exposition des organismes aquatiques à ce composé cause des dérèglements au niveau endocrinien impactant aussi la reproduction, la croissance, le système immunitaire et l'expression génique comme cela a été mis en évidence dans l'étude de DeCourten et al. (2020).

1.3.2 Accumulation des MPs dans l'environnement

Ces MPs peuvent, par leurs petites tailles, finir dans l'environnement qu'il soit terrestre, aquatique ou aérien sachant qu'ils sont produits essentiellement sur terre. Les différentes voies par lesquelles ils pénètrent l'environnement ont déjà été abordées plus haut et elles laissent apparaître un nouveau concept : le cycle du plastique (Figure 5). Celui-ci peut être mis en parallèle des cycles biogéochimiques (eau, carbones, azote, phosphore) étant des notions essentielles en écologie. En effet, ces cycles reprennent les différents chemins qu'empruntent les éléments chimiques pour se disperser dans l'environnement ainsi que pour se façonner. Par conséquent, le cycle du plastique reprend les différentes voies employées par ce matériau depuis sa production jusqu'à son accumulation dans l'environnement (Rillig et Lehmann 2020; Windsor et al. 2019).

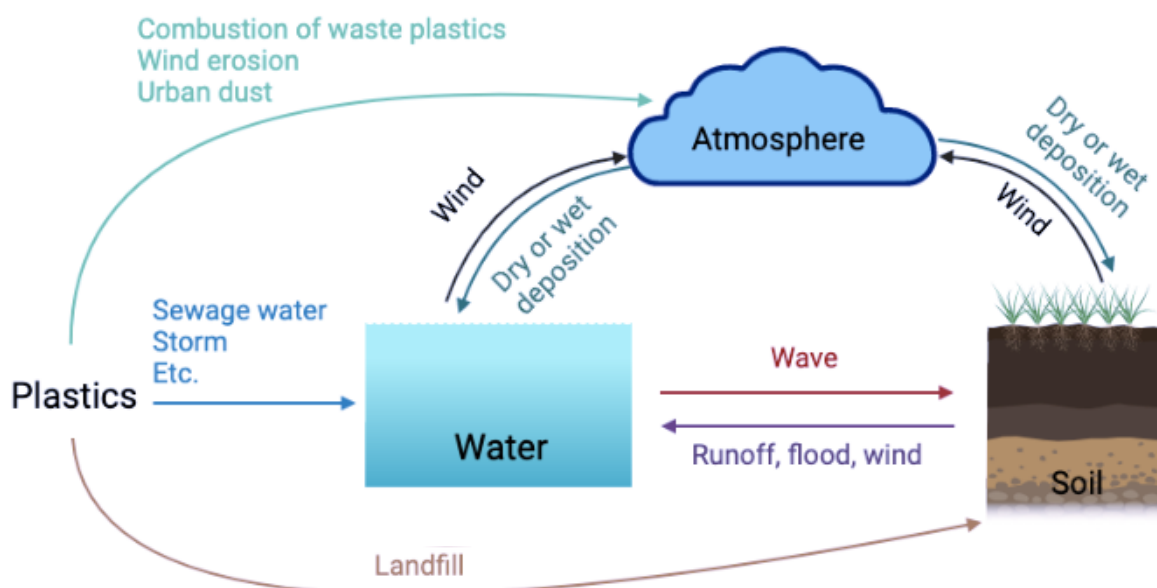


Figure 5 : Moyens de transports (flèches) du plastique permettant ainsi la translocation de ce matériau synthétique dans les différents écosystèmes (D'après Li et al. 2020).

D'après des études (de Souza Machado et al. 2018; Rillig et Lehmann 2020) portant sur ce cycle du plastique, les scientifiques semblent s'accorder en disant que l'écosystème terrestre est le premier écosystème où les MPs s'accumulent car ils sont produits sur Terre. De plus, ils ont mis en évidence que les principaux moyens de transport de ces MPs se font via les airs (vents) et via les eaux (ruissellement, eaux usagées, vagues, etc.). En effet, il semblerait que 33% de la pollution viennent de l'atmosphère et 44% venant de la terre sont transportés par les eaux, alors que seulement 12% de la pollution vient des eaux maritimes (Potters 2013). Grâce à ces types de transports, les microdébris de plastiques peuvent parcourir plusieurs mètres voire des kilomètres et passer d'un écosystème à l'autre (Rochman et Hoellein 2020; Windsor et al. 2019).

Néanmoins, une fois dans les océans, ces MPs vont soit avoir une densité inférieure à celle de l'eau de mer, donc ils restent en surface et peuvent ainsi être emportés par les courants marins ; soit leur densité est plus importante et ils finissent dans le fond des océans (Boucher et Friot 2020). Il semble néanmoins important de notifier que de moins en moins de MPs se trouvent à la surface au cours du temps, ce qui pourrait être dû à la présence de micro-organismes ou d'algues sur la surface des MPs les faisant couler. Une autre possibilité serait qu'ils se soient dégradés à cause de leur exposition constante aux UVs, leur ingestion par des organismes aquatiques ou encore par la biodégradation (Andrady 2011; Eriksen et al. 2014). Cela permettrait d'expliquer leur élimination ou leur réduction en des tailles plus infimes les rendant donc inaccessibles aux divers moyens de dépollutions existants dans les milieux aquatiques (Eriksen et al. 2014). Nous pouvons donc mettre en évidence que le taux d'altération des plastiques dépend de leur taille mais aussi de l'endroit où ils se trouvent car ce taux diffère selon le fait qu'ils soient sur la plage, dans le fond ou à la surface des océans (Andrady 2011; Rochman et Hoellein 2020; Windsor et al. 2019).

D'autres systèmes participent à ce cycle du plastique mais ils ne font l'objet que de peu d'études comme l'indiquent Windsor et al. (2019). Parmi ces derniers se trouvent tous les réseaux de rivières mais également les zones du monde recouvertes de glace, car ce sont des zones capables de retenir les MPs jusqu'à ce qu'elles se mettent à fondre. Comme pour les autres systèmes constituant le cycle du plastique, ceux dont nous venons de parler constituent un réservoir important (Rochman et Hoellein 2020; Windsor et al. 2019).

Pour conclure ce point traitant de l'accumulation des MPs dans l'environnement, il semblerait que les plastiques constituent une menace pour tous les environnements. C'est principalement dû au fait qu'ils ont la possibilité de se mouvoir sur de longues distances leur permettant ainsi de coloniser les différents milieux qu'ils soient terrestres, aquatiques ou encore aériens (Rillig et Lehmann 2020). Néanmoins, dans ce travail, nous allons principalement attirer votre attention sur l'accumulation des MPs dans les environnements aquatiques. À la suite de cela, il semble important d'aborder les impacts de ces plastiques sur la faune aquatique.

1.3.3 Les impacts des MPs sur les organismes aquatiques

1.3.3.1 Généralités

Dans le milieu aquatique, les MPs sont en contact avec la faune aquatique comme les macroinvertébrés (Foley et al. 2018), les mollusques (von Moos, Burkhardt-Holm, et Köhler 2012), les arthropodes (Foley et al. 2018) et les poissons (Jin et al. 2018). Les impacts causés par les MPs sur ces organismes sont variables et pour la plupart du temps délétères. De plus, la gravité des impacts est plus grande avec la diminution de la taille des MPs, car plus ils sont petits, plus ils diffusent dans l'entièreté du corps via le sang (Franzellitti et al. 2019; Jovanović 2017; Raza 2018). En raison de leur grande disponibilité dans l'environnement, les MPs sont facilement accessibles aux animaux de la chaîne trophique qui les ingèrent (Rochman et Hoellein 2020).

Cette ingestion peut être directe ou indirecte. Nous qualifierons une ingestion de directe lorsque des MPs venant du milieu environnant entrent à l'intérieur des organismes aquatiques soit par filtration de l'eau soit par confusion avec leurs proies naturelles. Tandis qu'elle est considérée comme indirecte quand des individus des niveaux trophiques supérieurs mangent des individus des niveaux inférieurs ayant eux-mêmes ingéré des MPs (Bucci, Tulio, et Rochman 2020; Capolupo et al. 2020; Horton et al. 2018). Le fait qu'ils s'accumulent au sein de la chaîne trophique correspond au phénomène de bioamplification. Ce concept ne doit pas être confondu avec celui de bioaccumulation correspondant à l'accumulation de polluants dans les tissus d'un organisme, et non au sein de la chaîne trophique (Miller, Hamann, et Kroon 2020).

Puis, grâce à l'attention portée aux MPs et à leurs impacts sur la biodiversité aquatique, il a été mis en évidence que l'ingestion de ces derniers cause des dégâts au niveau des principales fonctions physiologiques, c'est-à-dire les systèmes digestifs et respiratoires (Bucci, Tulio, et Rochman 2020; Capolupo et al. 2020). Les impacts sur ces derniers sont directs car ils sont en contact direct avec les MPs lors de leur entrée dans l'organisme. Ces effets directs peuvent, eux-mêmes, causer d'autres problèmes qui apparaissent comme indirects. Ils peuvent être illustrés par une réduction de la reproduction, de la croissance de l'organisme ou des changements au niveau du comportement, par exemple. Cependant, il semblerait qu'une grande partie des études disponibles, comme celles de Franzellitti et al. (2019) et de Wright, Thompson, et Galloway (2013), aient surtout été menées sur les mollusques, les arthropodes et les poissons mettant en évidence les effets néfastes de tous les MPs présents dans leur environnement. Pour chacun de ces organismes, certains des dommages causés par l'exposition aux MPs sont similaires. En effet, d'après Anagnosti et al. (2021), Eriksen et al. (2014), Foley et al. (2018), le blocage du tractus digestif et des branchies est le principal impact des MPs avec des lésions au niveau des différents tissus pour les organismes. Bien que beaucoup de ces impacts soient similaires entre les organismes du milieu aquatique, nous nous concentrerons spécifiquement sur ceux touchant les poissons.

1.3.3.2 Impacts des MPs sur les poissons

Les poissons sont des vertébrés aquatiques étant classifiés en deux groupes : les chondrichthyens comprenant les requins, les raies et les chimères, et les ostéichthyens soit les poissons osseux. Il est possible de trouver ces clades dans tous les environnements aquatiques tant en surface qu'en profondeur et tant en zone dulcicole qu'en zone marine (Flot 2018). Les MPs sont ingérés ou bioamplifiés à travers la chaîne trophique et cela augmente avec l'augmentation du temps d'exposition. Cela dépend également de s'ils se trouvent à la surface ou dans les profondeurs des masses d'eau mais également du type de MPs. L'ingestion n'est pas le seul moyen d'entrée pour ces débris, bien qu'il s'agisse du principal, car ils entrent également par les branchies intervenant dans la respiration (Anagnosti et al. 2021; Horton et al. 2018; Raza 2018).

a. Impacts sur la respiration

Comme mentionné ci-dessus, la respiration chez les poissons se fait via les branchies (Figure 6). C'est dans ces dernières qu'ont lieu les échanges gazeux permettant ainsi le renouvellement en oxygène du sang et le rejet du CO₂. Cela est possible parce que les branchies sont composées de capillaires, en plus des lamelles branchiales. Néanmoins, les échanges de O₂/CO₂ ne sont pas les seuls à exister, il y en a beaucoup d'autres et certains de ceux-ci ont lieu par voie cutanée car les branchies jouent également un rôle dans l'excrétion de certains composés (Flot 2018; Sardet, Pisam, et Maetz 1979).

Des études menées sur des poissons-zèbres (Jin et al. 2018) et sur *Sebastes schlegelii* (Yin et al. 2018) ont montré que lors de la respiration, les MPs peuvent passer par les opercules et s'agglutiner au niveau des branchies. Il est aussi possible que ceux-ci s'accumulent au niveau de la peau. Dans les deux cas, la respiration et les échanges gazeux sont diminués, parfois même de façon considérable entraînant une détresse respiratoire. Pour cela, elles ont exposé les organismes pendant 14 jours à des billes de PS de deux tailles et concentrations différentes pour l'étude de Jin et al. (2018) (0,5 et 50µm, 100 et 1000µg/L) et de 15µm à une concentration de 10⁶ microsphères/L pour l'étude de Yin et al. (2018). La concentration en O₂ n'est alors pas suffisante pour assurer l'oxygénation des tissus du poisson entraînant une hypoxie. De plus, Yin et al. (2019) au cours d'une étude faisant suite à celle de 2018, ont mis en évidence une augmentation de la teneur d'ammoniac, or l'accumulation de ce composé est dangereuse et son excrétion demande de l'O₂. Pour faire face à ces altérations que sont le manque d'O₂ et l'augmentation de NH₃, l'organisme doit utiliser plus d'énergie. Cependant, la production d'énergie est impactée par les MPs ne permettant pas à l'organisme de contrer ces effets ce qui entraîne un stress oxydatif causé par le passage en condition anaérobie ainsi que le maintien de l'hypoxie et de la concentration élevée en NH₃ menant à la mort du poisson (Yin et al. 2019).

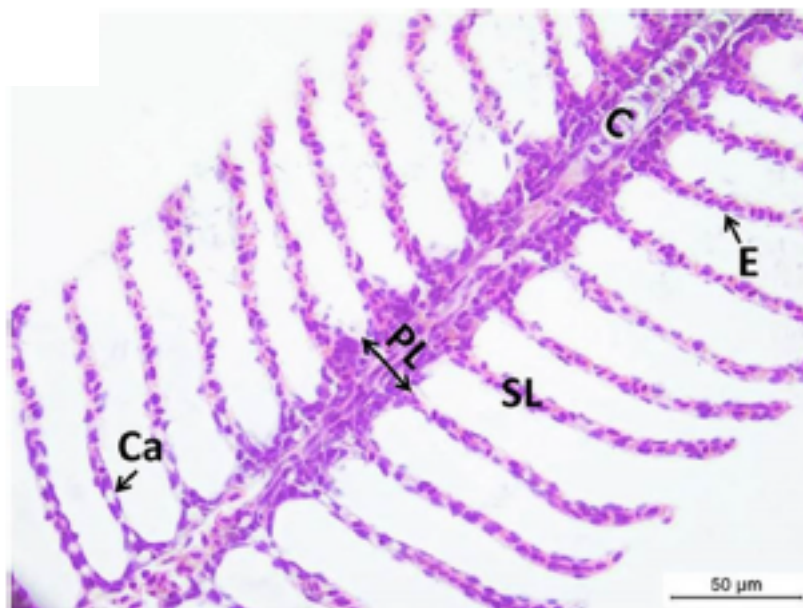


Figure 6 : Histologie des branchies des poissons zèbres (*Danio rerio*). Les branchies sont constituées de cartilage (C), d'une lamelle primaire (PL) et secondaire (SL), de capillaire (lumière du capillaire, Ca) et de cellules épithéliales (Arman 2021).

b. Impacts sur le système digestif

Le deuxième système qui apparaît comme étant le plus touché par les MPs dans les diverses recherches est celui du système digestif (Franzellitti et al. 2019). Effectivement, une grande partie des MPs présents dans le milieu entre dans le poisson avec sa nourriture via le flux d'eau passant par sa bouche. La physiologie de ce système n'est pas différente des autres taxa car, dans l'ordre, il y a la bouche, l'œsophage suivi de l'estomac, de l'intestin et de l'anus. Cependant, l'estomac n'est pas présent chez toutes les espèces de poissons ce qui signifie que la majorité du processus de digestion a lieu au niveau de l'intestin et non de l'estomac. C'est également le site principal de réabsorption des nutriments (Flot 2018; Hamza, Ostaszewska, et Kestemont, 2015). Du point de vue histologique, la paroi du système digestif se compose de quatre tuniques : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire et l'adventice. Par rapport au tractus digestif de l'humain, il est possible de mettre en évidence que les poissons ne possèdent pas la musculaire muqueuse se trouvant sous la muqueuse (Unamur s. d.).

Plusieurs études, comme celles de Foley et al. (2018), Franzellitti et al. (2019) et Yin et al. (2019), ont mis en évidence qu'un impact des MPs sur le système digestif est l'accumulation de ces derniers formant ainsi une structure complexe et causant un élargissement de la lumière intestinale ce qui entraîne le blocage du système digestif menant à son dysfonctionnement. Les études de Raza (2018) et Steer et al. (2017) ont été plus loin en démontrant que les poissons ayant leur intestin rempli de MPs n'étaient plus capables de se nourrir à cause de la sensation de satiété que cela provoque. Or, les MPs ne sont, en aucun cas, nutritifs ce qui mène le poisson dans un état de famine (Raza 2018; Steer et al. 2017; Wright, Thompson, et Galloway 2013). Le fait que le tractus digestif soit saturé active les enzymes digestives afin de digérer le contenu de l'intestin dans le but ensuite d'en absorber les nutriments et de produire de l'énergie. Cependant, Wen et al. (2018) ont mis avant que peu d'énergie était produite car les fonctions digestives et d'absorption ne pourront pas être effectuées convenablement vu qu'il s'agit de MPs. Ces impacts ont été découverts en premier lors d'études menées sur les fibres sachant que ce sont le type de MPs le plus fréquent dans l'environnement (Bucci, Tulio, et Rochman 2020; Franzellitti et al. 2019), bien que l'étude de Wen et al. (2018) ait été réalisée sur des juvéniles de *S. aequifasciatus* exposés pendant 30 jours à 200µg/L de bille de polyéthylène de 70-88µm.

De plus, ces microfibrilles et les microfragments sont, de par leur forme irrégulière, les MPs les plus disposés à causer des lésions permettant leur passage dans la paroi intestinale et

altérant donc la structure de la paroi digestive. Parmi ces altérations, il y a une modification de la taille des microvillosités induisant par conséquent une modification de la surface d'absorption et de la perméabilité de la paroi (Figure 7A) (Ahrendt et al. 2020; Jovanović 2017; Qiao, Deng, et al. 2019).

D'après l'étude de Ahrendt et son équipe (2020) menée sur le poisson *Girella laevis*, il semblerait que suite à l'ingestion de MPs, les microvillosités de l'intestin soient de plus petites tailles et plus gonflées. Il y a également des altérations touchant la première tunique de la paroi intestinale qu'est la muqueuse (Figure 7B) (Jovanović 2017). Cette dernière est, elle-même, constituée de plusieurs couches : (1) l'épithélium comprenant les entérocytes, les goblet cells ou cellules caliciformes et quelques lymphocytes, (2) la lame basale et (3) le chorion ou lamina propria (Unamur s. d.).

Lorsque les poissons ingèrent des MPs, des études ont démontré, notamment celles de Ahrendt et al. (2020), Jovanović (2017) et Qiao, Deng, et al. (2019), que les entérocytes se vacuolisaient, le développement du chorion était plus important et que ce dernier se décollait de l'épithélium. Les lésions subvenues suite à l'entrée des MPs dans le système digestif des poissons s'avèrent être des sites favorables au développement de pathogènes pouvant être à l'origine d'inflammation voire d'infection. Suite à cela, le nombre de cellules caliciformes augmente afin d'accroître la sécrétion de mucus à la surface de la muqueuse de la paroi intestinale (Figure 7C). Ce mucus a pour rôle principal d'assurer le maintien en bonne santé de la muqueuse (Franzellitti et al. 2019; Jin et al. 2018). Cependant, il semblerait que cette sécrétion du mucus diminue fortement lorsque l'individu est exposé aux fibres par rapport à une exposition aux fragments et aux billes (Figure 7D) (Qiao, Deng, et al. 2019). Des cellules immunitaires sont également stimulées afin de produire des composés comme des interférons (IFN) et des cytokines (IL) pour se défendre contre les potentiels pathogènes (Franzellitti et al. 2019; Jin et al. 2018).

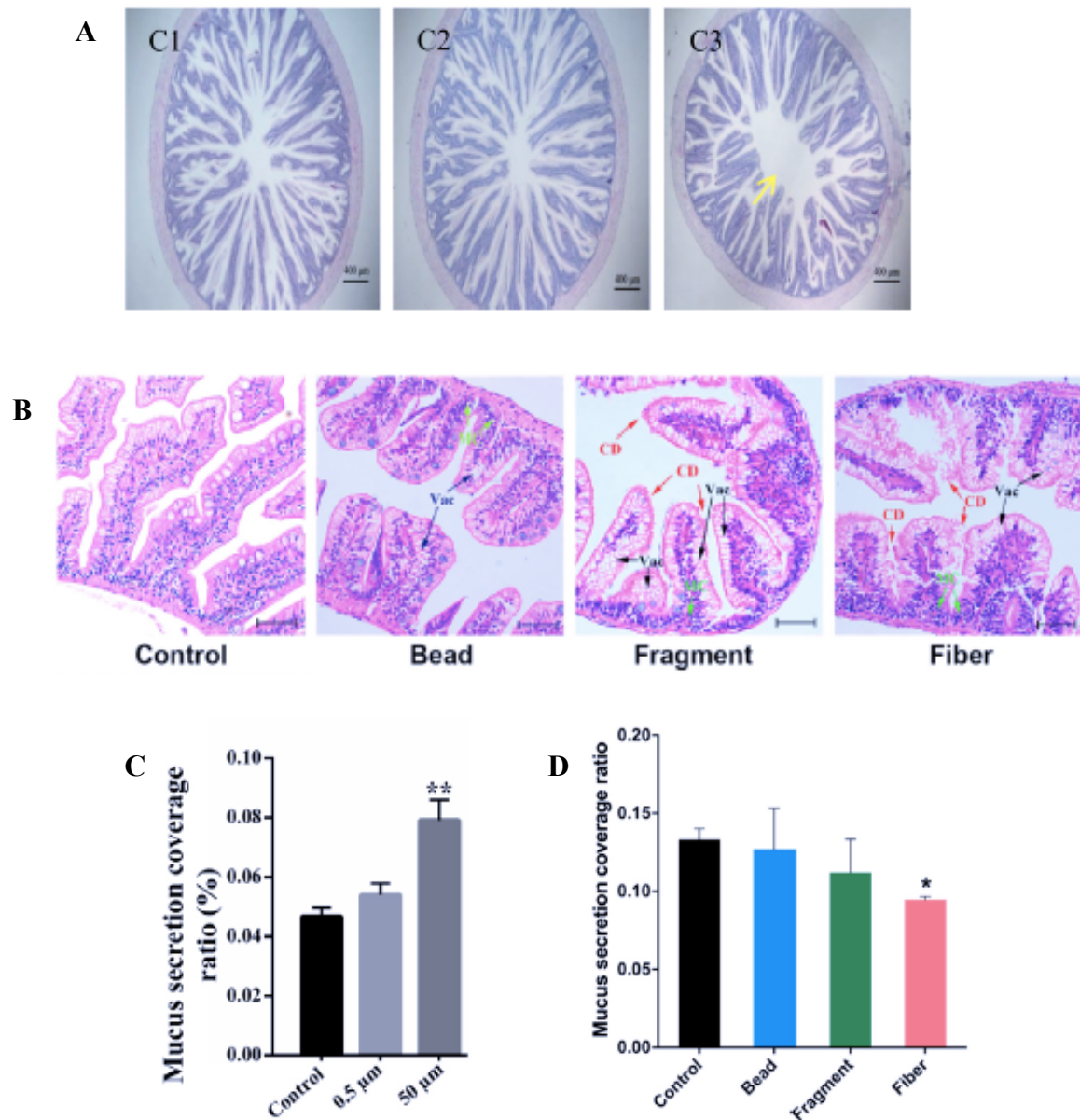


Figure 7 : (A) Coupes transversales du tube digestif de *Sebastes schlegelii* exposé à la condition contrôle (C1), à 0,5 μm (C2) et à 15 μm (C3). Elles montrent que la taille des microvillosités diminue lorsque les poissons sont exposés à 15 μm de polystyrène (PS) réduisant ainsi la surface d'absorption intestinale ; (B) Impacts de différents types de MPs (billes, fragments et fibres) sur la structure histologique du tractus intestinal du poisson-zèbres. Il y a apparition de vacuoles (Vac), de mastocytes (MC), de cassures au niveau de la paroi des cils (CD) ; Impacts des MPs de 0,5 μm et 50 μm (C) et de divers types (D) sur la sécrétion de mucus dans l'intestin. Dans le cas de l'image B et D, l'effet des MPs sont plus importants dans le cas des fibres (Jin et al. 2018 ; Qiao et al. 2019 ; Yin et al. 2019).

c. Impacts sur le microbiote intestinal

Le système digestif est constitué, comme pour la plupart des vertébrés, d'un microbiote gastro-intestinal. Il s'agit d'une communauté microbienne responsable de l'établissement de la muqueuse et en collaboration étroite avec le mucus afin de préserver la santé de l'organisme ainsi que le bon déroulement de la digestion (Jin et al. 2018; Murdoch et Rawls 2019).

Au sein du microbiote intestinal du poisson-zèbre, il est possible de trouver les différents embranchements suivants : *Firmicutes*, *Proteobacteria* (α , β et γ), *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Fusobacteria* (Figure 8B) (Huang et al. 2020; Jin et al. 2018; Qiao et al. 2019; Stephens et al. 2016). Cependant, il est possible que cette composition change selon l'espèce d'intérêt. Par exemple, dans l'étude menée par Huang et son équipe sur le guppy, les *Fusobacteria* n'ont pas pu être observées (Figure 8A) (Huang et al. 2020).

Ce microbiote gastro-intestinal est également impacté négativement par l'ingestion de MPs. En effet, lors de l'accumulation des MPs dans les intestins, l'abondance des différents taxa microbiens varient par rapport à d'autres poissons n'ayant pas été exposé aux MPs, comme l'ont observé Huang et al. (2020), Jin et al. (2018) et Qiao et al. (2019). Ce changement au niveau du microbiote porte le nom de dysbiose intestinale. Pour une même espèce, il est possible que l'abondance des différentes communautés microbiennes lors d'une exposition aux MPs varie entre les différentes populations (Huang et al. 2020; Jin et al. 2018; Qiao et al. 2019). Effectivement, au cours de ses recherches en 2018, Jin et son équipe ont mis en évidence la diminution de la population des *Bacteroides* et des *Proteobacteria*, l'accroissement de la population de *Firmicutes* mais aucun changement significatif pour la communauté des *Actinobacteria* n'a été observé.

Tandis que les études de Qiao, Deng, et al. (2019) montrent une augmentation de la population des *Proteobacteria* et une diminution de celle des *Actinobactéria*. Ces deux populations semblent impacter la santé de l'organisme. Par exemple, d'une part, les Protéobactéries seraient des indicateurs de l'inflammation dans l'intestin. En effet, ils produisent des composés bactériens qui, une fois en excès, peuvent eux-mêmes altérer la muqueuse intestinale la rendant ainsi plus facilement perméable aux polluants tels que les MPs. Elles ont donc un effet délétère sur la santé des poissons. D'autre part, les Actinobactéries sont essentielles pour le maintien de la barrière muqueuse au niveau de l'intestin et des fonctions immunitaires que possèdent le mucus (Huang et al. 2020; Qiao, Deng, et al. 2019). La dysbiose intestinale est souvent associée à la présence d'une inflammation au niveau de l'intestin voire une modification de la qualité du mucus produit (Jin et al. 2018; Qiao et al. 2019).

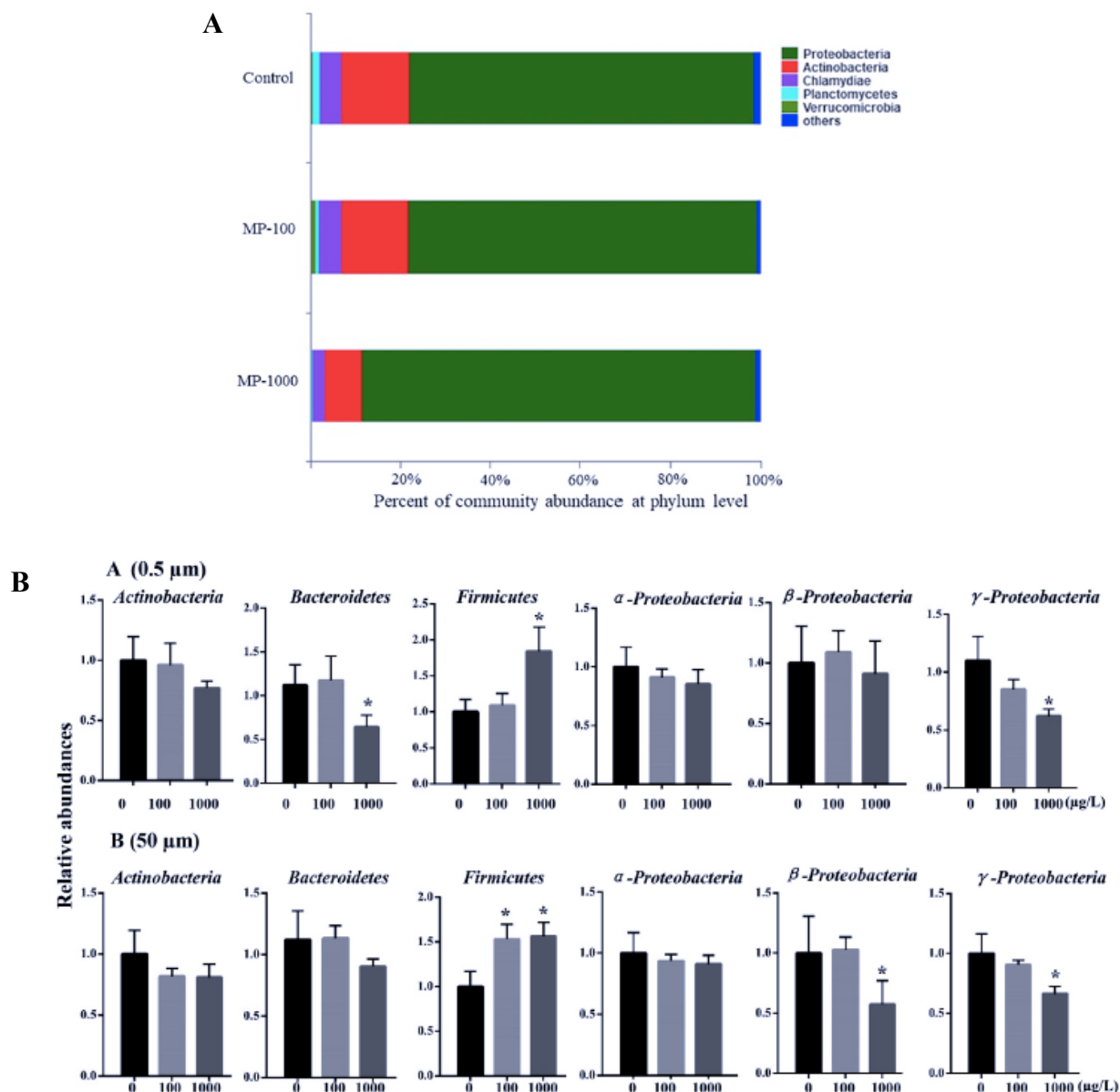


Figure 8 : (A) Changement du pourcentage de l'abondance des différentes communautés au niveau du phylum selon différentes conditions (Contrôle, exposition à 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) chez le guppy ; (B) Variation de l'abondance relative des communautés microbiennes constituant le microbiote à différentes concentrations d'exposition (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) et à différentes tailles (0,5 μm (A) et 50 μm (B)) (Huang et al. 2020 ; Jin et al. 2018).

d. Impacts sur le système immunitaire

En causant les lésions et en perturbant le microbiote intestinal, les MPs peuvent perturber le système immunitaire. En effet, ces lésions provoquent des saignements pouvant être plus ou moins importants ce qui peut mener à l'introduction de pathogènes. Comme nous l'avons vu plus haut, l'introduction de pathogènes peut induire une infection et/ou une inflammation stimulant ainsi le système immunitaire. Ceci a notamment été mis en évidence par Limonta et al. (2021) et Sharifinia et al. (2020) car lors de la dysbiose intestinale, le nombre de leucocytes présents dans l'épithélium intestinal, tels les neutrophiles et les macrophages, a

augmenté ainsi que leur dégranulation. Enfin, d'après la review de Sharifinia et al. (2020), il semblerait que les poissons (*S.aurata*) nourris avec MPs en PVC (40-150µm, 100mg/kg) pendant 30 jours présentent une augmentation de l'activité phagocytaire. Ceci permet d'expliquer l'augmentation de la quantité d'ARNm codant pour les IFN et les IL (α et β) (Figure 9). Elles sont produites respectivement par les cellules de l'immunité et par les macrophages. En outre, cette découverte a permis d'affirmer l'hypothèse selon laquelle la dysbiose intestinale serait associée à une inflammation intestinale (Jin et al. 2018; Limonta et al. 2021; Qiao et al. 2019). Afin de lutter contre cette infection, il semblerait également que l'activité des lysozymes ait augmenté. Or, ce ne sont pas les seuls composés qui ont vu leur activité augmenter, c'est aussi le cas pour les phosphatases acides (AcP) et alcalines (ALP). Ces dernières agissent lorsqu'un des organes dans lesquels elles se trouvent, a été impacté par les MPs. Il est possible de les retrouver dans divers organes tels que le foie et les reins. Donc, le fait qu'une augmentation de leur activité ait été observée permet de confirmer le fait que les MPs causent des lésions au niveau des organes (Sharifinia et al. 2020).

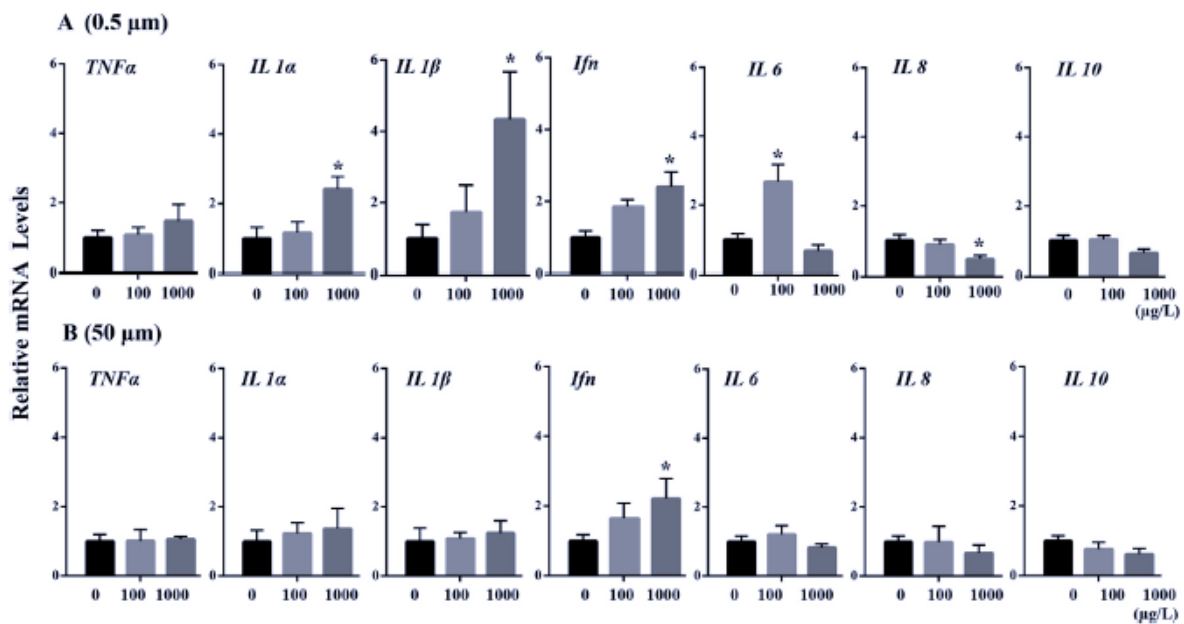


Figure 9 : Variation des niveaux relatifs d'ARNm selon les différentes concentrations d'exposition (contrôle, 100 et 1000µg/L) et de la taille des MPs (A : 0,5µm et B: 50µm) (Jin et al. 2018)

En réalité, il existe que très peu d'études portant sur les impacts des MPs sur les organes liés à l'immunité comme l'indique l'étude de Sharifinia et al. (2020). Cependant, l'étude de l'équipe de Limonta réalisée en 2019 a démontré que certains gènes liés au système immunitaire voyaient leur expression changer lors d'une exposition à deux concentrations (100 et 1000µg/L)

d'un mélange de MPs (50% de HDPE¹ et 50% de PS) de plusieurs tailles (25, 50, 90µm) ce qui impacte la réponse immune, et ce, chez des poissons adultes. En d'autres termes, ils ont montré que les gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée, mais aussi dans le maintien de la structure de l'épithélium intestinal étaient moins exprimés. D'après eux, cette diminution d'expression expliquerait les potentiels risques d'infections par un agent pathogène chez les poissons exposés aux MPs. Cela nous amène à leur seconde observation : les gènes intervenant dans les défenses contre des pathogènes externes sont, quant à eux, surexprimés. Parmi ces gènes, se trouvent ceux codant pour les MHCII (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II) et les cellules présentatrices des antigènes (APC) ainsi que pour le système du complément, bien qu'il fasse partie de l'immunité innée (Limonta et al. 2019).

e. Autres impacts

Toujours dans l'étude de Limonta et al. (2019), les chercheurs ont démontré que les gènes intervenant dans les voies métaboliques des lipides au niveau du foie étaient exprimés différemment. Cet élément a également été mis en évidence dans d'autres études notamment Jovanović (2017), Limonta et al. (2019), Sharifinia et al. (2020), Yin et al. (2018 ; 2019). En effet, il semblerait que certains MPs de petites tailles (inférieure à 100µm) soient capables de translocation à travers les membranes cellulaires pour aller rejoindre le système circulatoire ou lymphatique qui les transportent jusqu'à d'autres organes tel que le foie. Une fois dans le foie, ces microparticules de plastique causent divers effets dont le principal est la perturbation du métabolisme des lipides et des stérols (Bucci, Tulio, et Rochman 2020; Jovanović 2017; Yin et al. 2018; 2019). Il semblerait que les gènes liés à leur métabolisme soient sous-régulés menant ainsi à leur accumulation ou à une production moindre, telles qu'observées pour le cholestérol dans le foie. La faible production de cholestérol en présence de MPs peut donc mener au mauvais développement des larves de poissons car il intervient dans la formation des membranes ainsi que dans le métabolisme énergétique et lipidique (Jovanović 2017; Limonta et al. 2019). Au niveau du foie, il a été mis en évidence que les MPs causaient un stress entraînant la diminution des réserves de glycogène, l'apoptose des hépatocytes ainsi qu'un stress oxydatif (Jovanović 2017; Sharifinia et al. 2020; Yin et al. 2018; 2019).

¹ High-density polyethylene

En temps normal, une certaine quantité d'espèces réactive de l'oxygène (ROS) est produite par l'organisme car ces composés oxygéné-réactifs sont des messagers secondaires intervenant dans la mise en place des voies biologique et/ou biochimique (Hirayama, Cho, et Sassone-Corsi 2007; Umamaheswari, Priyadarshinee, Kadirvelu, et al. 2021). Une trop grande production de ces ROS semble être une des conséquences de l'exposition des MPs menant ainsi à un stress oxydatif (Horton et al. 2018; Jovanović 2017). Ce stress oxydatif indique à l'organisme qu'il doit se défendre en activant les mécanismes de défenses dont la GST et la catalase font partie (Santos et al. 2021; Xu et al. 2021). Cela a pour but de limiter les dommages cellulaires que peut causer ce stress pouvant être plus ou moins sévère. Dans le cas où les dommages sont trop importants, le phénomène de mort programmé sera mis en place. Il s'agit de l'apoptose (Pitt et al. 2018; Umamaheswari, Priyadarshinee, Kadirvelu, et al. 2021). Il semblerait également que les MPs, en bloquant les voies physiologiques principales (systèmes digestif et respiratoire), impactent l'absorption de l'oxygène. La diminution de l'absorption de l'oxygène ne permet pas aux poissons de produire assez d'énergie pour mener à bien ces activités quotidiennes, comme la nage, la chasse ce qui peut provoquer la mort de l'individu (Wright, Thompson, et Galloway 2013; Yin et al. 2018).

L'ingestion de MPs peut également impacter la croissance, la locomotion, la reproduction et donc la survie des poissons. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, l'ingestion de MPs ne permet pas de produire suffisamment d'énergie à l'organisme pour permettre son développement correct et la réalisation de ses activités, comme la recherche de nourriture, la fuite face aux prédateurs, etc. Vu le peu d'énergie produite, l'organisme de l'animal devra choisir à quelle fonction il devra allouer l'énergie (Foley et al. 2018; Wright, Thompson, et Galloway 2013). Les études menées par Yin et al. (2018; 2019) ont montré que les lésions causées par les MPs et leur accumulation à la surface des poissons entraînent une diminution de leur capacité de nage. Par conséquent, face à un prédateur le poisson présentera des difficultés pour fuir entraînant sa mort. D'autre part, les poissons ne sauront plus nager suffisamment longtemps pour trouver des proies et donc se nourrir. Cela conduira également à la mort de l'individu (Yin et al. 2018; 2019).

En conclusion, beaucoup d'études ont été réalisées sur la menace grandissante des MPs et ces impacts sur la biodiversité. Il a été démontré que les MPs causent des dommages directs au niveau des systèmes respiratoire et digestif ainsi que des effets délétères indirects au niveau du système immunitaire, du foie, de la croissance, la chasse, la survie par exemple. Malgré

toutes ces études, les impacts sur le système immunitaire ont, pour la plupart, été découverts au travers de recherches sur les systèmes respiratoire ou digestif. Cela signifie qu'il y a peu voire aucune étude traitant des impacts sur le système immunitaire uniquement. C'est pour cela que dans cette étude, nous allons spécifiquement étudier les impacts des MPs, qu'ils soient direct ou indirect, sur le système immunitaire.

1.4 Le poisson-zèbre, *Danio rerio*

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est une espèce de poisson couramment utilisée dans diverses études comme celles sur la pharmacologie ou sur la toxicologie, (Cantas et al. 2012; Karami et al. 2017). Cette espèce de poisson fait partie de l'ordre des Cypriniformes, expliquant ainsi le fait que c'est une espèce des eaux douces, et de la famille des Danionidae (Briggs 2002; McCluskey et Braasch 2020). Il est possible de retrouver cette espèce dans les eaux douces de l'Inde ainsi que dans quelques régions d'Asie (Hill et al. 2005; Spence et al. 2008).

Bien que ce soit un organisme modèle fortement utilisé, il semble essentiel de rappeler ses avantages (Briggs 2002; Spence et al. 2008).

Le poisson-zèbre est un poisson de petite taille pour lequel il est facile de faire de l'élevage en condition de laboratoire. En effet, leur reproduction se fait tout au long de l'année, contrairement à ceux dans la nature pour lesquels ce serait apparemment plutôt saisonnier.

Leur fécondation, quant à elle, est externe ce qui dans l'environnement naturel peut représenter un inconvénient car ils sont exposés aux prédateurs, mais en condition de laboratoire, ce type de fécondation est plus optimal due à l'absence de prédateur et à la possibilité de les récolter une fois la reproduction terminée (Briggs 2002; Karami et al. 2017; Spence et al. 2008; Spence 2011).

En plus de cela, de l'embryon à la larve, le poisson-zèbre est transparent ce qui permet d'observer l'organisation interne des larves pendant le développement ainsi que ce qu'il se passe dans celui-ci lors de manipulation avec des composés fluorescents, par exemple (Briggs 2002; McCluskey et Braasch 2020).

En outre, le poisson-zèbre est un poisson se développant rapidement car à 24hpf², il est déjà possible d'observer des ébauches d'organes, des battements cardiaques et les somites (Pham et al. 2008; Stephens et al. 2016; Wallace et Pack 2003).

² Heure(s) post-fécondation

Le dernier avantage que nous citerons est celui de son génome qui est complètement séquencé. Cela apporte des informations supplémentaires et complémentaires à celles déjà disponibles grâce aux nombreuses études réalisées sur le poisson-zèbre (Briggs 2002; Hill et al. 2005).

Ensuite, comme nous l'avons vu dans le point précédent, un des premiers systèmes impactés par les MPs est le système digestif. Il semble donc important de parler du développement de ce système chez notre organisme modèle qu'est le *Danio rerio* (Pham et al. 2008; Stephens et al. 2016; Wallace et Pack 2003). Au cours du stade embryonnaire, les embryons se nourrissent via le sac vitellin et des ébauches des organes constituant le système digestif dérivant de l'endoderme sont présentes (Figure 10) (Kimmel et al. 1995). Cela signifie que les ébauches continuent de se développer permettant l'ouverture de la bouche et des intestins à 5jpf³. Donc, à 5jpf, le système digestif est fonctionnel et permet ainsi à la larve de se nourrir de façon autonome bien qu'il reste des réserves vitellines qui s'épuiseront à 7-8jpf (Pham et al. 2008; Stephens et al. 2016; Wallace et Pack 2003).

Une fois que le système digestif est ouvert, le microbiote intestinal peut être mis en place afin d'aider au développement du système digestif. Effectivement, la plupart des vertébrés possèdent un microbiote intestinal ayant pour rôle le bon déroulement des fonctions digestives ainsi que le maintien de l'organisme en bonne santé (Jin et al. 2018; Wallace et Pack 2003). La colonisation du tractus gastro-intestinal de ces microorganismes constituant ce microbiote est corrélée à leur grande abondance dans l'environnement (Figure 12A). Avant l'éclosion, les embryons se trouvent dans le chorion, une enveloppe embryonnaire imperméable pour les molécules supérieures à 3 μ m, qui rend l'intérieur de l'œuf stérile (Bates et al. 2006; Stephens et al. 2016). Cependant, l'abondance des différents taxa de microorganismes n'est pas la même à l'état larvaire qu'à l'état adulte car les larves n'ont pas le même régime alimentaire que les adultes. Sur une échelle de temps, le stade larvaire (Figure 11) débute directement après l'éclosion ayant en générale lieu à 2jpf. Au cours de ce stade, les intestins des larves ont montré une abondance élevée de β et γ -protéobactéries. Alors qu'au stade juvénile, les microorganismes les plus abondants au niveau de l'intestin sont les α -protéobactéries (Bates et al. 2006; Stephens et al. 2016).

³ Jour(s) post-fécondation

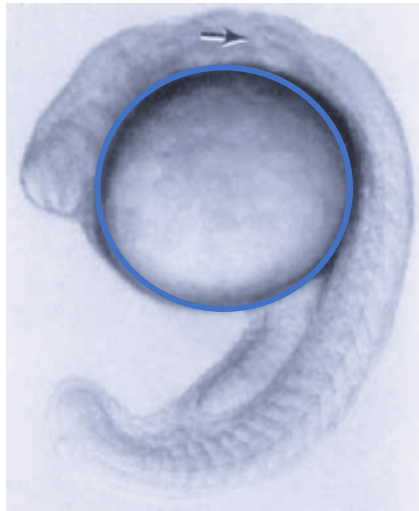


Figure 11 : Embryon de poisson-zèbre à 19h de développement avec le sac vitellin (cercle bleu) (Kimmel et al. 1995).

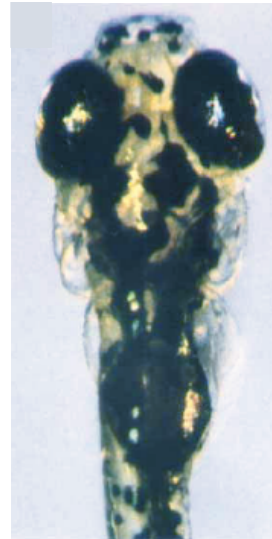


Figure 10 : Stade larvaire du poisson-zèbre (*Danio rerio*) (Zimmel et al. 1995).

De plus, ce microbiote intestinal est également impacté par les MPs que peuvent ingérer les poissons. De fait, une dysbiose intestinale a été mise en évidence par diverses études lors de l'exposition aux MPs comme l'ont démontré Jin et al. (2018), Qiao et al. (2019), Huang et al. (2020) et d'autres équipes. Il a aussi été démontré que cette dysbiose était associée à une inflammation également causée par les MPs. Grâce à ces différentes études, il a été possible de montrer que le microbiote intestinal influençait la santé des poissons et jouait donc un rôle au niveau de leur système immunitaire, également impacté par les MPs (Huang et al. 2020; Jin et al. 2018; Qiao et al. 2019). De cette manière, il a été possible de mettre en avant le rôle que jouait le microbiote intestinal en activant l'expression des gènes intervenant au niveau du système immunitaire inné (Medzhitov et Janeway 2000; Murdoch et Rawls 2019). Nous détaillerons celui-ci plus tard.

En outre, le système immunitaire chez les poissons est assez similaire à celui des mammifères du point de vue du rôle et des acteurs de l'immunité. En d'autres termes, ce système permet d'éliminer les agents étrangers, pathogènes à l'aide de protéines telles que les cytokines, les interférons, les granules primaires. Cependant, le développement des organes lymphoïdes et leur maturation semblent être respectivement plus faible et plus tardive chez les poissons (Hill et al. 2005; Limonta et al. 2021; Stagaman et al. 2017).

En effet, comme pour la plupart des mammifères, le système immunitaire des poissons est composé de deux axes : l'immunité innée et l'immunité adaptative. La première composante est présente dès l'éclosion de l'œuf alors que la seconde n'est complète et fonctionnelle qu'à partir de la quatrième semaine environ après l'éclosion. Cela indique que des ébauches du

système sont présentes dès l'éclosion, mais ces dernières ne sont pas totalement fonctionnelles et elles doivent donc encore se développer (Q. Chen et al. 2020; Lam et al. 2004; Murdoch et Rawls 2019). Le fait que les deux composantes du système immunitaire ne se développent pas en même temps permet de les étudier séparément mais aussi de voir comment ils fonctionnent lorsqu'ils ne sont pas couplés. En effet, en étudiant les poissons-zèbres adultes, les composantes inné et adaptative du système immunitaire sont toutes deux fonctionnelles tandis qu'au stade larvaire, seul la composante innée l'est ce qui permet de pouvoir l'étudier seule (Cornet et al. 2020; Kanther et Rawls 2010; Stagaman et al. 2017).

La composante immunitaire innée reprend les cellules de l'immunité comme les neutrophiles et les macrophages. Ces dernières en cas d'attaque d'agents pathogènes ou d'infections vont soit libérer leurs composés chimiques comme des peptides antimicrobiens, des cytokines, interleukines, soit elles vont phagocyter les cellules endommagées et/ou les pathogènes en question (Figure 12B). C'est la première réponse se mettant en place au niveau des sites infectés ou endommagés et elle peut également stimuler la seconde composante immunitaire qu'est l'immunité adaptative.

Cette dernière est principalement représentée par les deux types de lymphocytes, c'est-à-dire les lymphocytes T et B. Il semble également qu'elle soit pathogène-spécifique ce qui diffère de l'immunité innée étant plus généraliste (Limonta et al. 2021; Medzhitov et Janeway 2000; Murdoch et Rawls 2019).

Enfin, parmi les organes lymphoïdes des poissons et selon l'ordre de développement, nous retrouvons le rein, le thymus et la rate (Zapata et al. 2006). Contrairement aux mammifères, ces organes chez les poissons ne semblent pas être aussi développés et spécialisés. Par contre, ils ne semblent pas avoir de ganglions lymphatiques (Murdoch et Rawls 2019). Afin de confirmer la présence des ébauches de chaque organe dès le début du développement, il a été démontré que des cellules de l'immunité étaient présentes seulement une vingtaine d'heures après la fécondation. Il semblerait également que ces cellules primitives dérivent du sac vitellin ainsi que de la masse cellulaire intermédiaire correspondant à du mésoderme (Cornet et al. 2020; Murdoch et Rawls 2019).

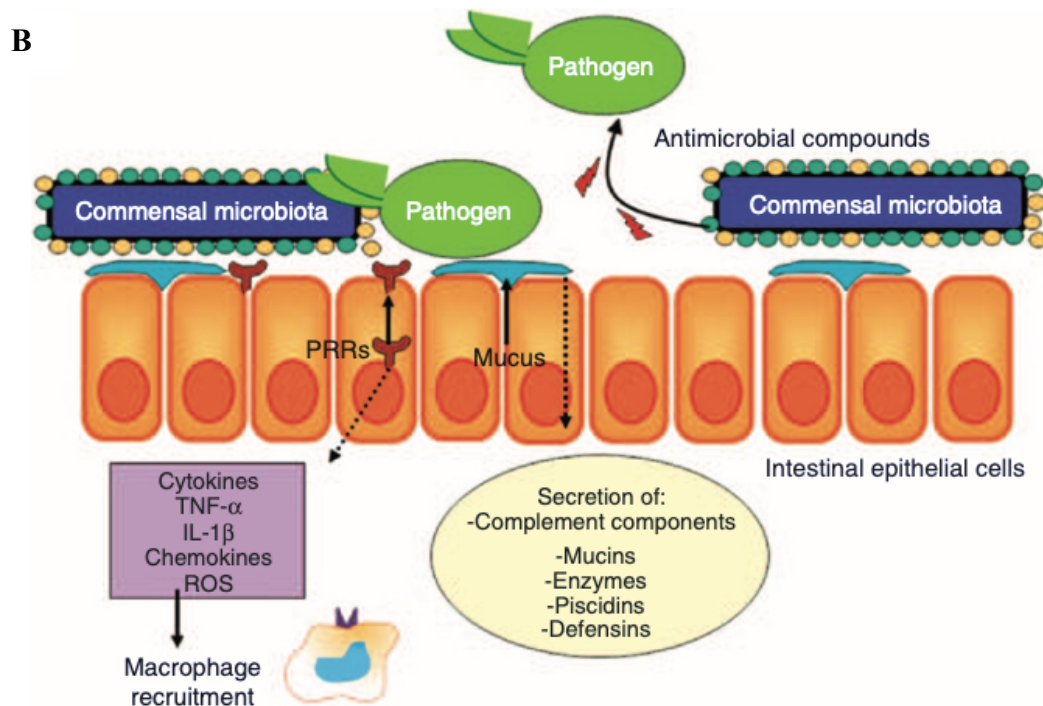
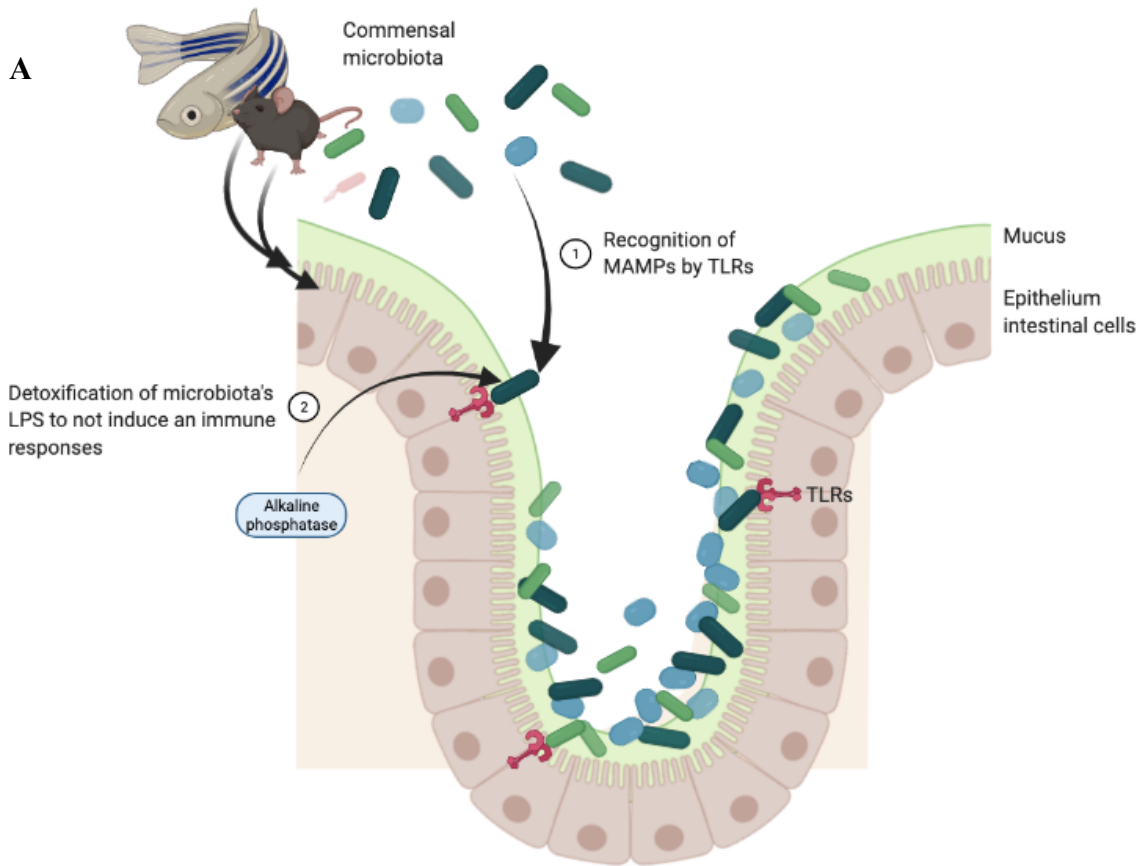


Figure 12 : (A) Schéma expliquant la mise en place du microbiote intestinal via la reconnaissance des microbe-associated molecular patterns (MAMPs) par les TLRs (toll-like receptors) à partir de l'ouverture de la bouche à 3jpf jusqu'à l'ouverture complète du tube digestif à 5jpf (Kanther et Rawls 2010; Murdoch et Rawls 2019; Stephens et al. 2016). Cette colonisation est favorable pour les larves de poisson-zèbre car le microbiote participe au développement des systèmes digestif et immunitaire en intervenant au niveau de l'absorption des nutriments, dans la différenciation des entérocytes et dans la maturation de tissus lymphoïdes tels que les GALTs (gut-associated lymphoïde tissue). Ces GALTs interviennent dans l'adressage des granuloctes et des lymphocytes dans les différentes parties de l'organisme (Murdoch et Rawls 2019; Pérez et al. 2010). (B) Réponses immunitaires mise en place au niveau du mucus intestinal par la détection des pathogènes via le microbiote commensal (Pérez et al. 2010).

1.5 Objectifs

Dans ce travail, nous allons étudier comment des billes de MPs peuvent impacter la santé des larves de poisson-zèbre à un stade critique du développement du système immunitaire et de la mise en place du microbiote associé à son tube digestif (Karami et al. 2017). Les billes utilisées dans notre étude ont une taille de 5µm car plus les MPs sont de petites tailles, plus ils peuvent être ingérés et causés des effets néfastes (Guzzetti et al. 2018). Le polymère les composant est le polystyrène car une grande partie des études portent sur des PS-MPs et c'est également un polymère constituant les emballages de nourriture, de boissons et les vêtements par exemple (« Plastics - The facts » 2020). Les expositions se feront selon deux concentrations distinctes. La première sera semblable à celle de l'environnement (100 µg/L) tandis que la seconde servira à déterminer les effets à dix fois la dose environnementale (1000 µg/L) (Limonta et al. 2019). Les larves seront également exposées pendant différents temps (avant et à partir de l'ouverture de la bouche ainsi que dès la fécondation des œufs) permettant ainsi d'observer les impacts des MPs au cours du développement du système digestif.

Sachant que dans le milieu naturel, les MPs sont souvent associés à des additifs ou à des micro-organismes (Cf. 1.2.1. Généralités du point 1.2. Les microplastiques) et que pour évaluer la réponse immunitaire, il faut la stimuler, nous comparerons l'influence des MPs seuls ou associés à une bactérie pathogène. La bactérie sélectionnée dans notre étude, *Aeromonas salmonicida achromogenes*, a été utilisée lors d'une étude précédente menée par Cornet et al. (2020). Cette étude évaluait comment une infection à différents moments du stade larvaire pouvait influencer l'expression des gènes immunitaires lors d'une nouvelle exposition au stade adulte. Une infection avec *A. salmonicida achromogenes* a réussi à stimuler l'expression des gènes de l'immunité innée chez les larves de poisson-zèbre (Cornet et al. 2020). A notre connaissance très peu, voire pas, d'études traitent de l'association des MPs avec une bactérie, cette étude permettra donc d'évaluer les impacts des MPs combinés ou non à une bactérie pathogène afin de distinguer les dégâts engendrés par chacun séparément ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Au cours de ce mémoire, nous tenterons de répondre à deux questions : (1) Quels sont les effets des concentrations en MPs et des conditions d'exposition sur le système immunitaire des larves de poisson-zèbre ? et (2) quels sont les effets des concentrations et des conditions d'expositions aux MPs lorsque celle-ci est combinée à un challenge bactérien ? Afin de

répondre à ces questions, différentes analyses seront réalisées : une analyse d'expression de gènes ainsi que des tests enzymatiques.

2 Matériel et méthodes

2.1 Modèle d'expérimentation et microplastiques utilisés

Les poissons-zèbres (*Danio rerio*) sont élevés dans un système ZebTec (Figure 13) (« Tecniplast France | ZebTEC » s. d.). L'élevage a lieu dans des conditions optimales pour l'élevage du poisson-zèbre, c'est-à-dire une température de l'eau comprise entre 26 et 28°C, un pH maintenu entre 7,2 et 7,4 et une conductivité de 500µS/cm. Les poissons sont également soumis à un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité. Concernant leur régime alimentaire, les poissons-zèbres sont nourris deux fois par jours : le matin, avec de l'aliment sec (Gemma micro) complété avec des nauplies d'artémia alors que l'après-midi, ils sont nourris uniquement de l'aliment sec (Gemma micro).



Figure 13 : Type de bac (gauche) contenant les poissons présents dans le système d'élevage (droite) (ZebTech).

2.2 Reproduction

Dans les différents aquariums, les mâles et les femelles sont mélangés. Par conséquent, il faut réaliser un sexage la veille de la reproduction afin de séparer les mâles des femelles. Ensuite, trois mâles et trois femelles sont répartis dans les bacs de reproduction (« Zebrafish Embryo Collection for research - Aquatic Solutions » s. d.). Ces bacs présentent dans le fond une grille permettant aux œufs d'aller dans le fond d'un autre bac plus grand (Figure 14C). Les mâles et les femelles sont séparés par une plaque. Puis ils sont remis dans les aquariums du

système pour la nuit (Figure 14A). Le lendemain avant que les lumières du local des poissons-zèbres s'allument, les bacs de reproduction sont mis dans des bacs indépendants de ceux des aquariums. Puis la plaque est retirée permettant ainsi aux mâles de stimuler les femelles afin de déclencher la ponte des œufs qui seront ensuite fécondés par les mâles (Figure 14B). La reproduction dure environ 2h avant d'aller récupérer les œufs. Cette dernière étape est réalisée à l'aide d'un filtre et de l'eau provenant des aquariums.

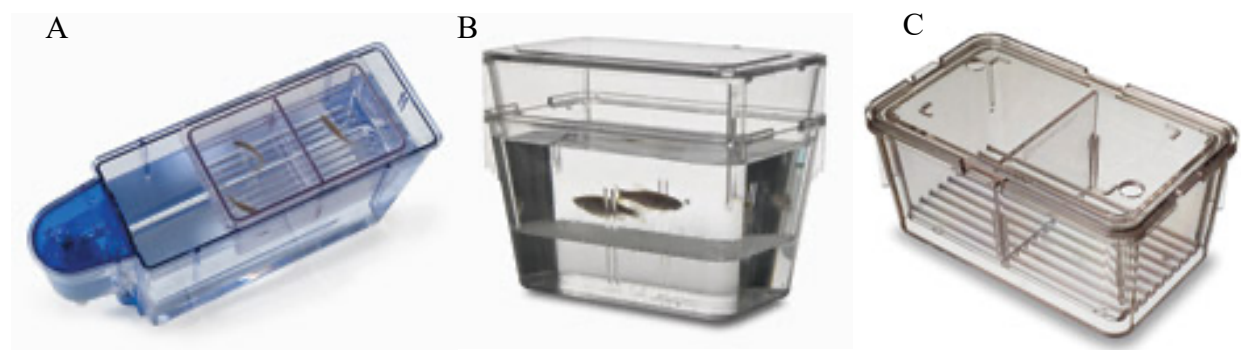


Figure 14 : Matériel utilisé lors de reproduction :
 (A) Le bac de reproduction avec grille dans le fond, dans lequel les mâles sont séparés des femelles par une plaque, est mis dans un bac du système d'élevage pendant la nuit avant que la reproduction commence le lendemain,
 (B) Bac de reproduction utilisé lors de la reproduction sans la plaque séparant les mâles des femelles et
 (C) le bac de reproduction contenant la plaque séparant les mâles des femelles (Aquatic Solutions).

Pour cette manipulation, deux reproductions ont dû être réalisées. La première a servi à faire les prélèvements pour réaliser les analyses d'expression de gènes et d'activité enzymatique.

2.3 Exposition aux MPs (J0 à J8)

Les œufs récoltés ont été répartis dans 14 boîtes de Pétri en verre (Figure 15) de 10 cm de diamètre, pesées préalablement facilitant ainsi le changement de milieu à 3jpf, 4jpf et 6jpf.

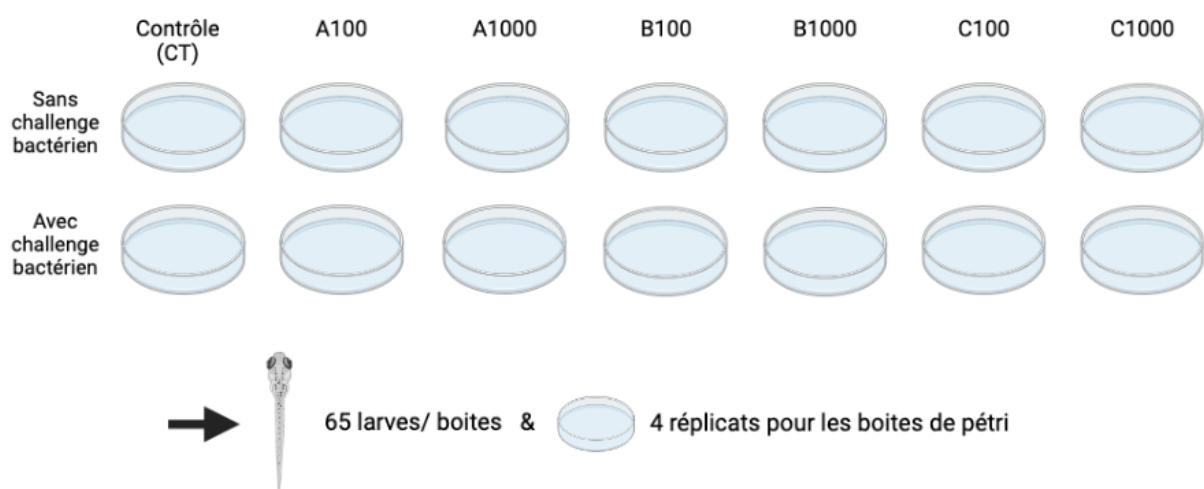


Figure 15 : Manière dont sont répartis les œufs récoltés, c'est-à-dire les différentes conditions d'expositions, les différentes concentrations et le challenge bactérien.

L'exposition a été réalisée avec des microbilles de polystyrène de 5µm (Sigma-Aldrich, lot BCCC9286). Elle a eu lieu pendant huit jours. Le dernier jour, la moitié des larves est soumise à un challenge bactérien (*Aeromonas salmonicida achromogenes*) (Figure 16).

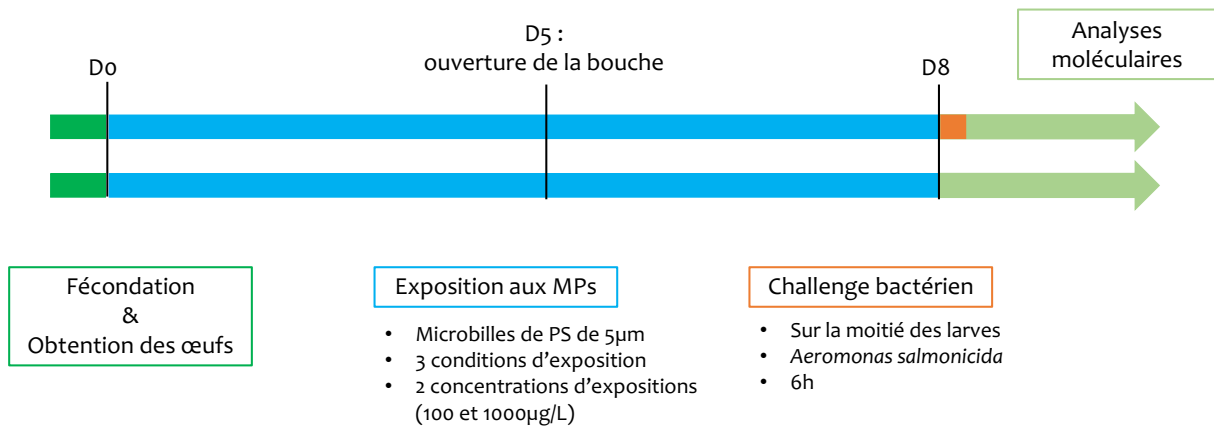


Figure 16 : Schéma expérimental de l'exposition des larves de poisson-zèbre aux billes de polystyrène (PS) de 5µm pendant 8 jours selon deux concentrations et trois conditions d'exposition. Au 8^{ème} jour, un challenge bactérien a été réalisé.

Il y a trois conditions d'exposition aux MPs (Figure 17) : la condition A où les œufs ont été exposés aux microbilles de polystyrène de 0 à 4jpf, la condition B où les larves ont été exposées de 4 à 8jpf et la condition C où elles ont été exposées de 0 à 8jpf. Parmi les plaques, il y en aura donc quatre par condition et deux pour les contrôles (CT). Les œufs/larves de poisson-zèbre sont également exposées à deux concentrations différentes (100 et 1000µg/L). Donc dans les quatre boîtes par condition, il y en a deux par concentrations et parmi ces deux boîtes, une est dédié aux larves non soumises à un challenge bactérien et l'autre aux larves qui seront soumises au challenge bactérien.

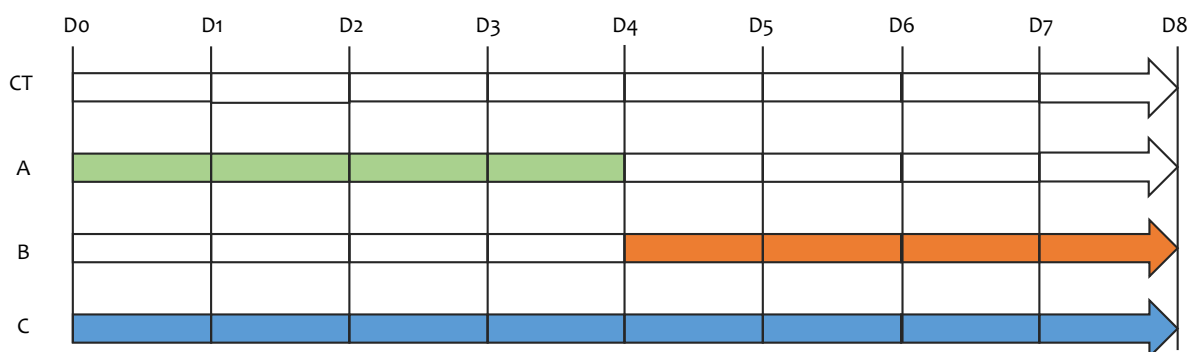


Figure 17 : Schéma permettant de distinguer les différentes conditions d'exposition aux MPs auxquelles sont soumises les larves de poisson-zèbre. A : exposition aux MPs de 0-4jpf, B : exposition aux MPs de 4-8jpf et C : exposition aux MPs de 0-8jpf.

Les œufs ont été répartis dans différentes boîtes de Pétri de façon à avoir 65 individus par boîte. Le volume final dans les boîtes est de 20mL, c'est-à-dire 10mL d'eau filtrée et 10mL

de solution d'exposition (groupe exposé) ou d'eau filtrée du système d'hébergement des poissons (CT et groupe non exposé à 0jpf).

Au premier jour d'exposition, la solution de MPs est concentrée 2x (200 et 2000 μ g/L). Ensuite, lors du renouvellement de 50% du milieu (3, 4, 6jpf), la solution mise est concentrée 1x (100 et 1000 μ g/L) en MPs. Ce renouvellement a pour but d'éviter tant les potentielles contaminations qu'un potentiel développement bactérien.

De plus, à 0jpf, les œufs non fécondés ont été retirés par observation au microscope optique et remplacés par des œufs fécondés. Les jours suivant afin de réaliser un test de survie, les morts ont été évacués et comptabilisés.

Enfin, à 4jpf, les larves exposées de 0-4jpf ont été rigoureusement rincées puis remises dans des boîtes de Pétri contenant uniquement de l'eau filtrée afin d'arrêter l'exposition aux MPs.

2.4 Challenge bactérien

Les bactéries ayant été utilisées pour ce challenge bactérien sont *Aeromonas salmonicida achromogenes*. Elles ont été stockées à -80°C. Afin de réaliser une culture bactérienne, 200 μ L de ces bactéries ont été ajoutées dans 10mL de milieu de culture Brain Heart Infusion (BHI), puis ont été incubées à 26°C pendant 18h avec une agitation de 100 rpm. Après 18h d'incubation, la culture bactérienne a été étalée sur une boîte BHI agar et puis le reste de la culture liquide a été stockée au frigo à 4°C afin d'arrêter la croissance bactérienne. La veille du challenge bactérien, une culture bactérienne est réalisée à partir de la culture liquide (si cette dernière à moins de 4h) ou de la boîte BHI agar contenant les colonies bactériennes le cas échéant. Pour cela, 200 μ L de la culture liquide ou de plusieurs colonies sont prélevées puis mise dans un nouveau falcon contenant 15mL de milieu BHI et incubé pendant 18h à 26°C.

Afin de connaître la quantité précise de bactéries mise dans chaque boîte de pétri pour le challenge bactérien, une dilution sérieuse a été réalisée (10^{-1} à 10^{10}). Ensuite, 100 μ L des quatre dernières dilutions (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} et 10^{-10}) ont étéensemencés sur des boîtes de Pétri annotées avec les différentes dilutions. Après quatre jours d'incubation à 26°C, les boîtes contenant entre 1 à 1000 bactéries ont été comptées, sachant que la solution mère contenait environ 10^{11} bactéries. Une seconde manière pour quantifier les bactéries est celle de mesurer la densité optique à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultraspec 2100 pro) capable d'absorber dans

le spectre visible ainsi que dans l'UV. Cette mesure de la densité optique est l'équivalent au comptage décrit ci-dessus.

Le jour du challenge, les poissons zèbres sont exposés avec 100µL d'une solution à 1×10^{12} CFU/L (colony forming unit/litre) pendant 6h à 27°C afin d'induire une réponse immunitaire et 100µL de milieu BHI sans bactérie ont été ajoutés au groupe contrôle.

2.5 Prélèvement des larves

Après 6h de challenge bactérien, les larves sont euthanasiées avec 100µL de MS222 à une concentration finale dans la plaque de 200mg/L. Pour les différentes conditions et analyses, cinq répliques contenant 10 larves sont réalisées ce qui permet d'avoir une quantité de matériel biologique nécessaire à la réalisation des analyses moléculaires et enzymatiques. Les échantillons sont ensuite stockés à -80°C.

2.6 Analyse de l'expression des gènes par qPCR

Via cette analyse, il sera possible de voir si les microbilles de polystyrène impactent l'expression des gènes de détoxification, de l'immunité innée, de la mise en place du microbiote, marqueur de la neurotoxicité et du métabolisme.

2.6.1 Extraction ARN

Les larves contenues dans les tubes « SafeLock » stockés à -80°C sont homogénéisées dans 500µL de Trizol Reagent (Ambion Thermofisher Scientific) pendant 2 min à l'aide du « Bullet Blade Storm 24 » puis incubé pendant 5 min à température ambiante. Ensuite, 100µL de BCP (1-bromo-3-chloropropane) ont été ajoutés et mélangés avant d'être centrifugés (centrifugeuse 5810R) pendant 15 min à 12000 x g à 4°C. Ensuite, la phase aqueuse, contenant l'ARN, a été prélevée et mise dans un nouveau tube (PCR clean) contenant 500µL de 2-propanol. Le mélange est centrifugé pendant 5 min à 10000 x g. Le surnageant est retiré et le culot d'ARN est rincé avec 800µL d'éthanol froid à 75% puis centrifugé à 7500 x g pendant 5 min (cette étape est répétée 2 fois). Le surnageant est retiré et le reste de l'éthanol enlevé par évaporation. Enfin, 23µL d'eau nuclease free ont été utilisés pour resuspendre l'ARN.

2.6.2 Traitement DNase

Une fois que l'ARN a été extrait de nos échantillons, un traitement DNase a été réalisé afin de limiter les contaminations d'ARN possible. Pour réaliser cette étape, une certaine quantité d'ARN est requise, environ 200ng/μL. Donc avant de procéder à ce traitement DNase, il faut quantifier et déterminer la qualité de l'ARN présent dans les échantillons. Pour cela, nous avons utilisé le spectrophotomètre « Nanodrop 2000c » (Thermo Scientific). Pour réaliser ce traitement DNase, le kit DNA-free_DNase Treatment and Removal Reagents (#AM1906) a été utilisé selon les instructions du fournisseur.

2.6.3 Rétro-transcription

La reverse transcription a été réalisée en suivant le Thermo Scientific RevertAid RT Kit (#K1691 500 rxns) en respectant les indications du fournisseur. Cette étape sert à convertir l'ARN présent dans nos échantillons en ADN complémentaire avant de réaliser l'analyse qPCR. Dans une plaque 96 puits, 1μL de primers, de l'eau Nuclease free et les échantillons d'ARN ont été ajoutés dans cet ordre. Après centrifugation, la plaque a été incubée 5 min à 65°C pour linéariser l'ARN et mise sur glace également pendant 5 min afin de lier les primers. Ensuite, ont été ajoutés à la plaque, 4μL de Buffer, 1μL de RiboLock RNase Inhibitor, 2μL de 10nM dNTP Mix et 1μL de RevertAid RT. La plaque a été centrifugée et placée dans le thermocycleur pour la rétrotranscription. Il a été programmé sur un cycle de 60 min à 42°C, 5 min à 25°C, 60 min à 42°C et 5 min à 70°C.

2.6.4 qPCR

Une liste de primers a été déterminée pour la réalisation de l'analyse des gènes par qPCR (Tableau 1). Parmi ces primers se trouvent ceux des gènes de référence ($ef1\alpha$ et β -actine) utilisés afin de normaliser l'expression des gènes d'intérêts. Les différents gènes ont été sélectionnés selon leurs rôles dans le système immunitaire ainsi que dans d'autres systèmes physiologiques impactés par les MPs (Tableau 2). Ils ont également été choisis étant donné leur fréquence d'études.

Les primers ont, dans un premier temps, dû être dilués pour atteindre une concentration de 2,5μM. Ensuite, les échantillons issus de la Reverse Transcription ont également dû être dilués à 1/100 dans de l'eau Nuclease free. De plus, 2μL de chaque échantillon ont été prélevés en plus et mis dans un ependorf à part, afin de réaliser un pool des échantillons. Ce pool a été soumis à une dilution en série (1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 et 1/800). Il a été utilisé pour

faire une droite de calibration permettant par la suite de valider les différents primers en calculant leur efficacité.

Lors du remplissage de la plaque (Annexe 1), les échantillons ont été posés en duplicats alors que les différentes dilutions constituant la droite de dilution et le blanc (eau Nuclease free) ont été mis en triplicats. Par conséquent, 2,5µL de chaque échantillon, de dilutions et de blanc ainsi que 2,5µL de primer à 2,5µM et 5µL de SybR Green ont été mis par puits. L'expression pour chaque gène a été mesurée via l'appareil QuantStudio 5 (Applied Biosystems ThermoFisher Scientific).

Tableau 1. Liste des primers et de leurs séquences (forward et reverse) ayant permis la réalisation des analyses d'expression des gènes

| Genes | Forward primers sequences (5' --> 3') | Reverse primers sequences (5' --> 3') |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Référence | | |
| <i>Eucaryotic translate elongation factor 1 α 1 (ef1α)</i> | CTT CTC AGG CTG ACT GTG C | CCG CTA GCA TTA CCC TCC |
| <i>β-actin</i> | CCC CAT TGA GCA CGG TAT TG | ATA CAT GGC AGG GGT GTT GA |
| Système immunitaire innée | | |
| <i>Interleukine 6 (il6)</i> | TCA ACT TCT CCA GCG TGA TG | TCT TTC CCT CTT TTC CTC CTG |
| <i>Myeloperoxidase (mpo)</i> | CAA TGG CCC GCA TAA TCT G | GCG AAA AGG ATC TCT GGG AAC T |
| <i>Nuclear factor kappa B (nfb)</i> | GGT CGG ACA GAG ATC ACG GAT T | TGC TGT TCT TCA CGT CCT CT |
| <i>Interleukine 1 β (il1β)</i> | CAT TTG CAG GCC GTC ACA | GGA CAT GCT GAA GCG CAC TT |
| <i>Transferrine-α (tfa)</i> | ACA GCA TGA ACT GGC ACT TG | TGC AGA AAA AGC TGG TGA TG |
| Mise en place du microbiote | | |
| <i>Fast-induced adipose factor (fiaf)</i> | CGA GCG CAT CAA GCA ACA | TCG CTC GTT TTT CAT CGT AAT CT |
| <i>Proliferating cell nuclear antigen (pcna)</i> | GAT GGT AGT TTG GGC CTT AGC TTT | AAA AAC AAG ACT GAA TGT GGA TGT GGA GTA TGT AC |
| Système de détoxification | | |
| <i>Catalase (cat)</i> | CAA AGG CAA ATC CTC AGA GC | CAC AAA GTG GTT CAC CAT GC |
| <i>Superoxyde dismutase (sod)</i> | GCC CGG TGA CAA TTA CAT CT | GGT TGC CCA CAT AGA AAT TGC |
| <i>Cytochrome P450, family 1, subfamily a (cyp1a)</i> | TCC TGG AAA TCG GAA ACA AC | CTG AAC GCC AGA CTC TTT CC |
| Apoptose | | |
| <i>BCL2 apoptosis regulator (bcl2)</i> | GGG CGG ATC ATT GCA TTC TT | TCT GCT GAC CGT ACA TCT CC |
| Métabolisme | | |
| <i>Aldolase (aldo)</i> | TTC TCT TAT GGC CGT GCT CT | GCC TGA CCT GAG GGT TTG TA |
| <i>Fatty acid synthase (fasn)</i> | GCA CCG GTA CTA AGG TTG GA | CAG ACG CCA TGT TCA AGA GA |
| <i>Citrate synthase (cs)</i> | AGC GCT GCT ATG AAT GGT CT | GTG CTT GAG GGC AAA CTC TC |
| <i>Hexokinase 1 (Hk1)</i> | AAA GAA GGC CTG CTG TTT GA | GTC AGG ATT GCA CCC AAA GT |
| Neurotoxicité | | |
| <i>Glial fibrillary acidic protein (gfap)</i> | GGA TGC AGC CAA TCG TAA T | TTC CAG GTC ACA GGT CAG |

Tableau 2. Liste des primers et de leurs fonctions dans les différents systèmes pouvant être impactés par les MPs associés ou non par une bactérie pathogène

| Gènes | Fonctions |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Système immunitaire innée | |
| <i>Interleukine 6 (il6)</i> | Cytokine pro-inflammatoire de l'immunité innée |
| <i>Myeloperoxidase (mpo)</i> | Opsonisation, phagocytose et dégradation des pathogènes |
| <i>Nuclear factor kappa B (nfb)</i> | Induction de la réponse inflammatoire en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires (voie toll-nfb) |
| <i>Interleukine 1 β (il1β)</i> | Cytokine pro-inflammatoire de l'immunité innée |
| <i>Transferrine-α (tfa)</i> | Impliqué dans la réponse immunitaire, à la biosynthèse de l'hémoglobine et la détoxification des métaux |
| Mise en place du microbiote | |
| <i>Fast-induced adipose factor (fiat)</i> | Indicateur du jeûne, code pour une protéine inhibitrice de la lipoprotéine lipase |
| <i>Proliferating cell nuclear antigen (pcna)</i> | Synthèse, la réplication et la réparation de l'ADN. Intervient dans la prolifération cellulaire. |
| Système de détoxification | |
| <i>Catalase (cat)</i> | Code pour une enzyme anti-oxydante (catalase) capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène |
| <i>Superoxyde dismutase (sod)</i> | Code pour une enzyme anti-oxydante (SOD) capable de dégrader l'anion superoxyde |
| <i>Cytochrome P450, family 1, subfamily a (cyp1a)</i> | Code pour une enzyme capable de digérer les composés toxiques |
| Apoptose | |
| <i>BCL2 apoptosis regulator (bcl2)</i> | Rôle dans l'apoptose |
| Métabolisme | |
| <i>Aldolase (aldo)</i> | Rôle à jouer dans la synthèse de saccharose |
| <i>Fatty acid synthase (fasn)</i> | Code pour une enzyme clé de la lipogenèse |
| <i>Citrate synthase (cs)</i> | Code pour une enzyme clé du cycle de Krebs |
| <i>Hexokinase 1 (Hk1)</i> | Code pour la première enzyme de la glycolyse |
| Neurotoxicité | |
| <i>Glial fibrillary acidic protein (gfap)</i> | Controles les éléments du cytosquelette au niveau des astrocytes et des cellules gliales, marqueurs de neurotoxicité |

2.7 Tests enzymatiques

Ces tests enzymatiques ont permis de déterminer si les MPs avaient un impact sur leur activité. Les enzymes testées dans cette section sont la glutathion-S-transférase (GST), la lactate déshydrogénase (LDH) et la catalase (cat).

Chaque échantillon a été homogénéisé dans du Cellytic MT cell lysis Reagent (5g/L) pendant 2 min dans le « Bullet Blade Storm 24 ». Les échantillons ont été centrifugés par la suite à une vitesse de 10 000 x g pendant 10 min à 4°C. Puis le surnageant a été prélevé et mis dans de nouveaux tubes et servira à l'ensemble des tests enzymatiques.

2.7.1 Dosage de Bradford

Pour pouvoir déterminer l'activité des différentes enzymes, il faut connaître la quantité de protéines se trouvant dans nos échantillons. C'est pour cela qu'un dosage de Bradford est réalisé. C'est un dosage colorimétrique impliquant le bleu de Coomassie. La réaction vire alors au bleu s'il en résulte une interaction hydrophobe du bleu de Coomassie avec les acides aminés. Tandis que la réaction devient rouge s'il n'y a que des molécules libres ou chargée positivement (cations). Le dosage se fera en mesurant l'absorbance des échantillons. Par conséquent, il y aura deux mesures : la première sera à 465-470 nm (rouge) et la deuxième sera à 595nm (bleu). De plus, la coloration de la solution dépendra de la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

Afin de déterminer la concentration de protéines se trouvant dans les échantillons, une droite de calibration est nécessaire et est réalisée à partir de standards issus d'une dilution en série de BSA (Bovine Serum Albumin). Les concentrations de BSA pour la droite de calibration sont donc 0 ; 0,15625 ; 0,3125 ; 0,625 ; 1,25 ; 2,5 et 5 mg/ml. 3µL de ces dilutions ont ainsi été déposés dans une plaque 96 puits en triplicat. Un blanc et un contrôle négatif ont également été faits. Pour les deux, 3µL de tampon Cell Lysis Reagent ont été mis dans le puits sauf pour le blanc, 200µL d'eau distillée ont été ajoutés et non 200µL de Bradford comme c'est le cas pour le contrôle négatif, les standards et les échantillons. Pour les échantillons, 3µL ont été déposés sur la même plaque, en triplicats. Enfin, la plaque est incubée dans le noir pendant 5 min avant d'être lue au spectrophotomètre FLUOstar OMEGA (BMG LabTech) à 595 et 450 nm.

2.7.2 Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase (LDH) intervient dans la réaction produisant du pyruvate à partir du lactate. Il s'agit donc une oxydoréductase. En général, la LDH est utilisée et mesurée afin de déterminer la présence ou non de dommages, lésions tissulaires. En effet, lorsque les tissus dans lesquels se trouvent la LDH sont endommagés, cette dernière passe dans le sang et l'augmentation de LDH dans le sang indique la présence de lésion au niveau de ces tissus. La mesure de l'activité de la LDH a été réalisée sur base du Kit QuantiChrom™ Lactate Deshydrogenase (D2DH-100, BioAssay Systems) selon les instructions du fournisseur.

$$\text{Activité spécifique LDH} = 80,89 \times \frac{DO_{S13,5} - DO_{S0}}{DO_{CAL} - DO_{H2O}} \times 1$$

Equation 1 : Formule utilisée pour calculer l'activité de la LDH. 80,89 : coefficient ; $DO_{S13,5}$: densité optique finale des échantillons ; DO_{S0} : densité optique initiale des échantillons ; DO_{CAL} : densité optique du calibrator ; DO_{H2O} : densité optique de l'eau ; 1 : la dilution des échantillons

2.7.3 Mesure de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST)

La glutathion-S-transférase (GST) est une enzyme intervenant dans la détoxification de substances endogènes ou xénobiotique en catalysant la réaction liant la forme réduite du glutathion (GSH) à ces substances. Donc, pour mesurer l'activité de l'enzyme, il faudra du glutathion réduit (60µL à 5mM) ainsi que du 1,2-dichloro-4-dinitrobenzène (CDNB, 60µL à 1mM). Ces solutions ont été mises à concentration à l'aide d'un tampon phosphate de sodium préparé au préalable. 20µL d'échantillons sont également déposés avec le GSH 5mM et le CDNB 1mM dans une plaque 96 puits. Enfin, la plaque remplie est lue à 340nm pendant 15 min (spectrophotomètre OMEGA).

$$\text{Activité spécifique GST} = \frac{\frac{\Delta DO}{\text{min}} * V_t / V_s}{\text{mg de protéines}}$$

Equation 2 : Formule utilisée pour calculer l'activité spécifique de la GST (µM/mn/mg de protéines). $\Delta DO/\text{min}$: la moyenne d'absorbance par minute ; e : coefficient d'extinction molaire du CDNB ; V_t : Volume total dans le puits ; V_s : Volume d'échantillon dans le puits ; mg de protéine : la quantité de protéine présente dans l'échantillon

2.7.4 Mesure de l'activité de la catalase

La catalase est une enzyme anti-oxydante intervenant en cas de stress oxydatif pour désactiver les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Elle est présente dans les peroxysomes et permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène et en eau. Son activité est donc mesurée par rapport à la dégradation de H_2O_2 à 240nm.

Dans une plaque UV 96 puits, 15µL d'échantillons en triplicat ou de Cell Lytic Buffer (blanc), 20µL de KPBS⁴ 0,05M à pH = 7 et 70µL de CAT Reaction Buffer ont été ajoutés dans les puits. Le dernier réactif est ajouté automatiquement par le spectrophotomètre OMEGA et la plaque est ensuite agitée. Les mesures de l'absorbance (240nm) pour la catalase sont réalisées pour trois colonnes de la plaque en même temps pendant 5 min.

$$\text{Activité spécifique catalase} = \frac{(\Delta Abs_{\text{éché}} - \Delta Abs_{\text{Blancs}}) * V_t / V_s}{Prot * \epsilon * d}$$

Equation 3 : Formule utilisée pour calculer l'activité spécifique de la catalase. $\Delta Abs_{\text{éché}}$: Moyenne de l'absorbance pour chaque échantillon par minute; $\Delta Abs_{\text{Blancs}}$: Moyenne de l'absorbance des blancs par minute; V_t : Volume total dans le puit; V_s : Volume d'échantillon dans le puit; $Prot$: la quantité en protéine dans les échantillons (mg/mL); ϵ : coefficient d'extinction molaire de H_2O_2 ($0,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$); d : la distance parcourue par la lumière.

2.8 Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, nous avons utilisé le logiciel RStudio 2021.09.0+351. Pour traiter nos données, nous avons utilisé des modèles linéaires généralisés (GLM) de type « gaussienne » sur lesquels des ANOVA I et II ont été réalisées. Ces dernières ont permis de déterminer les effets des différentes concentrations et conditions d'exposition sur les activités enzymatiques et les expressions des gènes des larves de poisson-zèbre lors d'une exposition aux MPs combinée ou non à la présence d'une bactérie pathogène (*A. salmonicida achromogenes*). Ensuite, un test *post-hoc* (test de Tuckey) à un seuil de significativité de 5% a été réalisé (package R multcomp) pour comparer les différents groupes entre eux. Enfin, lorsqu'il y a une différence significative entre deux conditions, celle-ci a été annotée par deux lettres minuscules différentes. Tandis que si aucune différence significative n'a été observée, la même lettre a été notée.

Pour les résultats de l'analyse d'expression des gènes, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les expressions relatives des gènes soumises ou non à un challenge bactérien afin de voir la distribution des échantillons selon nos variables. De plus, le fold change des expressions des gènes a été calculé pour chacun des échantillons afin de visualiser les changements d'expression causé par le challenge bactérien ayant été précédé par l'exposition aux MPs. Pour calculer les fold change de chaque gène, les moyennes d'expression relative pour les différents réplicas non soumis au challenge bactérien ont été calculées. Puis,

⁴ Potassium Phosphate Buffer Solution

chaque expression relative des échantillons soumis au challenge bactérien a été divisé par la moyenne correspondante. Des analyses statistiques similaires à celles réalisées sur les expressions relatives ont ensuite été réalisées.

3 Résultats

3.1 Effet des MPs sur la survie des larves de poisson-zèbre

De manière générale, les valeurs de survie sont élevées pour chaque groupe et sont comprises entre 77,3% et 100% avec une forte variabilité inter-condition. Au cours des expositions, un pic de mortalité a été observé à 24hpf puis elle devient quasi-nulle. À la suite des analyses statistiques, un effet simple significatif des conditions ($p = 1.096e-09$) d'exposition a été mis en évidence. La survie des larves exposées de 4-8jpf est significativement plus faible que la survie de celles exposées de 0-8jpf, elle-même plus faible que celle exposées de 0-4jpf (Figure 18).

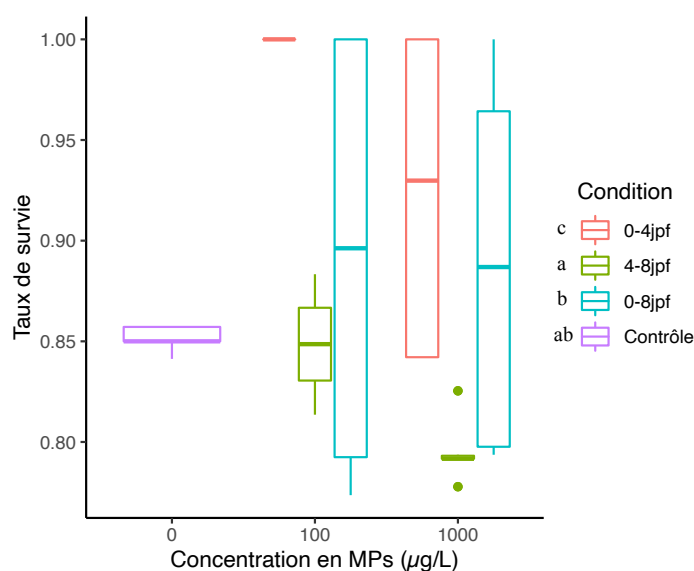


Figure 18 : Boxplot de l'effet de l'exposition des MPs sur la survie des larves de poisson-zèbre (*Danio rerio*) après 8 jours d'exposition. Les larves ont été exposées à 0µg/L (Contrôle), 100µg/L, 1000µg/L. Pour les deux dernières concentrations, il y a 3 conditions d'exposition : 0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf.

3.2 Effets des MPs seuls sur l'activité enzymatique des larves de poisson-zèbre

3.2.1 La lactate déshydrogénase (LDH)

Lors de l'analyse statistique, nous avons pu mettre en évidence qu'il y avait un effet significatif de l'effet interaction des concentrations et des conditions d'exposition sur l'activité de la LDH ($p = 8.23e-05$) (Figure 19). Cette enzyme joue un rôle dans la production d'énergie en condition anaérobie.

En effet, l'activité de la LDH pour les larves exposées de 0-4jpf à une concentration de 100µg/L est significativement supérieure par rapport à l'activité des larves exposées à la même concentration mais de 4-8jpf et de 0-8jpf. De plus, l'activité de la LDH est également significativement plus élevée lors d'une exposition de 0-8jpf à une concentration de 1000µg/L par rapport celle observée pour une concentration de 100µg/L.

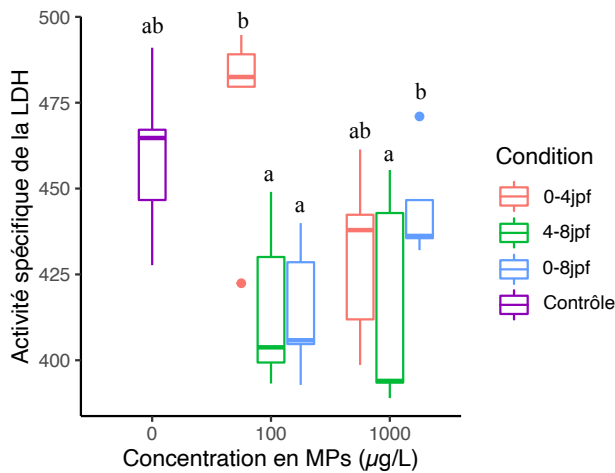


Figure 19 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'activité spécifique de la LDH (lactate déshydrogénase) chez les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations d'exposition (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions d'exposition (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes conditions et concentrations d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.2.2 La glutathion-S-Transférase (GST)

Un effet significatif des conditions d'exposition a pu être mis en évidence sur l'activité de la GST ($p = 0.0002397$) (Figure 20), impliquée dans les mécanismes de défense contre le stress oxydatif. En effet, une exposition de 4-8jpf présente une augmentation significative de l'activité de l'enzyme par rapport aux expositions de 0-4jpf et 0-8jpf.

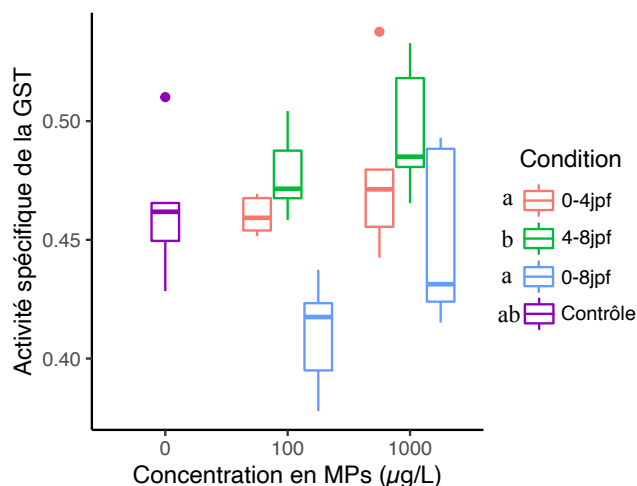


Figure 20 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'activité spécifique de la GST (glutathion-S-transférase) chez les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations d'exposition (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions d'exposition (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes conditions et concentrations d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.2.3 La catalase

Pour l'activité de cette seconde enzyme de détoxification, la catalase, un effet significatif de l'interaction a été mis en évidence lors de la réalisation de l'Anova II ($p = 0.03014$) mais cela n'a pas pu être confirmé lors du test *post-hoc* (Annexe 2).

3.3 Effets de l'exposition des MPs combinés à un challenge bactérien sur l'activité spécifique des enzymes chez les larves de poisson-zèbre

Lors d'un challenge bactérien, aucun effet des concentrations et conditions d'exposition aux MPs n'a pu être mis en évidence sur l'activité de la LDH et de la catalase ($p > 0.05$) (Annexe 3, a et c). Alors qu'un effet significatif des conditions d'exposition a pu être mis en évidence lors de la réalisation de l'Anova II ($p = 0.04542$) pour l'activité de la GST (Annexe 3, b). Or le test *post-hoc* n'a pas confirmé cet effet.

3.4 Effets de l'exposition des MPs seuls sur l'expression relative des gènes

L'expression relative des gènes a été testée selon les concentrations d'exposition (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) ainsi que selon les différentes conditions d'exposition (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf).

3.4.1 Les gènes de détoxification et apoptotiques

L'expression relative de la catalase (*cat*) et de la superoxyde dismutase (*sod*), codant toutes deux pour des enzymes antioxydantes, n'est pas impactée par les différentes concentrations et conditions d'exposition aux MPs. En effet, aucun effet significatif de ces variables n'a pu être mis en évidence sur l'expression de ces deux gènes ($p > 0.05$) (Annexe 4, a et b).

Pour le gène *cyp1a* lié aux mécanismes de détoxification, un effet significatif de l'interaction des concentrations et des conditions d'expositions a été mis en évidence ($p = 0.04241$) (Annexe 4, c). Cependant, ce dernier n'a pas pu être confirmé par le test *post hoc* ($p > 0.05$). Le dernier gène est *bcl2*, un gène du cycle cellulaire lié à l'apoptose. Pour ce dernier, seul un effet significatif des conditions d'exposition aux MPs a été démontré ($p = 0.01562$) (Figure 21). Effectivement, l'expression relative du gène *bcl2* augmente de façon significative chez les larves exposées de 4-8jpf et de 0-8jpf par rapport à celles exposées de 0-4jpf.

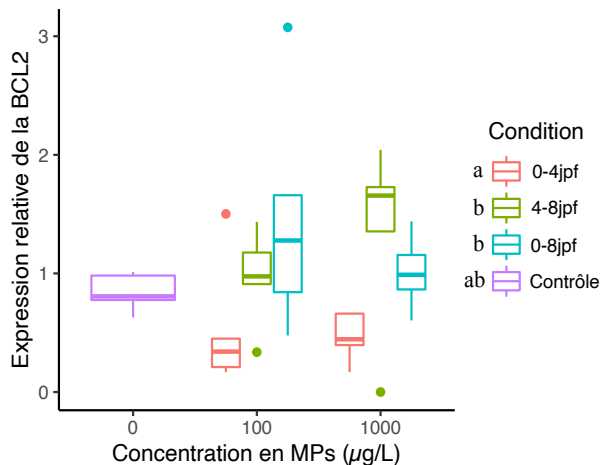


Figure 21 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative des gènes *cyp1a* (a) et *bcl2* (b) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.4.2 Les gènes liés aux fonctions immunitaires

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que, pour trois des gènes liés au système immunitaire sur cinq, aucun effet simple et/ou d'interaction n'a pu être mis en évidence ($p > 0.05$) (Annexe 5). Il s'agit des gènes *il6*, codant pour une cytokine (Annexe 5a) ; *mpo*, marqueur de la présence de neutrophiles (Annexe 5b) et *tfa* (Annexe 5c).

Les derniers gènes de l'immunité ayant été analysés sont *nfkb*, impliqué dans une des premières voies mise en place par la détection d'un corps étranger ou pathogène (voie *toll-nfkb*), et *illb*, codant pour une seconde cytokine. Pour le premier gène, un effet significatif des conditions d'exposition a été déterminé sur l'expression relative des gènes (*nfkb* : $p = 0.0005525$) alors que pour le dernier, c'est un effet d'interaction qui a été mis en évidence ($p = 1.714e-05$). L'expression relative de *nfkb* des larves exposées de 4-8jpf et de 0-8jpf est significativement plus élevée que celle des larves exposées de 0-4jpf (Figure 22a).

Enfin, le gène *illb* montre une expression relative augmentant significativement chez les larves exposées à 1000 µg/L de MPS de 4-8jpf par rapport à celles exposées à la même concentration mais à des temps différents (0-4 et 0-8jpf) et à celles exposées à 100µg/L de MPs de 0-4jpf (Figure 22b).

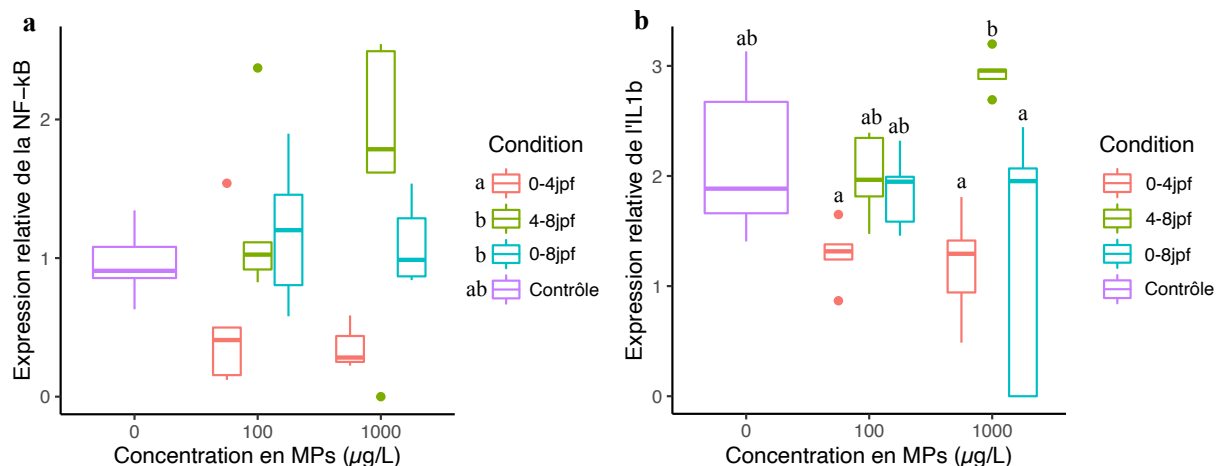


Figure 22 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative des gènes *nfkb* (a) et *il1b* (b) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.4.3 Les gènes liés à la mise en place du microbiote

L'expression de deux gènes intervenant dans l'établissement du microbiote a été mesurée, *pcna* et *fiaf*. Or, les analyses statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence un effet significatif des concentrations et conditions d'exposition sur l'expression relative de ces gènes ($p > 0.05$) (Annexe 6).

3.4.4 Le gène marqueur de la neurotoxicité

Le gène indicateur de la neurotoxicité ayant été analysé est *gfap*. Aucune différence significative au niveau de l'expression du gène n'a pu être mise en évidence selon les différentes concentrations et conditions d'exposition dans le cas d'une exposition aux MPs seuls ($p > 0.05$) (Annexe 7).

3.4.5 Les gènes liés au métabolisme

Quatre gènes liés au métabolisme des poisson-zèbres ont été analysés : *aldo*, *cs* et *hkl1*, impliqué dans le métabolisme des sucres, et *fasn*, impliqué dans la lipogenèse. Cependant, lors de l'exposition aux MPs, nos résultats ne permettent pas de dire que les concentrations et les conditions d'exposition impactent l'expression relative de ces gènes ($p > 0.05$) (Annexe 8).

3.4.6 Analyses en composantes principales de l'expression relatives des gènes lors d'une exposition aux MPs

L'analyse en composantes principales réalisées sur les données d'expression relatives des larves soumises seulement à 100µg/L de MPs indique que 46,2% des données sont représentées par l'axe 1 contre 16,7% expliquées par le deuxième axe. Dans le diagramme de corrélation présenté à gauche sur la Figure 23, il est possible d'observer que tous les gènes sont dirigés vers la gauche du cercle de corrélation. Sur le graphe de droite, les différentes ellipses représentent les conditions d'exposition aux MPs et la distribution des données est telle qu'aucune condition ne peut être identifié comme étant différente d'une autre.

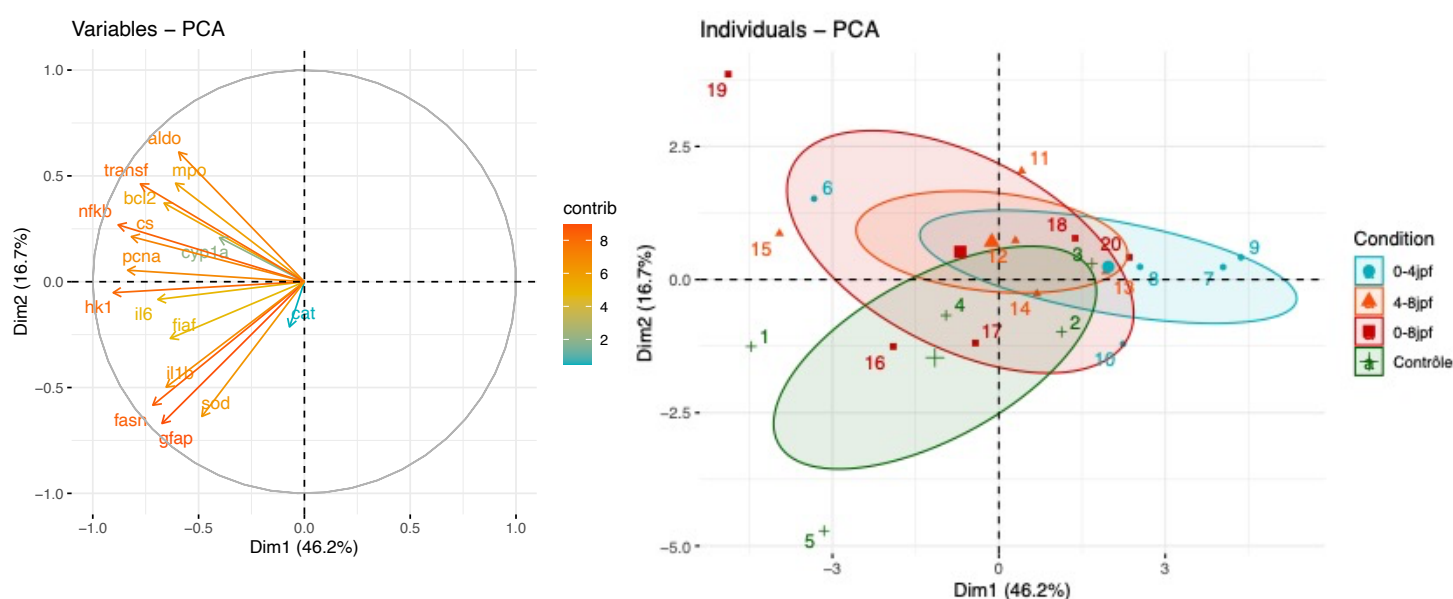


Figure 23 : Graphes des variables (gauche) et des individus (à droite) pour les données d'expression relative des gènes pour les larves uniquement exposées à une concentration de 100µg/L de MPs.

Pour celle réalisée sur les données ayant été soumises à 1000µg/L, les axes représentent respectivement 39% (axe 1) et 17,1% (axe 2) des données ce qui est moins que pour l'exposition à 100µg/L. Pour le diagramme des corrélations des variables (Figure 24, gauche), la même constatation que pour la figure 23 peut être émise. Or, les gènes ayant une contribution moindre (flèches de taille plus petite) pour ces deux axes semblent être différents. En effet, pour les données exposées à 100µg/L, ce sont les gènes *cat* et *cyp1a* qui sont les moins expliqués par ces axes alors que pour la concentration de 1000µg/L, ce sont les gènes *tfa* et *aldo*. Cependant, la représentation de droite (Figure 24), montre bien que les différents clusters formés par la distribution des données. Il semblerait que les larves exposée de 0-4jpf ont une expression relative des gènes différentes de celles exposées de 4-8jpf alors que les larves non exposées et celles exposées de 0-8jpf semblent présenter des expressions relatives similaires, de par la superposition des clusters.

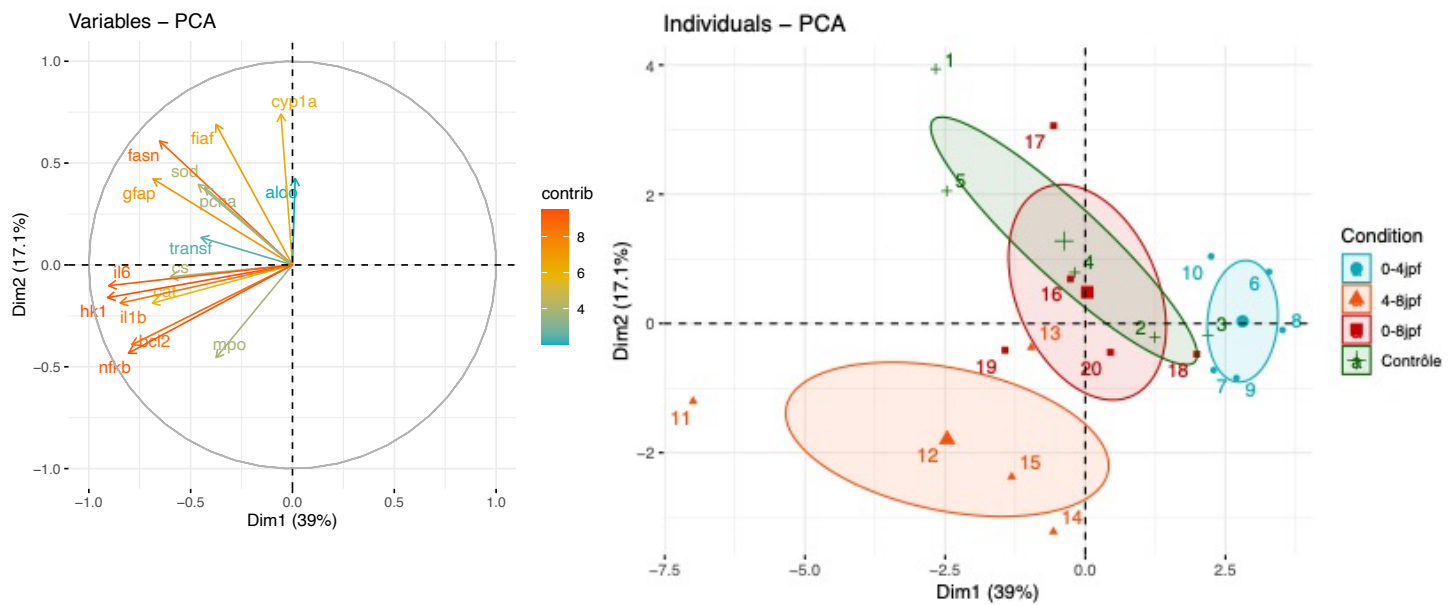


Figure 24 : Graphes des variables (gauche) et des individus (à droite) pour les données d'expression relative des gènes pour les larves uniquement exposées à une concentration de 1000µg/L de MPs.

3.5 Effets de l'exposition des MPs combinés à un challenge bactérien sur le niveau d'expression relative des gènes

En plus des mesures de l'expression relative des différents gènes testés, des indices (fold change normalisé) pour les expressions montrant un changement significatif lors d'une coexposition (MPs et bactérie) ont été calculés afin de mettre en évidence une surexpression ou une sous-expression de ces derniers lorsque le système immunitaire est stimulé.

3.5.1 Les gènes de détoxification et apoptotique

Un effet significatif de l'interaction des concentrations et des conditions d'exposition sur l'expression relative du gène de la catalase (*cat*) a pu être mis en évidence ($p = 0.01238$) lorsque les larves sont exposées à un challenge bactérien en plus des MPs (Figure 25). En effet, il semblerait que l'expression du gène, impliqué dans les défenses contre le stress oxydant, augmente de manière significative lorsque les larves sont exposées à 1000µg/L de MPs de 0-4jpf que quand elles sont exposées de 0-8jpf à 100µg/L et de 4-8jpf à 1000µg/L de MPs.

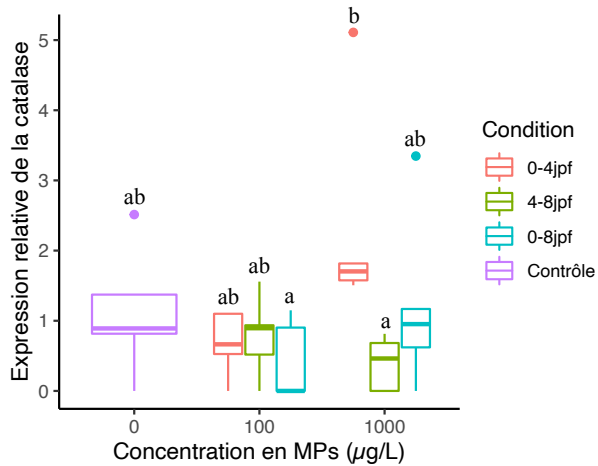


Figure 25 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *cat* sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

Quant aux gènes *bcl2*, *sod* et *cyp1a*, aucun effet simple et/ou d'interaction des concentrations et des conditions d'exposition n'a pu être mis en avant sur leur expression relative ($p > 0.05$) (Annexe 9). Cela ne nous permet pas de dire s'il y a une augmentation ou une diminution de l'expression pour les différents gènes. Cependant, le fold change normalisé pour le gène *bcl2*, responsable de l'apoptose, indique que son expression est significativement impactée par l'interaction des concentrations et des conditions d'exposition ($p = 9.025e-10$) (Figure 26). En effet, le fold change normalisé du gène pour les larves exposées à 1000µg/L de MPs de 4-8jpf indique une sous-expression significative du gène par rapport au moment où elles sont exposées de 0-8jpf, pour lesquelles le gène est également significativement sous-exprimé par rapport aux larves exposées aux MPs de 0-4jpf. De plus, il semblerait que l'exposition des larves de 4-8jpf cause une augmentation de l'expression du gène significative à 100µg/L de MPs par rapport à 1000µg/L. Enfin, à 1000µg/L, l'expression du gène augmente significativement chez les larves exposées de 0-4jpf par rapport aux contrôles non exposés aux MPs.

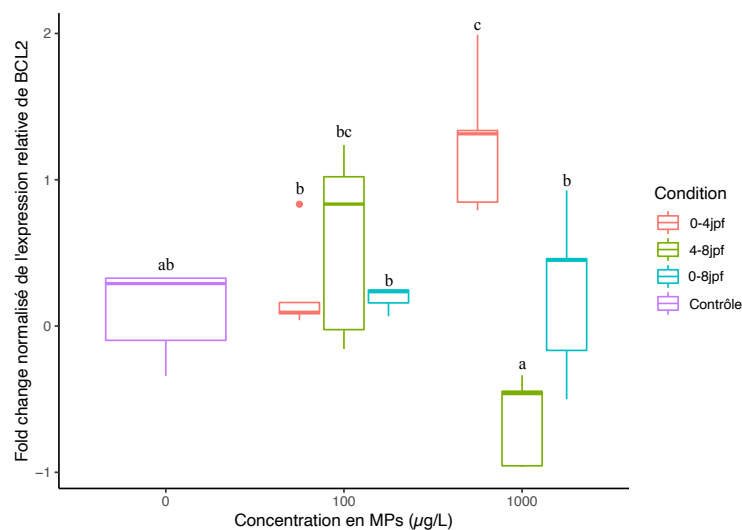


Figure 26 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *bcl2* sous forme d'indice (fold change normalisé) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.5.2 Les gènes liés aux fonctions immunitaires

La combinaison de l'exposition aux MPs à un challenge bactérien n'a mis en évidence aucun effet des concentrations et des conditions d'exposition sur l'expression relative de trois gènes (Annexe 10, a-c). Les gènes sont *nfkb*, *il6* et *illb*. Ensuite, pour le gène *tfa*, le test de Tuckey n'a pas confirmé l'effet de l'interaction des concentrations et des conditions d'exposition sur son expression que l'Anova II avait mis en évidence ($p = 0.007598$) (Annexe 10, d).

Toutefois, pour les gènes *nfkb* et *illb*, un effet significatif de l'interaction des concentrations et des conditions d'exposition aux MPs (*nfkb* : $p = 3.718e-05$; *illb* : $p = 1.945e-05$) a été mis en évidence par le fold change normalisé (Figure 27). Pour le gène *nfkb*, impliqué dans la voie *toll-nfkb*, les larves exposées à 1000 $\mu\text{g/L}$ de MPs de 0-4jpf présentent une augmentation de l'expression du gène par rapport aux larves exposées aux autres conditions d'expositions. Enfin, pour le gène *illb*, les larves exposées à 100 $\mu\text{g/L}$ de MPs de 0-4jpf et 4-8jpf et à 1000 $\mu\text{g/L}$ à 0-4jpf montrent une augmentation significative de l'expression du gène par rapport aux larves exposées de 4-8jpf à 1000 $\mu\text{g/L}$ de MPs.

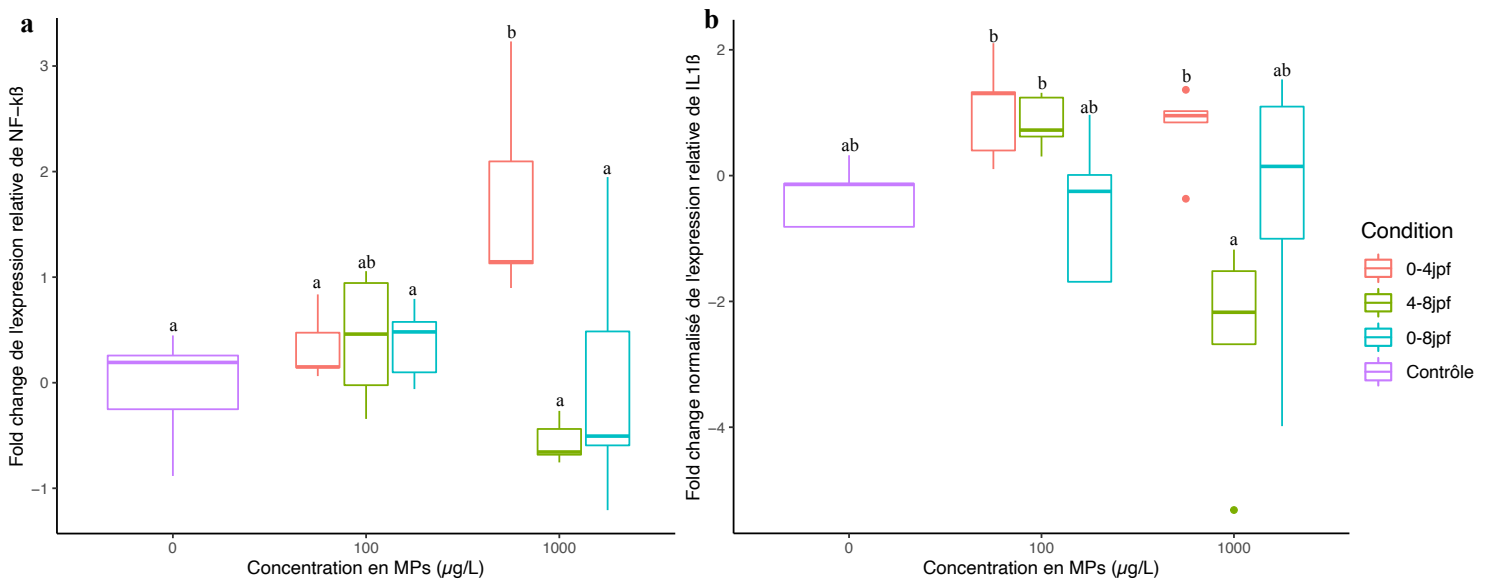


Figure 27 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative des gènes *nfkb* (a) et *il1b* (b) sous forme d'indice (fold change normalisé) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

Pour le dernier gène lié à l'immunité, c'est-à-dire *mpo*, un effet significatif de l'interaction des deux variables a pu être mis en évidence sur l'expression relative de ce gène ($p = 0.007598$) (Figure 28). Il semblerait que l'expression relative du gène *mpo* augmente

significativement lorsque les larves sont exposées à 1000 $\mu\text{g/L}$ de MPs du 4-8jpf par rapport aux larves exposées de 0-4jpf à 100 $\mu\text{g/L}$ de MPs et de 0-8jpf à 1000 $\mu\text{g/L}$ de MPs.

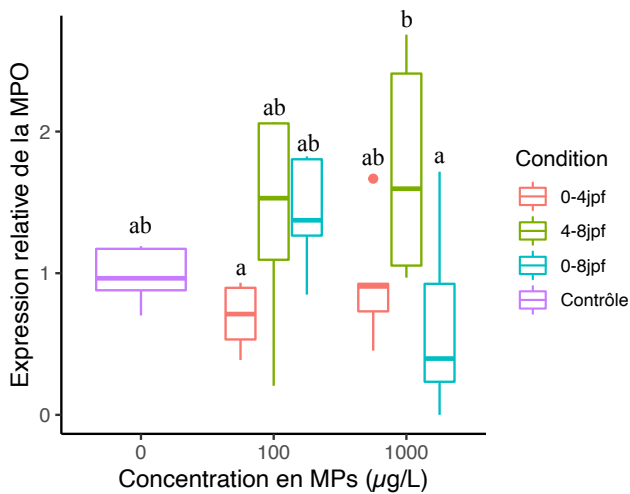


Figure 28 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *mpo* sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.5.3 Les gènes liés à la mise en place du microbiote

Les analyses réalisées sur les deux gènes liés à la mise en place du microbiote indiquent pour le premier, *pcna*, qu'aucun effet significatif des concentrations et des conditions d'exposition aux MPs n'a été mis en évidence (Annexe 11). Alors que pour le second gène, *fiaf*, un effet significatif des concentrations d'exposition a été mis en évidence sur l'expression relative du gène ($p = 0.009708$). En effet, une diminution significative de son expression relative a été mise en évidence pour la concentration de 100 $\mu\text{g/L}$ par rapport à l'expression du gène dans la situation contrôle (Figure 29).

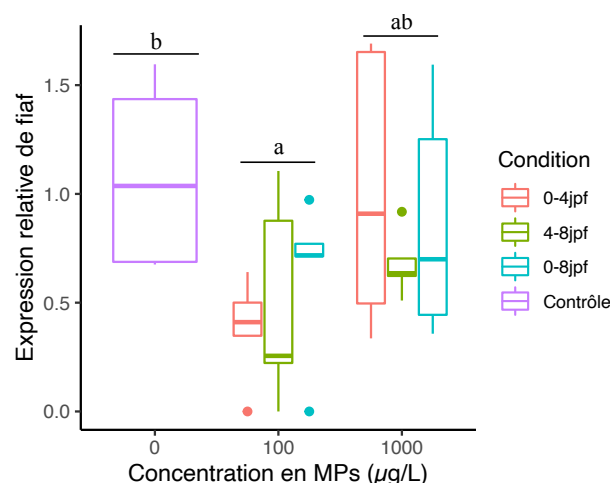


Figure 29 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *fiaf* sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.5.4 Le gène marqueur de la neurotoxicité

Aucun effet significatif simple et/ou d'interaction des concentrations et des conditions d'exposition n'a pu être mis en évidence sur l'expression relative du gène indicateur de la neurotoxicité (*gfap*) ($p > 0.05$) par les analyses statistiques (Annexe 12).

3.5.5 Les gènes liés au métabolisme

Après un challenge bactérien, nos résultats montrent que l'expression relative des gènes suivant *aldo*, *fasn*, *cs*, *hk1* ne change pas significativement selon les concentrations et les conditions d'exposition aux MPs (Annexe 13). Alors qu'un effet de l'interaction de ces deux variables significatif a été mis en évidence par le fold change normalisé de l'expression relative du gène *hk1* ($p = 0.005251$) (Figure 30), impliqué dans la première étape de la glycolyse. En effet, les fold change normalisé pour l'expression de ce gène indique une augmentation significative de son expression lorsque les larves sont exposées de 0-4jpf à une concentration de 1000 $\mu\text{g/L}$ de MPs par rapport aux autres conditions testées.

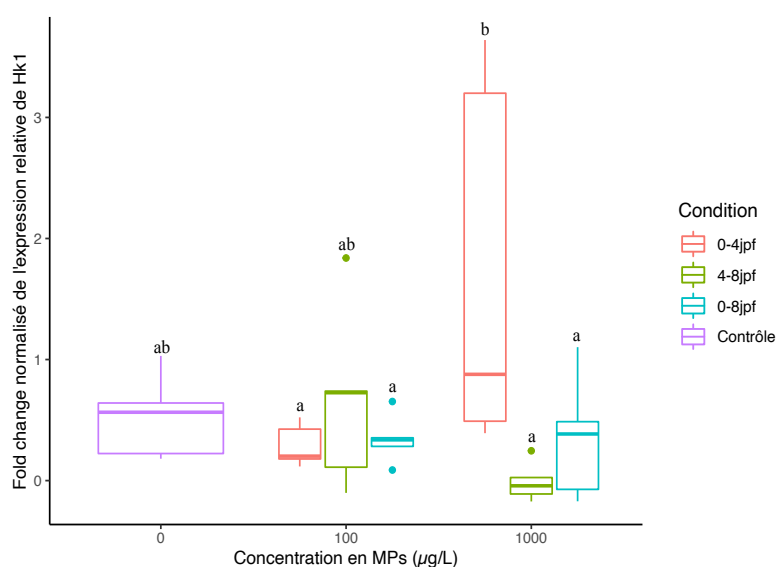


Figure 30 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *hk1* sous forme d'indice (fold change normalisé) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

3.5.6 Analyse en composantes principales des expressions relatives des gènes

L'analyse en composantes principales réalisée sur les expressions relatives des larves soumise à 100 $\mu\text{g/L}$ de MPs ainsi qu'à un challenge bactérien (*A. salmonicida achromogenes*) indique que 51,22% des données sont représentées par l'axe 1 contre 20,24% expliquées par le

deuxième axe. Dans le diagramme de corrélation présenté à gauche sur la Figure 31, il est possible d'observer que tous les gènes sont dirigés vers la gauche du cercle des corrélations. Sur le graphe de droite, les différentes ellipses représentant les différentes conditions d'exposition aux MPs se superposent faiblement laissant apparaître que dans certains cas, l'expression des gènes ne varie pas selon les différentes conditions.

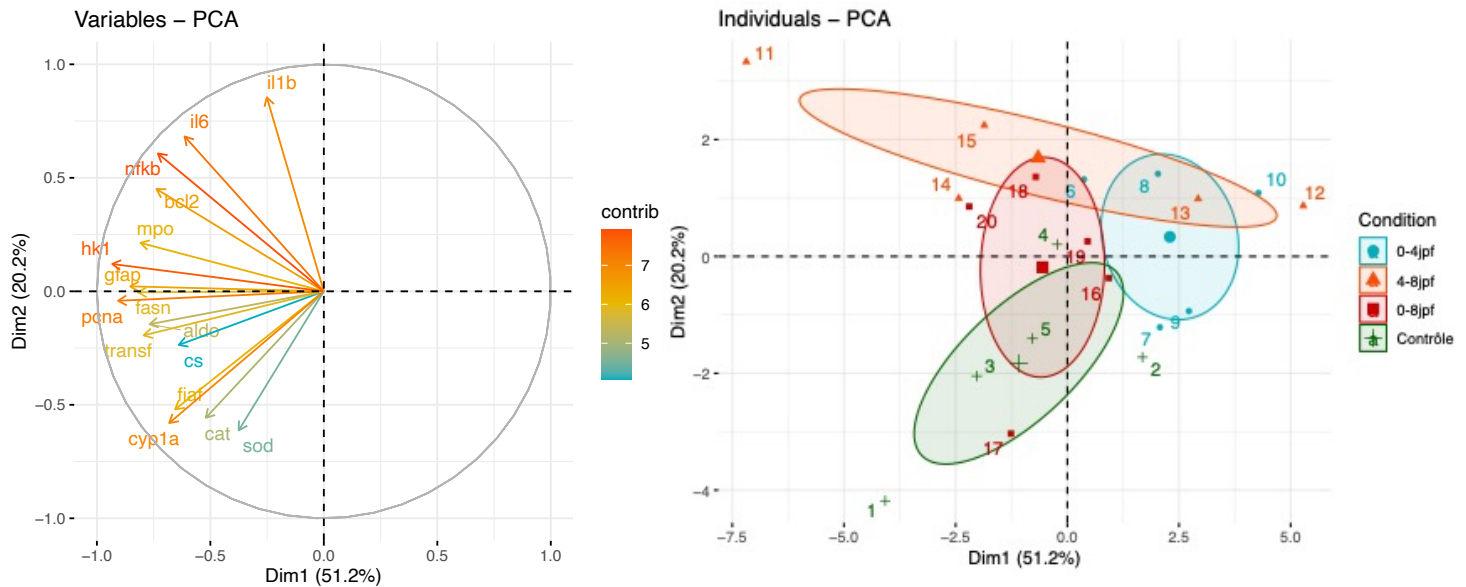


Figure 31 : Graphes des variables (gauche) et des individus (à droite) pour les données d'expression relative des gènes pour les larves exposées à une concentration de 100µg/L de MPs et à un challenge bactérien.

Pour celle réalisée sur les données ayant été soumises à 1000µg/L avec un challenge bactérien, les axes représentent respectivement 44,14% (axe 1) et 16,56% (axe 2) des données. Pour le diagramme des corrélations des variables (Figure 32, gauche), les gènes sont également tous dirigés vers la gauche du cercle. Les gènes ayant une contribution moindre semblent être différents entre les diagrammes pour la concentration en MPs de 100µg/L par rapport à celle de 1000µg/L. En effet, pour les données exposées à 100µg/L, ce sont les gènes *sod* et *cs* qui sont les moins expliqués par ces axes. Pour la concentration de 1000µg/L, les gènes *cat* et *il6* font à nouveau partie de ceux ayant une faible contribution. Puis, la représentation de droite (Figure 32) montre bien la distribution des données selon les différentes conditions d'exposition. Il est possible de remarquer que les ellipses correspondant aux différents temps d'exposition se superposent les unes aux autres à certains endroits.

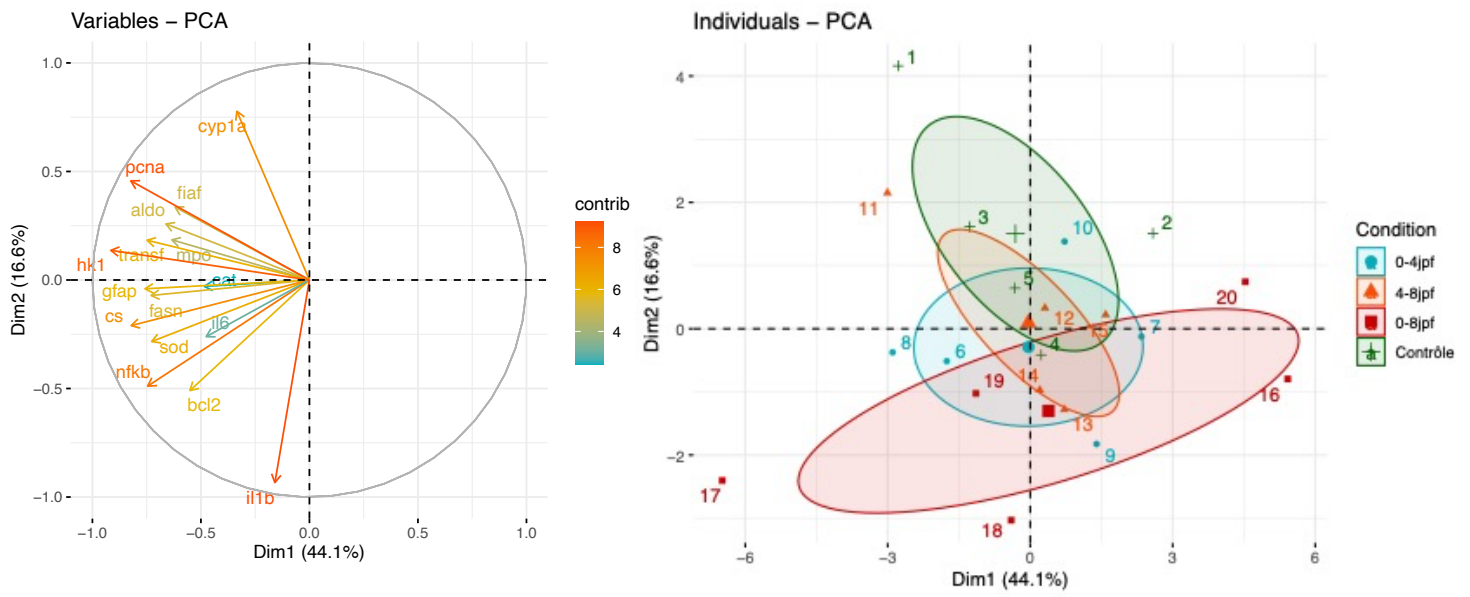


Figure 32 : Graphes des variables (gauche) et des individus (à droite) pour les données d'expression relative des gènes pour les larves exposées à une concentration de 1000 μ g/L de MPs et à un challenge bactérien.

4 Discussion

De nos jours, les poissons sont soumis à de nombreux changements impactant leur milieu de vie comme la pollution (Finlayson 2018). Ces divers changements peuvent être considérés comme des facteurs de stress pour ces organismes car l'équilibre existant entre eux et leur environnement est perturbé. Afin de restaurer cet équilibre, les individus devront mettre en place une ou plusieurs réponses. Ces dernières impacteront diverses fonctions biologiques comme les systèmes neuronal, endocrinien et immunitaire (Tort 2011). L'exposition des larves de poisson-zèbre (*Danio rerio*) aux microbilles de polystyrène peut alors être considérée comme un stress ainsi que le challenge bactérien imposé aux larves au 8^{ème} jour d'exposition.

Dans le cadre de ce mémoire, ce sont les impacts sur le système immunitaire qui seront principalement décrits, sachant que ce n'est pas le seul système impacté par les MPs et une infection bactérienne. Il a été mis en évidence qu'un stress induit dans les premiers stades de vie des poissons peut renforcer les réponses immunitaires futures (Cornet et al. 2020). De plus, les MPs peuvent libérer davantage d'additifs dans le milieu lorsqu'ils se dégradent qu'en condition de laboratoire. Ils peuvent aussi constituer un substrat où des additifs, tel le bisphénol A, peuvent adhérer et sur lequel des bactéries peuvent se développer (Hale et al. 2020).

Nous tenterons donc d'évaluer les effets des MPs associés ou non à une bactérie pathogène (*A. salmonicida*) sur le système immunitaire des larves de poisson-zèbre.

4.1 La survie

Un effet des conditions d'exposition aux MPs a été mis en évidence sur la survie des larves de poisson-zèbre et ce dernier semble mettre en évidence que les larves exposées de 4-8jpf ont un taux de survie significativement plus faible que les larves exposées de 0-8jpf et 0-4jpf. Ces résultats concordent avec ceux d'autres études ayant observé une diminution de la survie lors d'une exposition de MPs (Lei et al. 2018; Run Zhang et al. 2020). Ces deux études, Lei et al. (2018) et Zhang et al. (2020), ont mis en évidence une augmentation de la mortalité des larves de poissons-zèbres dépendante de la concentration⁵ en MPs. De plus, la seconde étude a démontré que la mortalité augmentait également en fonction du temps d'exposition aux MPs, qui étaient, pour cette étude, 8, 32 et 96 heures (Run Zhang et al. 2020). L'exposition aux MPs

⁵ Pour l'étude de Lei et al. (2018), les concentrations en MPs étaient 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 et 10.0 mg/L. Pour celle de Zhang et al. (2020), elles étaient de 0, 0.05, 0.1, 1, 5, 10mg/L.

après que la bouche soit ouverte paraît logique car les MPs sont capables d'entrer dans l'organisme et de causer des dommages menant à la mort de l'organisme. Ceci explique pourquoi la survie est plus faible chez les larves exposées aux MPs de 4-8jpf et de 0-8jpf. Cependant, le pic de mortalité ayant été observé 24hpf est sûrement dû aux MPs qui perturbent le développement embryonnaire en le retardant ou en l'arrêtant.

4.2 L'exposition aux MPs affecte l'immunité innée

Premièrement, $\text{NF-}\kappa\beta$ est une réponse inflammatoire activée par la détection de la présence d'un xénobiotique ou un agent pathogène (LPS) dans l'organisme des larves par les TLRs (Murdoch et Rawls 2019; Trede et al. 2004). Cette réponse permet, par la suite, la production de cytokines pro-inflammatoires (Ko et al. 2017). Ceci explique l'augmentation de l'expression de *nfkb* observée aux conditions d'exposition, 4-8jpf et 0-8jpf, au cours desquels des MPs sont capables d'entrer dans les larves et de causer des dommages tissulaires. Sachant que les MPs utilisés ici sont des microbilles de PS, leur surface est lisse. Ce qui signifie qu'elles ne s'accrochent pas aux tissus à cause de leur forme, à comparer aux fibres et aux fragments (Mazurais et al. 2015; Qiao, Deng, et al. 2019). Ce n'est donc pas leur forme qui apparaît comme étant responsable de l'inflammation mais elles sont capables de s'accumuler dans l'organisme, au niveau de l'intestin par exemple, causant ainsi l'élargissement de celui-ci (Mazurais et al. 2015; Yin et al. 2019). À un moment donné, il se pourrait que l'élargissement est tel que la paroi intestinale, fragilisée, céderait ainsi sous la quantité de billes de plastiques ingérée par le poisson. Une seconde hypothèse serait que des bactéries se soient développées dans les boîtes de pétri activant ainsi la réponse immunitaire. Cette bactérie entre alors avec les billes lorsque la bouche et le système digestif s'ouvrent à 5jpf (Stephens et al. 2016) ce qui coïncide avec les conditions pour lesquelles un effet a été observé.

Deuxièmement, l'expression du gène codant pour IL-6 (interleukine 6) n'est pas modifiée selon les différents traitements d'exposition aux MPs. Alors que *il1\beta* (Interleukine 1\beta) est significativement surexprimé lorsque les larves sont exposées de 4-8jpf à 1000\mu\text{g/L} de MPs par rapport à quand elles sont exposées à la même concentration de 0-4jpf et 0-8jpf et à 100\mu\text{g/L} de MPs de 0-4jpf. En général, *il6* et *il1\beta* ont des profils d'expression similaire (Varela et al. 2012) or ce n'est pas ce que nous avons observé dans cette étude. De plus, l'expression de *il6* ne concorde pas avec ce qui a été observé dans les études de Cornet et al. (2020), Jin et al. (2018) et Varela et al. (2012) par rapport au gène *il1\beta*. Dans ces dernières, il s'avère que

l'expression de ces cytokines augmente lors de l'expression des MPs et lors d'une infection par une bactérie pathogène.

Un premier postulat que nous émettrons concerne IL6 ayant pour but d'expliquer nos résultats qui diffèrent de ce qui est observé dans la littérature. Il se pourrait que chez certaines larves, l'exposition aux MPs dès le début de leur vie ait retardé le développement du système immunitaire entraînant une production moindre d'ARN, codant par exemple pour des cytokines, par rapport aux larves n'ayant pas subi de mauvais développement immunitaire. Par conséquent, lorsque le système immunitaire serait stimulé par un des traitements d'exposition, la quantité de gènes produits par les larves ayant eu un développement tardif de leur immunité augmente par rapport aux larves ayant eu un développement normal et soumises à un traitement ne stimulant pas leur système immunitaire. Cette augmentation permet alors à ces larves de rattraper la quantité de gènes présente dans les traitements n'ayant pas induit de surexpression des gènes. Donc, lors des analyses, les niveaux d'expression étant similaires dans tous les traitements n'ont pu nous aider à mettre en avant la stimulation subie par certaines des larves soumises à certains traitements.

Un second postulat quant à nos résultats pour *il1β* serait qu'en exposant les larves de 4-8jpf, le tractus digestif s'ouvre permettant ainsi aux microbilles de s'y accumuler. Cette accumulation cause la distension de la paroi intestinale menant à sa rupture à un moment donné. Cette rupture provoque une inflammation chez les larves amenant à la production de IL1β qui permet par la suite la venue des macrophages et des neutrophiles ainsi qu'à une dysbiose intestinale. Ces deux cellules seraient responsables de la survie des cellules permettant la réparation et/ou la régénérescence des tissus lésés (Hasegawa et al. 2017; Jin et al. 2018; Novoa et Figueras 2012; Qiao, Deng, et al. 2019).

Troisièmement, l'expression du gène *mpo* ne semble pas changer selon les différentes concentrations et conditions d'exposition aux MPs. La MPO (myéloperoxydase) se trouve dans le cytoplasme des neutrophiles et joue un rôle dans le marquage par l'opsonine et dans la phagocytose (Cornet et al. 2020; Gillet 2021). Le fait que l'expression de ce gène n'est pas impactée par les MPs pourrait indiquer que leur présence dans l'organisme des larves n'induit pas une inflammation nécessitant la présence des neutrophiles. Cela pourrait également mettre en avant le rôle de la MPO dans la dégradation des pathogènes (Cornet et al. 2020; Gillet 2021) car, dans ce cas-ci, les larves sont uniquement exposées à des MPs. La MPO n'aurait donc pas la capacité de dégrader les MPs car ce ne sont pas des agents pathogènes.

Le dernier gène étudié en lien avec l'immunité innée des larves de poisson-zèbre est *tfa*. Il code respectivement pour la transferrine- α , impliquée dans la réponse inflammatoire (Spead et al. 2018). Les larves soumises uniquement aux MPs ne montrent aucun changement au niveau de l'expression relative de ce gène. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la transferrine- α n'est pas suffisamment exprimée que pour mettre en avant la présence d'une inflammation. Une seconde explication serait due à la fonction de détoxification des métaux de la TF α (« ZFIN Gene: tfa » s. d.). Ainsi, aucun changement d'expression n'est observé car les larves ne sont pas exposées à des métaux lourds mais à des MPs.

Ensuite, des gènes régulés positivement par le microbiote intestinal et permettant ainsi d'évaluer la mise en place de ce dernier ont été analysés. Il s'agit de *fiaf* et *pcna*, impliqués respectivement dans le métabolisme des nutriments et dans la prolifération cellulaire (Novoa et Figueras 2012; Tan et al. 2019). Ce microbiote, essentiel pour les fonctions digestives et immunitaires, correspond à l'interaction au niveau des muqueuses entre des microorganismes commensaux et un hôte, ici les larves de poisson-zèbre (Pérez et al. 2010). Il est dépendant du milieu de vie et de l'alimentation de l'hôte (Pérez et al. 2010; Stephens et al. 2016).

Pour ces deux gènes, *fiaf* et *pcna*, aucun changement au niveau de leur expression n'a été mis en évidence lors d'une exposition aux MPs.

D'une part, *fiaf* est principalement exprimé au niveau des tissus adipeux et du foie. D'ailleurs, une augmentation de son expression serait indicateur du jeûne tandis que la diminution de celle-ci serait synonyme d'un apport alimentaire riche en graisse (Kersten et al. 2000). En outre, la protéine Fiaf est un inhibiteur de la lipoprotéine lipase, étant responsable de la dégradation des triglycérides afin de fournir de l'énergie (Guo et al. 2017; Nelson et Cox 2017). D'après nos résultats, il semblerait que les MPs ne s'accumulent pas dans le tractus digestif des larves de poisson-zèbre les empêchant de se nourrir ou d'entrer en jeûne, comme cela a été montré dans l'étude de Yin et al. (2019). Cette absence d'accumulation peut être due au fait que leur surface est lisse et que les microbilles finissent par être évacuées via les fèces (Mazurais et al. 2015; Eriksen et al. 2014).

D'autre part, *pcna* joue un rôle dans la synthèse, la réplication et la réparation de l'ADN car c'est lui qui est responsable du maintien d'une cellule en vie ou de sa mort (Kelman 1997; Paunesku et al. 2001). Son rôle dans l'apoptose est médié par la protéine p53 (Paunesku et al. 2001). Dans l'étude de Gu et al. (2020), ils ont analysé l'effet des MPs sur la capacité de régénération que possède le poisson-zèbre. Parmi les gènes qu'ils ont analysés, il y avait la *pcna*

et il semblerait que le niveau d'ARNm pour ce gène ait tendance à augmenter avant de redescendre. Donc dans le cas de cette étude, la *pcna* apparaît également comme étant un gène associé à la régénération des tissus chez le poisson zèbre (Gu et al. 2020). L'augmentation d'ARNm pour la *pcna* pourrait indiquer qu'il y a soit réplication de l'ADN soit réparation de l'ADN (Paunesku et al. 2001). En outre, *pcna* est un gène exprimé dans diverses structures dont le système digestif et le système nerveux (« ZFIN Gene: pcna » s. d.). Dans le cas de notre étude, l'absence de changement au niveau de l'expression de *pcna* pourrait indiquer que les MPs ne savent pas passer la barrière formée par le microbiote intestinal et le mucus, de par leur taille. Les MPs n'atteignent donc pas les cellules de la paroi intestinale les laissant intactes. Cela permet d'indiquer la présence du microbiote intestinal et de son rôle de protecteur face à des pathogènes et/ou corps étrangers.

4.3 L'association d'une bactérie pathogène aux MPs affecte l'immunité innée

D'abord, avec un challenge bactérien au 8^{ème} jour, la réponse immunitaire causée par l'exposition aux MPs pour *nfkB* semble avoir été annulée car plus aucun effet quel qu'il soit n'a été mis en évidence pour l'expression de ce gène. Toutefois, le fold change normalisé indiquant l'impact du challenge bactérien sur les gènes ayant déjà été soumis à une exposition aux MPs montre que *nfkB* est surexprimé chez les larves exposées à 1000µg/L de MPs de 0-4µm. Vu que, pendant ce temps d'exposition, les MPs n'entrent pas dans les larves car la bouche et le système digestif sont clos, ils se pourraient que les MPs s'accumulent à la surface des poissons, au niveau de la peau. Par conséquent, les MPs impacteraient également le microbiote de la peau. Des études, comme celles de Abbasi et al. (2018), Feng et al. (2019) et W. Wang, Ge, et Yu (2020) ont effectivement mis en évidence la capacité des MPs à s'accumuler à la surface des poissons pouvant causer le détachement des écailles, des lésions permettant ainsi aux MPs d'entrer dans l'organisme via le système circulatoire. De plus, l'étude de Feng et al. (2019) mentionne que la quantité de MPs au niveau de la peau de certains poissons prélevés dans une baie de Chine serait largement supérieure à la quantité retrouvée dans l'intestin (Figure 33).

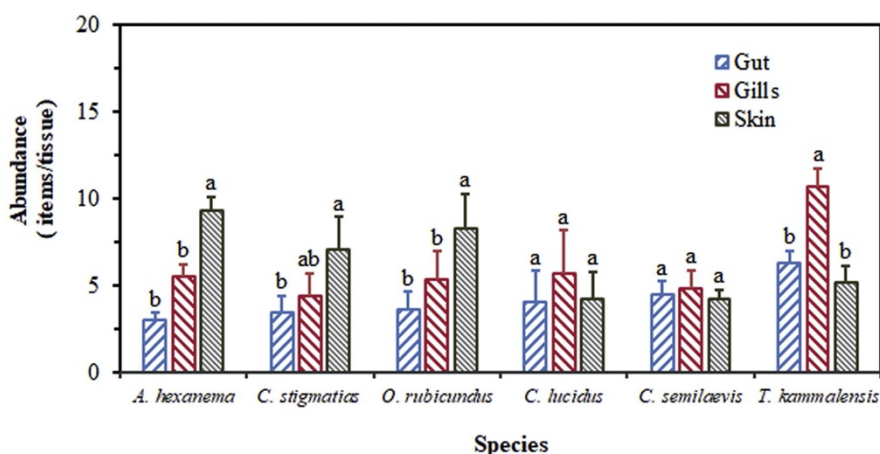


Figure 33 : Barplot représentant la quantité de MPs au niveau de la peau, des branchies et de l'estomac chez six espèces de poissons présents dans la baie de Haizhou en Chine. Les lettres représentent les différences significatives entre les différents tissus (Feng et al. 2019).

Concernant les expressions relatives de *il6* et *il1β*, l'association des MPs avec un challenge bactérien n'induit aucune modification, comme pour *nfkβ*. Dans le cas de *il6*, l'hypothèse émise est la même que pour l'exposition aux MPs uniquement. Tandis que pour *il1β*, il semblerait que les effets de l'exposition aux MPs seuls soient annulés lors de l'ajout d'un challenge bactérien car aucune distinction n'a pu être faite entre les différents groupes. Cela indiquerait que les larves ne se défendent pas de façon normale par rapport à ce qui peut être observé dans les études portant sur l'infection bactérienne, notamment celle de Cornet et al. (2020). En effet, une augmentation de l'expression des cytokines a été mise en évidence lorsque les larves étaient exposées à *A. salmonicida* (Cornet et al. 2020). Selon notre étude, les larves se défendent moins lors d'une coexposition MPs-bactérie ce qui peut provoquer leur mort. Néanmoins, sur base de l'expression des gènes après l'exposition aux MPs, le fold change normalisé indique que les larves exposées de 0-4jpf pour les deux concentrations testées et de 4-8jpf à 100μg/L montrent une surexpression significative de *il1β*. A nouveau, la surexpression observée avant l'ouverture de la bouche et du système digestif pourrait être due au fait que les MPs et les bactéries interagissent au niveau de la peau. De plus, l'augmentation de l'expression mise en évidence par le fold change de 4-8jpf coïncide avec l'ouverture de la bouche et du système digestif menant à l'ingestion de MPs sur lesquels des bactéries auraient adhéré stimulant ainsi le système immunitaire des larves.

L'expression de *mpo*, lors du challenge bactérien, augmente significativement pour les larves exposées de 4-8jpf à 1000μg/L par rapport à celles exposées de 0-4jpf à une concentration similaire à celle retrouvée dans l'environnement (100μg/L) et de 0-8jpf pour une dose 10x supérieure à celle de l'environnement. Le fait qu'une augmentation de l'expression

du gène *mpo* soit observée lors de la combinaison de MPs à des bactéries coïncide avec ce qui a été mis en évidence dans l'étude de Cornet et al. (2020). En effet, cette augmentation de l'expression permet d'affirmer que les neutrophiles sont présents au niveau des sites d'inflammation et d'infection chez les larves de poisson-zèbres exposées aux MPs de 4-8jpf suivi d'un challenge bactérien. Cela semble mettre en évidence le rôle des neutrophiles dans la dégradation des pathogènes, qu'est *A. salmonicida achromogenes* dans le cas de notre étude ainsi que dans l'étude de Cornet et al. (2020). Il est vrai que la MPO libérée par les neutrophiles sur le(s) site(s) d'inflammation et d'infection a une activité bactéricide expliquant l'implication des neutrophiles dans les défenses contre un pathogène (Cornet et al. 2020; Gillet 2021; « ZFIN Gene: mpx » s. d.). Cependant, la MPO est également liée à la production de peroxydes antimicrobiens ce qui signifie qu'une surexpression excessive du gène amène à la production de ROS. Ces ROS devront être pris en charge par le système de détoxification (Cornet et al. 2020; Murdoch et Rawls 2019) (cf. 4.4.1. Les systèmes de détoxification).

Enfin, pour le gène *tfa*, l'association des MPs à *A. salmonicida achromogenes* selon différents temps et concentration d'exposition n'a pas eu d'effet sur l'expression relative de ce gène, contrairement à la *mpo*. Dans la récente étude menée par Cornet et al. (2020), il semblerait que les profils d'expressions pour les gènes *mpo* et *tfa* soient semblables et montrent une expression plus élevée de ces derniers lorsque les poissons sont infectés une seconde fois par le pathogène. Ceci pourrait probablement être dû au fait que les gènes ne sont pas présents directement dès le début de la vie des larves mais apparaissent plus tard. Bien que ces gènes seraient exprimés durant toute la vie du poisson (« ZFIN Gene: mpx » s. d.; « ZFIN Gene: tfa » s. d.).

Comme pour le point précédent, les gènes régulés par le microbiote ont été analysés lors de l'exposition aux MPs associée à une bactérie pathogène.

Pour le premier gène lié au microbiote intestinal, lorsque les larves ont été exposées à un challenge bactérien après l'exposition aux MPs, l'expression de *fiaf* diminue significativement à 100µg/L de MPs par rapport aux larves non-exposées aux MPs. Cette diminution indique donc que la lipoprotéine lipase n'est pas inhibée permettant ainsi la libération d'énergie (Nelson et Cox 2017). Ceci pourrait être mis en lien avec le fait que la LDH n'est pas exprimée lors de l'ajout du challenge bactérien à cause d'un stress oxydatif trop important (cf. 4.4.2.1. L'activité de la LDH). Par conséquent, les larves ne seraient pas capables de produire assez d'énergie pour contrer les effets néfastes des MPs et de l'infection

bactérienne. Ces larves ont donc mis en place cette voie de secours empêchant l'enzyme Fiaf de fonctionner et permettant ainsi la libération d'énergie via l'action de la lipoprotéine lipase.

Le second gène, *pcna*, dont le rôle a été mentionné dans le point précédent, ne montre aucun changement au niveau de son expression relative lorsque les larves sont exposées à un challenge bactérien en plus des MPs. Cela pourrait aussi être expliqué par la présence du microbiote intestinal et du mucus empêchant les MPs et les bactéries d'atteindre la paroi intestinale et de l'endommager.

4.4 L'exposition aux MPs associée ou non à une bactérie pathogène impacte d'autres mécanismes et systèmes physiologiques

4.4.1 Les systèmes de détoxification

4.4.1.1 Les activités de la GST et la catalase

La GST agit contre les composés ayant été peroxydés et endommagés par les ROS (J. Bhagat, Ingole, et Singh 2016). L'augmentation de l'activité de la GST observée chez les larves exposées aux MPs à partir de 4-8jpf semble être liée à une production excessive de ROS causant un stress oxydatif déclenchant les mécanismes de défenses anti-oxydantes. Cette augmentation excessive de ROS lors d'une exposition de MPs a été observée dans l'étude menée par Umamaheswari et al. en 2021. Dans cette dernière, des poissons-zèbres adultes ont été exposés à deux concentrations de MPs (10 et 100µg/L) pendant 35 jours (Umamaheswari et al. 2021). De plus, une autre étude, où des poisson-zèbres adultes ont été exposés à une concentration de MPs de 2mg/L, a également mis en évidence que la voie de détoxification de la GST est activée lorsque la balance ROS-antioxydant penche vers une production de ROS excessive (Santos et al. 2021).

La catalase est une enzyme anti-oxydante produite par les cellules des poissons intervenant dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en oxygène (O₂) et en eau (H₂O) (Hirayama, Cho, et Sassone-Corsi 2007). Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un impact significatif de l'exposition des MPs sur l'activité spécifique de la catalase. Ceci a également été observé par trois autres études, celles de Parenti et al. (2019), Pitt et al. (2018) et Santos et al. (2020).

Dans la première étude, les chercheurs ont conclu que les concentrations de 0 et 1 mg/L de nanoplastiques n'induisaient qu'un léger stress oxydatif sur des embryons de poisson-zèbre exposés de 72 à 120hpf (Parenti et al. 2019). Cependant, nous ne pouvons pas confirmer que c'est ce qui se passe dans le cas de notre étude car, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'exposition des larves de poisson-zèbres aux MPs de PS de 4-8jpf a entraîné l'augmentation de l'activité spécifique de la GST. Cela indique donc qu'un stress oxydatif est bien causé par la production excessive de ROS activant ainsi le système de défense géré par la GST.

Dans l'étude de Wang et al. (2019), une diminution de l'activité de la catalase a également pu être mise en évidence en exposant des larves de poisson-zèbre à différentes concentrations de MPs (0, 100 et 1000mg/L) pendant sept jours. Une hypothèse permettant d'expliquer cette diminution de l'activité de la catalase (Y. Wang et al. 2019) ainsi que l'absence de changement au niveau de l'activité de cette enzyme, que nous avons observé lors de la réalisation de ce travail, serait que les MPs génèrent une quantité importante de ROS. Cette production excessive induit un stress oxydatif tel qu'il diminue voire inhibe l'activité de la catalase, l'empêchant ainsi de dégrader le peroxyde d'hydrogène produit. Cette hypothèse a aussi été émise au cours de la recherche de Xu et al. (2021).

D'autres études portant sur l'exposition des MPs ont montré que l'activité de la catalase augmentait avec les concentrations d'exposition (Lu et al. 2016; Qiao, Sheng, et al. 2019). Cela confirme aussi que les poissons doivent se défendre contre le stress oxydatif causé par les ROS (Jacky Bhagat et al. 2020; Lu et al. 2016; Qiao, Sheng, et al. 2019). Les études de Lu et al. (2016) et Qiao, Sheng, et al. (2019) ont exposé respectivement des poissons-zèbres adultes pendant 7 et 21 jours.

Enfin, concernant les larves ayant été soumises à un challenge bactérien à 8jpf, plus aucune différence d'activité pour ces deux enzymes de détoxification n'a pu être observée selon les différentes concentrations et conditions d'exposition. Afin d'expliquer ces résultats, peut-être que cette association de stress (MPs et bactérie) aurait causé une production de ROS disproportionnée ce qui inhibe la voie de production d'énergie menant par la suite à une inhibition des différentes voies de détoxification empêchant ainsi les larves de se défendre face à cette combinaison de stress (J. Bhagat, Ingole, et Singh 2016; Santos et al. 2021; Xu et al. 2021).

4.4.1.2 Les gènes liés à la détoxification et à l'apoptose

En plus des enzymes impliquées dans les systèmes de détoxification, les expressions relatives de quatre gènes ont été analysées à cause de leur lien avec les systèmes de détoxification (*cat*, *sod* et *cyp1a*) et apoptotique (*bcl2*).

Premièrement, l'expression des gènes codant pour les enzymes, catalase et superoxyde dismutase (SOD), ne semble pas être impactée de façon significative par les concentrations et/ou les conditions d'exposition aux MPs seuls et associés à un challenge bactérien, seulement pour la *sod*. La SOD est une protéine liée à des ions métalliques permettant de dégrader les anions superoxydes (O_2^-) (Haleng et al. 2007). Le fait que leur expression ne montre aucun changement pourrait indiquer que, lors de l'exposition aux MPs seuls et associée à un challenge bactérien pour le gène *sod* et seulement lors de l'exposition aux MPs seuls pour *cat*, n'entraînent pas la production des ROS contre lesquels agissent la catalase et la SOD. Tandis que les larves soumises à 1000 μ g/L de MPs de 0-4jpf présentent une augmentation significative de l'expression relative de *cat* par rapport à celles des larves exposées de 4-8jpf à une concentration de 1000 μ g/L et de 0-8jpf à 100 μ g/L de MPs associés à une bactérie pathogène. Cette augmentation voudrait dire qu'entre 0 et 4jpf, des MPs ont pénétré les larves ce qui peut sans doute être expliqué par une ouverture précoce de la bouche ou alors que des MPs se seraient accumulés sur la peau des poissons, comme cela a déjà été émis plus tôt.

Dans une étude menée par Song, Choi, et Park (2020) sur des coquilles Saint-Jacques (*Argopecten irradians*), ils ont mis en avant une surexpression des deux gènes avec l'augmentation des concentrations d'exposition aux MPs. Cela leur a permis de conclure que les MPs avaient un impact sur la génération de ROS car ils augmentaient la production de ces composés oxygène-actifs activant ainsi les défenses antioxydantes pour contrer ces effets néfastes (Song, Choi, et Park 2020). Ceci permettrait d'expliquer notre augmentation d'expression pour la catalase lors d'un challenge bactérien en plus de l'exposition aux MPs.

Dans une seconde étude menée sur des poissons-zèbres, c'est une diminution de l'expression de *cat* et *sod* ainsi que de l'activité des enzymes, pour lesquelles les gènes codent, qui a été observée (Umamaheswari et al. 2021). Cela serait dû au fait que l'expression et l'activité de la catalase et SOD aient été inhibées par le stress oxydatif qui est devenu trop intense que pour être géré (Xu et al. 2021).

Cependant, dans le cas de notre étude, le profil d'expression de *cat* ne corrèle pas à l'activité de la catalase que nous avons observée (cf. 4.4.1.1. Les activités de la GST et de la catalase). Ceci peut être justifié par le fait que l'expression d'un gène n'est pas forcément représentative de l'activité de l'enzyme une fois qu'elle sera fonctionnelle. D'une part, il se

peut qu'elle soit le résultat de la transcription de différentes sous-catégories de gènes. D'autre part, entre la transcription et la formation de la protéine, il y a un certain laps de temps au cours duquel l'ARNm pourra subir des modifications mais ces dernières ne seront peut-être pas représentées au niveau de la protéine (Xu et al. 2021).

Deuxièmement, le gène *cyp1a* code pour un type de protéine CYP soit pour un cytochrome p450-1 qu'il est possible de retrouver majoritairement dans le foie (Chen et al. 2021). En général, le rôle des CYP est de digérer des composés pouvant être considérés comme toxiques pour les mammifères s'ils sont en trop grande quantité, comme c'est le cas pour certains xénobiotiques (Scornaienchi et al. 2010). Deux études ont analysé les effets des MPs sur des larves de carpes (*Cyprinus carpio var.*) (Xia et al. 2020) et sur le poisson-zèbre (Chen et al. 2021). Toutes deux ont observé une augmentation de l'expression de *cyp1a* et l'ont interprété comme étant une protection sachant que ce gène est lié à l'élimination des xénobiotiques (C.-Y. Chen et al. 2021; Xia et al. 2020). L'équipe de Xia et al. (2020) précise que lors d'une exposition prolongée (durant 60 jours d'exposition), l'expression de ce gène diminue ramenant une nouvelle fois à notre hypothèse selon laquelle un stress oxydatif trop important entrainerait l'inhibition de la mise en place des voies de détoxification (Xia et al. 2020; Xu et al. 2021). Dans notre étude, l'expression de *cyp1a* n'a pas montré de changement significatif entre les différentes concentrations et conditions d'expositions de MPs avec ou sans la présence d'*A. salmonicida*. Cependant, cela ne signifie pas qu'aucun stress oxydatif n'est subit par les cellules des larves de poisson-zèbres. En effet, peut être que ce stress est tellement important, qu'il inhibe les voies de défense pour le contrer.

Enfin, le dernier gène analysé est *bcl2*. Lors d'une exposition aux MPs, son expression a montré une augmentation significative lorsque les larves étaient exposées de 4-8jpf et de 0-8jpf par rapport à une exposition de 0-4jpf. D'abord, la protéine BCL2, ainsi que la famille des BCL2 de manière générale, est importante car elle permet de réguler les voies de l'apoptose et il se pourrait également que certaines des protéines de cette famille aient un rôle à jouer dans le développement. Cependant, les protéines de la famille BCL2 peuvent être responsables du développement de nombreuses maladies dont le cancer (Kratz et al. 2006). D'après nos recherches, il semblerait que l'induction de l'apoptose par *bcl2* dépende du type de composé d'exposition.

En effet, dans une première étude (Coffin, Rubel, et Raible 2013) exposant les poissons-zèbres à la néomycine et à la gentamicine, les auteurs ont mis en évidence qu'une surexpression

de *bcl2* induisait une inhibition des voies apoptotiques dans le cas d'une exposition à la gentamicine contrairement à une exposition à la néomycine. Ce sont des antibiotiques chimiquement proches.

Tandis que dans une seconde étude (Dimitriadi et al. 2021) soumettant des poissons-zèbre à une exposition de MPs, les chercheurs ont mis en évidence que la surexpression de *bcl2* conduisait à l'activation des voies induisant l'apoptose. Ces résultats correspondent avec le fait que les MPs induisent un stress oxydatif au niveau des cellules provoquant des dommages plus ou moins importants au niveau de diverses fonctions biologiques (Dimitriadi et al. 2021; Horton et al. 2018; Jovanović 2017). Dans certains cas, des dommages sont peut-être devenus trop importants initiant la production de marqueurs indiquant aux composés médiateurs de l'apoptose où ils doivent agir (Dimitriadi et al. 2021; Pitt et al. 2018).

Enfin, lorsqu'une bactérie pathogène est ajoutée après l'exposition aux MPs, plus aucun changement au niveau de son expression n'a pu être observé. Ceci pourrait être lié au fait que l'initiation de la mort programmée cellulaire est dépendante du type de composés exposés (Kratz et al. 2006). En d'autres termes, l'exposition aux MPs cause une surexpression du gène à cause des dommages sévères provoqué par le stress oxydatif. Mais lorsque l'exposition aux MPs est suivie d'un challenge bactérien, l'expression du gène augmente, puis diminue lors de l'ajout de la bactérie pathogène (*A.salmonicida*). Cette diminution observée pourrait être responsable soit d'un renforcement de la réponse du gène face aux MPs, permettant ainsi de combattre le stress oxydatif, soit d'une suppression de cette réponse.

Le fold change normalisé pour l'expression relative du gène *bcl2* après le challenge bactérien par rapport à l'exposition aux MPs seuls indique que ce gène est sous-exprimé chez les larves exposées de 4-8jpf à 1000µg/L de MPs par rapport à celles exposées de 0-8jpf qui sous-expriment également ce gène par rapport aux larves exposées de 0-4jpf à 1000µg/L de MPs. La surexpression observée pour ce gène de 0-4jpf pour les larves exposées à 1000µg/L de MPs est significative par rapport au niveau d'expression des contrôles. Cette augmentation de l'expression pourrait être due au fait que les billes de PS s'accumulent au niveau de la peau des larves causant des dommages considérables au niveau des cellules activant ainsi la voie de l'apoptose. Alors que la diminution de l'expression observée pour les larves exposées de 4-8jpf à 1000µg/L indique que le challenge bactérien soumis aux larves exposées de 4-8jpf à 1000µg/L causerait une diminution du phénomène d'apoptose. Cela signifie que la réponse d'activation de la réponse d'apoptose causée par les dommages cellulaires ou tissulaires liés à l'ingestion des MPs est inhibée par l'ajout d'un challenge bactérien à 8jpf.

4.4.2 Le métabolisme

4.4.2.1 L'activité de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique permettant la conversion du pyruvate en lactate dans la voie de production d'énergie lorsque l'organisme se trouve en situation anaérobie (Santos et al. 2020; Umamaheswari et al. 2021). Cette voie biologique intervient donc dans la production d'énergie lorsque l'oxygène n'est plus disponible. En effet, les MPs bloqueraient les voies respiratoires des poissons réduisant les échanges gazeux comme mentionné par Jin et al. (2018) et Yin et al. (2019) ce qui entraîne une hypoxie branchiale et tissulaire chez les poissons.

Dans ce travail, l'activité de la LDH a été mesurée dans le but de déterminer la présence ou non de dommages, lésions cellulaires, tissulaires causés par les MPs seuls ou associés à une bactérie pathogène. Effectivement, comme l'ont démontré les études de Anagnosti et al. (2021), Foley et al. (2018) et Yin et al. (2019), les MPs peuvent provoquer des lésions aux niveaux des organes.

L'activité de la LDH chez les larves exposées à 100µg/L de 4-8jpf et de 0-8jpf et chez celles exposées de 4-8jpf à 1000µg/L avant le challenge bactérien est significativement supérieure par rapport à l'activité des groupes exposés de 0-4jpf à 100µg/L de MPs et de 0-8jpf à 1000µg/L de MPs. Cette diminution indique que moins de pyruvate est convertie en lactate et donc que moins d'énergie est produite par la voie anaérobie (Santos et al. 2020; 2021). Cela indique aussi que certains tissus présentent des lésions permettant ainsi à l'enzyme d'aller dans le sang et de ne plus assurer la conversion du pyruvate en lactate (Santos et al. 2020; Umamaheswari et al. 2021; Y.-T. Zhang et al. 2020). Si moins d'énergie est produite alors cela indique que l'organisme du poisson doit faire un choix quant aux fonctions auxquelles il allouera le peu d'énergie qu'il produit et celle qu'il négligera (Wright, Thompson, et Galloway 2013; Yin et al. 2018).

À 8jpf, lorsque l'exposition aux MPs a été combinée à un challenge bactérien, aucun effet significatif des variables « concentrations » et « conditions » n'a pu être mis en évidence. Ce qui voudrait dire que la LDH ne présente pas de changement au niveau de son activité dans les différents traitements. L'hypothèse face à ces résultats serait que la combinaison des MPs avec une bactérie pathogène provoquerait une inhibition de la production de l'énergie car une

grande quantité de ROS a été engendrée (J. Bhagat, Ingole, et Singh 2016; Santos et al. 2021; Xu et al. 2021). Cette hypothèse rejoint ce que nous avons émis pour les enzymes antioxydantes (GST et catalase). N'ayant donc plus assez d'énergie, il se pourrait que les ROS s'accumulent inhibant ainsi les différents mécanismes de défenses ce qui est grandement défavorable car les poissons ne sont alors pas en mesure de combattre ce double stress.

4.4.2.2 *Les gènes liés au métabolisme*

Des études ont montré que les MPs pouvaient impacter le métabolisme des lipides, des protéines, du glucose (Y. Wang et al. 2019; Yin et al. 2019; Zhao et al. 2021). D'ailleurs, nous avons mesuré l'expression des gènes codant pour quatre enzymes liées à différentes voies métaboliques : l'aldolase, l'hexokinase 1 (HK1) et la citrate synthase (CS) impliquées dans le métabolisme du glucose et la fatty acid synthase (Fasn) impliquée dans celui des lipides (Li et al. 2021; Lin et al. 2019; Rawls et al. 2007; Zhao et al. 2021).

Pour ces quatre gènes (*aldo*, *cs*, *hkl*, *fasn*), l'exposition des larves aux MPs suivie ou non d'un challenge bactérien selon différentes concentrations et conditions ne semble pas impacter leur expression relative. Cela ne nous permet donc pas d'affirmer, dans un premier temps, le fait que les MPs impactent les métabolismes des lipides et du glucose. Malgré cela, le fold change normalisé calculé pour *hkl* indique que *A. salmonicida achromogenes* stimulerait l'expression relative de ce gène. En effet, chez les larves exposées à 1000µg/L de 0-4jpf, une augmentation significative de l'expression du gène a été mise en évidence par rapport aux autres conditions d'exposition.

D'abord, des études comme celle de LeMoine et al. (2018) ont montré que l'expression de gènes tels que *hkl* et *aldo* était sous régulées lors d'une exposition aux MPs indiquant une diminution de la glycolyse et, ainsi, une accumulation de glucose dans le sang.

Dans le cas de l'aldolase, cela contredit ce qui a été démontré par l'étude de S. Li et al. (2021), sachant toutefois que celle-ci a été réalisée sur un végétal. Cette dernière a, en effet, mis en évidence que l'activité de l'aldolase avait augmentée suite à l'exposition des MPs ce qui pourrait vouloir dire que l'expression de son gène était sur-régulée. Or, comme nous l'avons déjà mentionné, il faut faire attention au fait que l'expression d'un gène ne représente pas toujours l'activité de l'enzyme (Xu et al. 2021). Cette surexpression pourrait être due au fait que l'aldolase ait un rôle à jouer dans la synthèse du saccharose dans lequel les plantes stockent

l'énergie produite par la photosynthèse (Li et al. 2021) ou alors, au fait que l'aldolase joue un rôle dans la dégradation de certains polymères de plastiques (Bhatt et al. 2021).

A contrario, S. Li et al. (2021) rejoignent LeMoine et al. (2018) pour ce qui est de *hk1* même si ces deux études parlent respectivement en terme d'activité et d'expression. Dans les deux cas, une diminution a été observée indiquant un dérèglement au niveau de la première étape de la glycolyse. Par conséquent, cela mène à une augmentation des teneurs en glucose chez les larves de poisson-zèbre pouvant causer le diabète. Ces résultats ont également été observés dans deux autres études : Wan et al. (2019) et Zhao et al. (2021). Deux explications concernant la surexpression mise en évidence par le fold change de l'expression de *hk1* peuvent être soumises. Premièrement, les MPs pourraient s'accumuler à la surface de l'œuf bloquant ainsi les pores de celui-ci. Deuxièmement, il se pourrait que les MPs s'accumulent sur la peau des larves induisant des lésions cellulaires. Dans les deux cas, cela renseignerait à la larve qu'un composé étranger se trouve dans le milieu pour lequel elle devra potentiellement se défendre. Son organisme augmente alors l'activité de la glycolyse, en surexprimant *hk1*, afin de produire de l'énergie qui pourrait être utilisé par cette défense.

Ensuite, la CS est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs mais aussi dans la β -oxydation qui a lieu dans les mitochondries. Cette enzyme est donc impliquée dans le métabolisme du glucose ainsi que dans celui des lipides. C'est aussi un marqueur du bon fonctionnement des mitochondries dans lesquelles une grande partie des ROS est produite (Haleng et al. 2007; Lin et al. 2019). Différentes études analysant l'expression et/ou l'activité de la CS ont plutôt lié l'augmentation de l'expression du gène avec les défenses contre le stress oxydatif (Craig, Wood, et McClelland 2007; Lin et al. 2019).

Enfin, la *Fasn* est une enzyme clé de la lipogenèse se trouvant dans le cytosol de diverses cellules telles que les hépatocytes. Lors d'une exposition aux MPs, il s'avère que l'expression du gène *fasn* présente divers profils d'expression (Wan et al. 2019; Zhao et al. 2021). Dans l'étude de Wan et al. (2019), une surexpression du gène a été observée mettant en évidence l'impact néfaste des MPs sur le métabolisme des lipides car une surexpression de *fasn* induit une augmentation de la synthèse des acides gras. Cependant, une production excessive de ces acides gras peut être responsable du développement de maladie cardiovasculaire, comme l'a mis en évidence l'étude de Zhao et al. (2021). De plus, cette dernière a démontré que les groupes de larves de poisson-zèbres exposés aux MPs présentaient une expression plus faible pour ce gène ce qui signifie que les larves étaient capables de réguler la production d'acide gras empêchant le développement de maladie en lien avec un dérèglement du métabolisme des lipides (Zhao et al. 2021).

4.4.3 Le système nerveux

Le gène *gfap* (glial fibrillary acidic protein) est exclusivement exprimé dans le système nerveux central (SNC) et plus précisément, au niveau des astrocytes et des cellules gliales (Chen et al. 2017; Fan et al. 2010). Le gène semble se trouver au niveau du cytosol des astrocytes car il permet de contrôler les activités des éléments du cytosquelette comme le potentiel de dimérisation (Chen et al. 2017; Nielsen et Jørgensen 2003). Il est donc considéré comme étant un marqueur de la neurotoxicité (Chen et al. 2017; Fan et al. 2010) étant donné son rôle important dans le développement du SNC (Johnson et al. 2016). Au cours du développement du poisson-zèbre, l'expression du gène est censée augmenter pendant les premiers jours pour ensuite diminuer lorsque le SNC est complètement formé et fonctionnel (Fan et al. 2010).

Dans le cas de notre étude, aucun effet des différentes concentrations et/ou conditions d'exposition aux MPs combinés à un challenge ou non n'a pu être mis en évidence. N'ayant pas pu atteindre la barrière hémato-encéphalique mise en place par le gène *gfap*, les MPs n'ont donc pas pu aller au niveau du système nerveux et perturber son développement (Johnson et al. 2016; R. Zhang et al. 2020). Une augmentation au niveau de l'expression de *gfap* serait synonyme de neurotoxicité selon les études de Chen et al. (2017) et Nielsen et Jørgensen (2003). À l'opposé, il y a l'étude de Rui Zhang et al. (2020) qui a mis en évidence une sous-expression du gène induisant des dommages au développement neural. Les études de Chen et al. (2017) et Rui Zhang et al. (2020) ont toutes les deux exposé des embryons de poisson-zèbre à des nanoplastiques mais pendant des durées différentes ce qui pourrait peut-être expliquer la différence de neurotoxicité observée à partir des différentes expressions de *gfap*. En effet, elles exposaient les embryons de 3hpf jusqu'à 48 ou 72hpf dans le cas de la première étude (Chen et al. 2017) alors que la seconde exposait jusqu'à 96hpf (R. Zhang et al. 2020).

4.5 L'analyse en composantes principales de l'expression relative des gènes

Grâce à cette analyse, il a été possible de mettre en évidence que les gènes des larves exposés à 100µg/L de MPs avaient des expressions qui ne semblaient pas être impactées par les conditions d'expositions aux MPs. Alors que pour les larves ayant été exposées à 1000µg/L de MPs, les expressions relatives des gènes analysés étaient impactées principalement par les conditions d'exposition.

Effectivement, les gènes ayant montré des changements d'expressions lors de l'exposition aux MPs non associée à un challenge bactérien sont impactés par les conditions d'exposition ou par l'interaction de ces conditions avec la concentration 10x supérieure à celle de l'environnement. Lors d'un challenge bactérien, c'est l'inverse qui a été observé. En effet, c'est à 100µg/L de MPs que les larves présentent des profils d'expression différents selon les conditions d'exposition. Cette analyse a donc permis de mettre en avant que l'ajout d'une bactérie pathogène change complètement la réponse de l'organisme face aux MPs. C'est pour cela qu'il est essentiel de tenir compte du type de stress (chimique, biologique, etc.) des concentrations, des temps d'exposition mais aussi de tout ce qui pourrait influencer ce stress et la réponse engendrée par l'organisme exposé.

5 Conclusion et perspectives

A l'heure actuelle, les plastiques sont au cœur de nos vies de par leur omniprésence et constituent un problème qui ne cesse de grandir. Pour une grande partie des plastiques, leur utilisation est brève ce qui nous amène à nous en débarrasser rapidement.

Ils sont alors soit recyclés, incinérés ou mis en décharge, où là ils s'accumulent, les laissant ainsi accessibles aux UVs les dégradant en MPs et aux vents permettant leur transport jusque dans l'environnement.

À ce moment-là, ils sont filtrés ou ingérés par les organismes puis accumulés au niveau de leur système digestif. Lors de l'ingestion des MPs, ces microparticules sont capables de provoquer des lésions au niveau des branchies et/ou du tractus intestinal, une dysbiose intestinale, des changements d'expression au niveau des gènes liés à l'immunité, aux défenses anti-oxydantes et au métabolisme par exemples.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons voulu mettre en évidence les impacts des MPs, associés ou non à une bactérie pathogène, (*A. salmonicida*) sur le système immunitaire des larves de poisson-zèbre (*Danio rerio*). Le poisson-zèbre est un organisme modèle largement utilisé dans le cadre des études sur l'immunité, le microbiote et les infections bactériennes.

De plus, nous avons décidé de travailler sur les larves parce que les stades embryonnaires et larvaires sont des stades très sensibles mais aussi parce que cela nous permet de voir l'évolution du développement normal des larves ainsi que celui de leur système immunitaire. De façon plus spécifique, nous avons évalué les effets des MPs sur le système immunitaire inné, étant la seule composante de l'immunité présente lorsque l'exposition a eu lieu.

Le premier effet néfaste des MPs mis en évidence via cette étude est qu'ils impactent la survie des larves une fois que le système digestif est complètement fonctionnel.

Ensuite, l'immunité innée a bien été impactée par les MPs. En effet, des gènes impliqués dans l'immunité innée tel que *nfkB* et *il1b* présentent une augmentation de leur expression indiquant ainsi que les MPs sont ingérés provoquant ainsi une inflammation intestinale.

Cependant, lorsqu'un challenge bactérien est ajouté à 8jpf, les expressions relatives de ces deux gènes ne changent pas indiquant que la combinaison des MPs à une bactérie pathogène, *A. salmonicida achromogenes*, mènent à la suppression de la réponse immunitaire induite par les MPs. La présence d'un pathogène en plus des MPs a mené à la surexpression de

mpo, marqueur de la présence des neutrophiles. Ces derniers sont présents afin de dégrader le pathogène. Cela montre bien que l'immunité des larves de poisson-zèbre est stimulée par la présence de la bactérie et impactée par la coexposition MPs-bactérie. De plus, en se basant sur les niveaux d'expressions relatives des gènes après l'exposition aux MPs, un indice d'expression pour le challenge bactérien indique que les gènes *nfkB* et *il1b* sont surexprimés lorsque les larves sont exposées avant l'ouverture de la bouche à 5jpf. Au vu du moment d'exposition, les MPs ne sont pas ingérés. Mais il semblerait qu'ils se soient accumulés sur la peau des larves causant des lésions cutanées et permettant ainsi à la bactérie, ajouté à 8jpf, d'entrer dans l'organisme des larves.

En outre, le développement du système immunitaire et du système digestif est assisté par le microbiote intestinal comme l'indiquent des études, notamment celle de Murdoch et Rawls (2019). Un des gènes traduisant le bénéfice du microbiote pour les larves de poisson-zèbre (*fiaf*) a montré une sous-expression lors de l'association de l'exposition aux MPs à un challenge bactérien. Cela montre que le microbiote aide les larves, en permettant de produire de l'énergie pour se défendre contre le double stress. Les MPs ingérés aurait également induit un stress oxydatif important (augmentation de l'activité de la GST) ayant activé le processus d'apoptose (surexpression de *bcl2*) et causé une diminution de la production d'énergie (diminution de l'activité de la LDH).

Or, en présence de MPs et de bactéries, il semblerait que la production excessive de ROS ait conduit à l'inhibition des différentes voies de détoxification même si le gène *cat*, codant pour la catalase, est surexprimé avant que les MPs et les bactéries puissent être ingérés.

Enfin, les MPs associés ou non à un challenge bactérien n'ont pas impacté le métabolisme et causé de la neurotoxicité. Bien que l'indice pour *hk1* (enzyme de la glycolyse) permettant de déterminer les impacts de *A. salmonicida achromogenes* après l'exposition aux MPs montre une surexpression du gène avant l'ouverture de la bouche. Cela ramène à l'hypothèse selon laquelle les MPs causeraient des lésions au niveau de la peau faisant ainsi entrer la bactérie indiquant donc à la larves le besoin d'énergie pour se défendre.

Cette étude, ayant pour but de comparer les effets des MPs avant et après un challenge bactérien à des moments phares du développement du poisson-zèbre, a donc montré que les MPs seuls induisaient certains changements au niveau de l'expression de certains gènes et de l'activité de certaines enzymes.

Tandis que les effets après un challenge bactérien indiquent que la combinaison des deux stress agit au niveau d'autres gènes et enzymes tantôt renforçant tantôt inhibant la réponse

immunitaire et de détoxification. De plus, n'ayant que très peu d'études traitant de l'association MPs et bactérie pathogène, il faudrait approfondir l'étude en renouvelant l'expérience incluant d'autres marqueurs tels que le contenu en MDA pour la peroxydation des lipides ainsi qu'en augmentant le temps du challenge bactérien afin de voir si certains gènes ne s'exprimeraient pas après une plus longue période d'incubation. Enfin, nous savons qu'il existe différents types de MPS (fragments, billes, etc.) mais il y a également très peu d'études qui portent sur une comparaison des effets causés par divers types de MPs. Ils seraient donc également intéressant de réaliser l'expérience en incluant d'autres types de MPs afin de pouvoir faire une comparaison. Dans cette optique, des protocoles pour la production de fragments de MPs et leur décontamination ont été mis en place (Annexe 14 et 15).

6 Bibliographie

- Abbasi, Sajjad, Naghmeh Soltani, Behnam Keshavarzi, Farid Moore, Andrew Turner, et Mina Hassanaghaei. 2018. « Microplastics in Different Tissues of Fish and Prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf ». *Chemosphere* 205 (août): 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.076>.
- Ahrendt, C., D. J. Perez-Venegas, M. Urbina, C. Gonzalez, P. Echeveste, M. Aldana, J. Pulgar, et C. Galbán-Malagón. 2020. « Microplastic Ingestion Cause Intestinal Lesions in the Intertidal Fish *Girella Laevis* ». *Marine Pollution Bulletin* 151 (février): 110795. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110795>.
- Anagnosti, Lamprini, Athanasia Varvaresou, Panagoula Pavlou, Evangelia Protopapa, et Vilemine Carayanni. 2021. « Worldwide Actions against Plastic Pollution from Microbeads and Microplastics in Cosmetics Focusing on European Policies. Has the Issue Been Handled Effectively? » *Marine Pollution Bulletin* 162 (janvier): 111883. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111883>.
- Andrady, Anthony L. 2011. « Microplastics in the Marine Environment ». *Marine Pollution Bulletin* 62 (8): 1596-1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.
- Avio, Carlo Giacomo, Stefania Gorbi, et Francesco Regoli. 2015. « Experimental Development of a New Protocol for Extraction and Characterization of Microplastics in Fish Tissues: First Observations in Commercial Species from Adriatic Sea ». *Marine Environmental Research, Particles in the Oceans: Implication for a safe marine environment*, 111 (octobre): 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014>.
- Bates, Jennifer M., Erika Mittge, Julie Kuhlman, Katrina N. Baden, Sarah E. Cheesman, et Karen Guillemin. 2006. « Distinct Signals from the Microbiota Promote Different Aspects of Zebrafish Gut Differentiation ». *Developmental Biology* 297 (2): 374-86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.006>.
- Bhagat, J., B. S. Ingole, et N. Singh. 2016. « Glutathione S-Transferase, Catalase, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Lipid Peroxidation as Biomarkers of Oxidative Stress in Snails: A Review ». *Invertebrate Survival Journal* 13 (1): 336-49. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/ij.v13i1.336-349>.
- Bhagat, Jacky, Liqing Zang, Norihiro Nishimura, et Yasuhito Shimada. 2020. « Zebrafish: An Emerging Model to Study Microplastic and Nanoplastic Toxicity ». *Science of The Total Environment* 728 (août): 138707. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138707>.
- Bhatt, Pankaj, Vinay Mohan Pathak, Ahmad Reza Bagheri, et Muhammad Bilal. 2021. « Microplastic Contaminants in the Aqueous Environment, Fate, Toxicity Consequences, and Remediation Strategies ». *Environmental Research* 200 (septembre): 111762. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111762>.
- Boucher, Julien, et Damien Friot. 2020. « Microplastiques primaires dans les océans : évaluation mondiale des sources ». Gland, Suisse : UICN. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2017-002-Fr.pdf>.
- Briggs, Josephine P. 2002. « The zebrafish: a new model organism for integrative physiology ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282 (1): R3-9. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00589.2001>.
- Bucci, K., M. Tulio, et C. M. Rochman. 2020. « What Is Known and Unknown about the Effects of Plastic Pollution: A Meta-Analysis and Systematic Review ». *Ecological Applications* 30 (2): e02044. <https://doi.org/10.1002/eap.2044>.
- Bucknall, David. 2020. « Plastics as a materials system in a circular economy ». *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 378 (juillet): 20190268. <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0268>.
- Cantas, Leon, Jan Roger Torp Sørby, Peter Aleström, et Henning Sørum. 2012. « Culturable Gut Microbiota

Diversity in Zebrafish ». *Zebrafish* 9 (1): 26-37. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0712>.

Capolupo, Marco, Lisbet Sørensen, Kongalage Don Ranil Jayasena, Andy M. Booth, et Elena Fabbri. 2020. « Chemical Composition and Ecotoxicity of Plastic and Car Tire Rubber Leachates to Aquatic Organisms ». *Water Research* 169 (février): 115270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115270>.

Chen, Chi-Yun, Tien-Hsuan Lu, Ying-Fei Yang, et Chung-Min Liao. 2021. « Toxicokinetic/Toxicodynamic-Based Risk Assessment of Freshwater Fish Health Posed by Microplastics at Environmentally Relevant Concentrations ». *Science of The Total Environment* 756 (février): 144013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144013>.

Chen, Qiqing, Michael Gundlach, Shouye Yang, Jing Jiang, Mirna Velki, Daqiang Yin, et Henner Hollert. 2017. « Quantitative Investigation of the Mechanisms of Microplastics and Nanoplastics toward Zebrafish Larvae Locomotor Activity ». *Science of The Total Environment* 584-585 (avril): 1022-31. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.156>.

Chen, Qiqing, Carina Lackmann, Weiye Wang, Thomas-Benjamin Seiler, Henner Hollert, et Huahong Shi. 2020. « Microplastics Lead to Hyperactive Swimming Behaviour in Adult Zebrafish ». *Aquatic Toxicology* 224 (juillet): 105521. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105521>.

Coffin, Allison B., Edwin W. Rubel, et David W. Raible. 2013. « Bax, Bcl2, and P53 Differentially Regulate Neomycin- and Gentamicin-Induced Hair Cell Death in the Zebrafish Lateral Line ». *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 14 (5): 645-59. <https://doi.org/10.1007/s10162-013-0404-1>.

Cornet, Valérie, Jessica Douxfils, Syaghalirwa N. M. Mandiki, et Patrick Kestemont. 2020. « Early-Life Infection with a Bacterial Pathogen Increases Expression Levels of Innate Immunity Related Genes during Adulthood in Zebrafish ». *Developmental & Comparative Immunology* 108 (juillet): 103672. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103672>.

Craig, Paul M., Chris M. Wood, et Grant B. McClelland. 2007. « Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (5): R1882-92. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00383.2007>.

DeCourten, Bethany M., Joshua P. Forbes, Hunter K. Roark, Nathan P. Burns, Kaley M. Major, J. Wilson White, Jie Li, Alvine C. Mehinto, Richard E. Connon, et Susanne M. Brander. 2020. « Multigenerational and Transgenerational Effects of Environmentally Relevant Concentrations of Endocrine Disruptors in an Estuarine Fish Model ». *Environmental Science & Technology* 54 (21): 13849-60. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02892>.

Dimitriadi, Anastasia, Chrisovalantis Papaefthimiou, Eleni Genizegkini, Ioannis Sampsonidis, Stavros Kalogiannis, Konstantinos Feidantsis, Dimitra C. Bobori, et al. 2021. « Adverse Effects Polystyrene Microplastics Exert on Zebrafish Heart – Molecular to Individual Level ». *Journal of Hazardous Materials* 416 (août): 125969. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125969>.

Eriksen, Marcus, Laurent C. M. Lebreton, Henry S. Carson, Martin Thiel, Charles J. Moore, Jose C. Borerro, Francois Galgani, Peter G. Ryan, et Julia Reisser. 2014. « Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea ». *PLOS ONE* 9 (12): e111913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>.

Fan, Chun-Yang, John Cowden, Steven O. Simmons, Stephanie Padilla, et Ram Ramabhadran. 2010. « Gene Expression Changes in Developing Zebrafish as Potential Markers for Rapid Developmental Neurotoxicity Screening ». *Neurotoxicology and Teratology*, Emerging high throughput and complementary model screens for neurotoxicology, 32 (1): 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.065>.

Feng, Zhihua, Tao Zhang, You Li, Xinran He, Rui Wang, Juntian Xu, et Guang Gao. 2019. « The Accumulation of Microplastics in Fish from an Important Fish Farm and Mariculture Area, Haizhou Bay, China ». *Science of The Total Environment* 696 (décembre): 133948.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133948>.

Finlayson, Colin. 2018. « Millennium Ecosystem Assessment ». *The Wetland Book I: Structure and Function, Management and Methods*, 355-59. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9659-3_81.

Finley, John W. 2020. « Evolution and Future Needs of Food Chemistry in a Changing World ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68 (46): 12956-71. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07774>.

Flot, Jean-François. 2018. « Chapitre 4 : Les sarcoptérygiens ». In *Evolution et diversité animale III*.

Foley, Carolyn J., Zachary S. Feiner, Timothy D. Malinich, et Tomas O. Höök. 2018a. « A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates ». *Science of The Total Environment* 631-632 (août): 550-59. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.046>.

Franzellitti, Silvia, Laura Canesi, Manon Auguste, Rajapaksha H. G. R. Wathsala, et Elena Fabbri. 2019. « Microplastic exposure and effects in aquatic organisms: A physiological perspective ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 68 (mai): 37-51. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.009>.

Geyer, Roland, Jenna R. Jambeck, et Kara Lavender Law. 2017. « Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made ». *Science Advances* 3 (7): e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.

Gillet, Nicolas. 2021. « Immunité innée ». In *Expérimentation animale : Immunologie*.

Glisic, Branka, Ivan Mihaljevic, Marta Popovic, Roko Zaja, Jovica Loncar, Karl Fent, Radmila Kovacevic, et Tvrtko Smital. 2015. « Characterization of Glutathione-S-Transferases in Zebrafish (Danio Rerio) ». *Aquatic Toxicology* 158 (janvier): 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.aquatx.2014.10.013>.

Gu, Linqi, Li Tian, Gan Gao, Shaohong Peng, Jieyu Zhang, Di Wu, Jing Huang, et al. 2020. « Inhibitory Effects of Polystyrene Microplastics on Caudal Fin Regeneration in Zebrafish Larvae ». *Environmental Pollution* 266 (novembre): 114664. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114664>.

Guo, Xiaoze, Chao Ran, Zhen Zhang, Suxu He, Min Jin, et Zhigang Zhou. 2017. « The Growth-Promoting Effect of Dietary Nucleotides in Fish Is Associated with an Intestinal Microbiota-Mediated Reduction in Energy Expenditure ». *The Journal of Nutrition* 147 (5): 781-88. <https://doi.org/10.3945/jn.116.245506>.

Guzzetti, Eleonora, Antoni Sureda, Silvia Tejada, et Caterina Faggio. 2018. « Microplastic in Marine Organism: Environmental and Toxicological Effects ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 64 (décembre): 164-71. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.10.009>.

Hale, Robert C., Meredith E. Seeley, Mark J. La Guardia, Lei Mai, et Eddy Y. Zeng. 2020. « A Global Perspective on Microplastics ». *Journal of Geophysical Research: Oceans* 125 (1): e2018JC014719. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>.

Haleng, J., J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, et J.P. Chapelle. 2007. « Le stress oxydant » 62(10): 628-38.

Hamza, Neila, Teresa Ostaszewska, et Patrick Kestemont. 2015. « Development and Functionality of the Digestive System in Percid Fishes Early Life Stages ». In *Biology and Culture of Percid Fishes: Principles and Practices*, édité par Patrick Kestemont, Konrad Dabrowski, et Robert C. Summerfelt, 239-64. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7227-3_8.

Hasegawa, Tomoya, Christopher J Hall, Philip S Crosier, Gembu Abe, Koichi Kawakami, Akira Kudo, et Atsushi Kawakami. 2017. « Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold ». Édité par Didier YR Stainier. *eLife* 6 (février): e22716. <https://doi.org/10.7554/eLife.22716>.

Hill, Adrian J., Hiroki Teraoka, Warren Heideman, et Richard E. Peterson. 2005. « Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity ». *Toxicological Sciences* 86 (1): 6-19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>.

- Hirayama, Jun, Sehyung Cho, et Paolo Sassone-Corsi. 2007. « Circadian Control by the Reduction/Oxidation Pathway: Catalase Represses Light-Dependent Clock Gene Expression in the Zebrafish ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (40): 15747-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705614104>.
- Horton, Alice A., Monika D. Jürgens, Elma Lahive, Peter M. van Bodegom, et Martina G. Vijver. 2018. « The influence of exposure and physiology on microplastic ingestion by the freshwater fish *Rutilus rutilus* (roach) in the River Thames, UK ». *Environmental Pollution* 236 (mai): 188-94. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.044>.
- Huang, Jun-Nan, Bin Wen, Jian-Guo Zhu, Yan-Shen Zhang, Jian-Zhong Gao, et Zai-Zhong Chen. 2020. « Exposure to Microplastics Impairs Digestive Performance, Stimulates Immune Response and Induces Microbiota Dysbiosis in the Gut of Juvenile Guppy (*Poecilia Reticulata*) ». *Science of The Total Environment* 733 (septembre): 138929. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138929>.
- Jin, Yuanxiang, Jizhou Xia, Zihong Pan, Jiajing Yang, Wenchao Wang, et Zhengwei Fu. 2018. « Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish ». *Environmental Pollution* 235 (avril): 322-29. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.088>.
- Johnson, Kimberly, Jessica Barragan, Sarah Bashiruddin, Cody J. Smith, Chelsea Tyrrell, Michael J. Parsons, Rosemarie Doris, et al. 2016. « Gfap-Positive Radial Glial Cells Are an Essential Progenitor Population for Later-Born Neurons and Glia in the Zebrafish Spinal Cord ». *Glia* 64 (7): 1170-89. <https://doi.org/10.1002/glia.22990>.
- Jovanović, Boris. 2017. « Ingestion of Microplastics by Fish and Its Potential Consequences from a Physical Perspective ». *Integrated Environmental Assessment and Management* 13 (3): 510-15. <https://doi.org/10.1002/ieam.1913>.
- Kanther, Michelle, et John F Rawls. 2010. « Host–Microbe Interactions in the Developing Zebrafish ». *Current Opinion in Immunology*, Innate immunity • Antigen processing, 22 (1): 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.006>.
- Karami, Ali, David B. Groman, Scott P. Wilson, Patimah Ismail, et Vasantha K. Neela. 2017. « Biomarker Responses in Zebrafish (*Danio Rerio*) Larvae Exposed to Pristine Low-Density Polyethylene Fragments ». *Environmental Pollution* 223 (avril): 466-75. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.047>.
- Kelman, Zvi. 1997. « PCNA: Structure, Functions and Interactions ». *Oncogene* 14 (6): 629-40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200886>.
- Kersten, Sander, Stéphane Mandard, Nguan Soon Tan, Pascal Escher, Daniel Metzger, Pierre Chambon, Frank J. Gonzalez, Béatrice Desvergne, et Walter Wahli. 2000. « Characterization of the Fasting-Induced Adipose Factor FIAF, a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Target Gene * ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 28488-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004029200>.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, et Thomas F. Schilling. 1995. « Stages of Embryonic Development of the Zebrafish ». *Developmental Dynamics* 203 (3): 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Ko, Eun-Yi, Su-Hyeon Cho, Seung-Hae Kwon, Chi-Yong Eom, Myeong Seon Jeong, WonWoo Lee, Seo-Young Kim, et al. 2017. « The Roles of NF-KB and ROS in Regulation of pro-Inflammatory Mediators of Inflammation Induction in LPS-Stimulated Zebrafish Embryos ». *Fish & Shellfish Immunology* 68 (septembre): 525-29. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.041>.
- Kratz, E., P. M. Eimon, K. Mukhyala, H. Stern, J. Zha, A. Strasser, R. Hart, et A. Ashkenazi. 2006. « Functional Characterization of the Bcl-2 Gene Family in the Zebrafish ». *Cell Death & Differentiation* 13 (10): 1631-40. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402016>.
- Lam, S. H., H. L Chua, Z Gong, T. J Lam, et Y. M Sin. 2004. « Development and Maturation of the Immune

- System in Zebrafish, *Danio Rerio*: A Gene Expression Profiling, in Situ Hybridization and Immunological Study ». *Developmental & Comparative Immunology* 28 (1): 9-28. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00103-4).
- Laskar, Nirban, et Upendra Kumar. 2019. « Plastics and Microplastics: A Threat to Environment ». *Environmental Technology & Innovation* 14 (mai): 100352. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>.
- Lassen, C, S.F. Hansen, K Magnusson, et N.B. Hartmann. 2015. « Occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark. », Copenhagen K: Danish Environmental Protection Agency., , 1-208.
- Lavers, Jennifer L., et Alexander L. Bond. 2017. « Exceptional and Rapid Accumulation of Anthropogenic Debris on One of the World's Most Remote and Pristine Islands ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (23): 6052-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619818114>.
- Lehtiniemi, Maiju, Samuel Hartikainen, Pinja Näkki, Jonna Engström-Öst, Arto Koistinen, et Outi Setälä. 2018. « Size Matters More than Shape: Ingestion of Primary and Secondary Microplastics by Small Predators ». *Food Webs* 17 (décembre): e00097. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097>.
- Lei, Lili, Siyu Wu, Shibo Lu, Mengting Liu, Yang Song, Zhenhuan Fu, Huahong Shi, Kathleen M. Raley-Susman, et Defu He. 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 (avril): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>.
- LeMoine, Christophe M. R., Bailey M. Kelleher, Raphaël Lagarde, Caleb Northam, Oluwadara O. Elebute, et Bryan J. Cassone. 2018. « Transcriptional Effects of Polyethylene Microplastics Ingestion in Developing Zebrafish (*Danio Rerio*) ». *Environmental Pollution* 243 (décembre): 591-600. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.084>.
- Li, Shuxin, Tianya Wang, Junhong Guo, Yuefan Dong, Zongshuai Wang, Lei Gong, et Xiangnan Li. 2021. « Polystyrene Microplastics Disturb the Redox Homeostasis, Carbohydrate Metabolism and Phytohormone Regulatory Network in Barley ». *Journal of Hazardous Materials* 415 (août): 125614. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125614>.
- Li, Zhenxia, Qingfei Li, Ruijing Li, Yafei Zhao, Jiahui Geng, et Guangyin Wang. 2020. « Physiological Responses of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) to Microplastic Pollution ». *Environmental Science and Pollution Research* 27 (24): 30306-14. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09349-0>.
- Limonta, Giacomo, Annalaura Mancina, Luigi Abelli, Maria Cristina Fossi, Ilaria Caliani, et Cristina Panti. 2021. « Effects of Microplastics on Head Kidney Gene Expression and Enzymatic Biomarkers in Adult Zebrafish ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 245 (juillet): 109037. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109037>.
- Limonta, Giacomo, Annalaura Mancina, Assja Benkhalqui, Cristiano Bertolucci, Luigi Abelli, Maria Cristina Fossi, et Cristina Panti. 2019. « Microplastics Induce Transcriptional Changes, Immune Response and Behavioral Alterations in Adult Zebrafish ». *Scientific Reports* 9 (1): 15775. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52292-5>.
- Lin, Yu-Sheng, Febriyansyah Saputra, Yo-Chia Chen, et Shao-Yang Hu. 2019. « Dietary Administration of *Bacillus Amyloliquefaciens* R8 Reduces Hepatic Oxidative Stress and Enhances Nutrient Metabolism and Immunity against *Aeromonas Hydrophila* and *Streptococcus Agalactiae* in Zebrafish (*Danio Rerio*) ». *Fish & Shellfish Immunology* 86 (mars): 410-19. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.047>.
- Lu, Yifeng, Yan Zhang, Yongfeng Deng, Wei Jiang, Yanping Zhao, Jinju Geng, Lili Ding, et Hongqiang Ren. 2016. « Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver ». *Environmental Science & Technology* 50 (7): 4054-60. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00183>.
- Mazurais, D., B. Ernande, P. Quazuguel, A. Severe, C. Huelvan, L. Madec, O. Mouchel, et al. 2015.

- « Evaluation of the Impact of Polyethylene Microbeads Ingestion in European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Larvae ». *Marine Environmental Research* 112 (décembre): 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.009>.
- McCluskey, Braedan M., et Ingo Braasch. 2020. « Chapter 2 - Zebrafish Phylogeny and Taxonomy ». In *The Zebrafish in Biomedical Research*, édité par Samuel C. Cartner, Judith S. Eisen, Susan C. Farmer, Karen J. Guillemin, Michael L. Kent, et George E. Sanders, 15-24. American College of Laboratory Animal Medicine. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812431-4.00002-6>.
- Medzhitov, Ruslan, et Charles Janeway. 2000. « Innate Immunity ». *New England Journal of Medicine* 343 (5): 338-44. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008033430506>.
- Millennium Ecosystem Assessment (Program), éd. 2005. *Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis*. Washington, DC: Island Press.
- Miller, Michaela E., Mark Hamann, et Frederieke J. Kroon. 2020. « Bioaccumulation and Biomagnification of Microplastics in Marine Organisms: A Review and Meta-Analysis of Current Data ». *PLOS ONE* 15 (10): e0240792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240792>.
- Moos, Nadia von, Patricia Burkhardt-Holm, et Angela Köhler. 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): 11327-35. <https://doi.org/10.1021/es302332w>.
- Murdoch, Caitlin C., et John F. Rawls. 2019. « Commensal Microbiota Regulate Vertebrate Innate Immunity-Insights From the Zebrafish ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02100>.
- Nelson, David L., et Michael M. Cox. 2017. « Chapter 17: Fatty Acid Catabolism ». In *Lehninger: Principles of Biochemistry*, Seventh edition, 649-75. macmillan education.
- Nielsen, Anders Lade, et Arne Lund Jørgensen. 2003. « Structural and Functional Characterization of the Zebrafish Gene for Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP ». *Gene* 310 (mai): 123-32. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00526-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00526-2).
- Novoa, Beatriz, et Antonio Figueras. 2012. « Zebrafish: Model for the Study of Inflammation and the Innate Immune Response to Infectious Diseases ». In *Current Topics in Innate Immunity II*, édité par John D. Lambris et George Hajishengallis, 253-75. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_15.
- Oehlmann, Jörg, Ulrike Schulte-Oehlmann, Werner Kloas, Oana Jagnytsch, Ilka Lutz, Kresten O. Kusk, Leah Wollenberger, et al. 2009. « A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1526): 2047-62. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0242>.
- Parenti, Camilla Carla, Anna Ghilardi, Camilla Della Torre, Stefano Magni, Luca Del Giacco, et Andrea Binelli. 2019. « Evaluation of the Infiltration of Polystyrene Nanobeads in Zebrafish Embryo Tissues after Short-Term Exposure and the Related Biochemical and Behavioural Effects ». *Environmental Pollution* 254 (novembre): 112947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.115>.
- Paunesku, T., S. Mittal, M. Protić, J. Oryhon, S. V. Korolev, A. Joachimiak, et G. E. Woloschak. 2001. « Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome ». *International Journal of Radiation Biology* 77 (10): 1007-21. <https://doi.org/10.1080/09553000110069335>.
- Pérez, T., J. L. Balcázar, I. Ruiz-Zarzuola, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, et J. L. Múzquiz. 2010. « Host-Microbiota Interactions within the Fish Intestinal Ecosystem ». *Mucosal Immunology* 3 (4): 355-60. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.12>.
- Pham, Linh N., Michelle Kanther, Ivana Semova, et John F. Rawls. 2008. « Methods for Generating and

Colonizing Gnotobiotic Zebrafish ». *Nature Protocols* 3 (12): 1862-75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.186>.

Pitt, Jordan A., Rafael Trevisan, Andrey Massarsky, Jordan S. Kozal, Edward D. Levin, et Richard T. Di Giulio. 2018. « Maternal Transfer of Nanoplastics to Offspring in Zebrafish (Danio Rerio): A Case Study with Nanopolystyrene ». *Science of The Total Environment* 643 (décembre): 324-34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.186>.

« Plastics - The facts ». 2020.

Potters, G. 2013. *Marine Pollution*. Place of publication unknown: Bookboon.

Qiao, Ruxia, Yongfeng Deng, Shenghu Zhang, Marina Borri Wolosker, Qiande Zhu, Hongqiang Ren, et Yan Zhang. 2019. « Accumulation of Different Shapes of Microplastics Initiates Intestinal Injury and Gut Microbiota Dysbiosis in the Gut of Zebrafish ». *Chemosphere* 236 (décembre): 124334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065>.

Qiao, Ruxia, Cheng Sheng, Yifeng Lu, Yan Zhang, Hongqiang Ren, et Bernardo Lemos. 2019. « Microplastics Induce Intestinal Inflammation, Oxidative Stress, and Disorders of Metabolome and Microbiome in Zebrafish ». *Science of The Total Environment* 662 (avril): 246-53. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.245>.

Rawls, John F., Michael A. Mahowald, Andrew L. Goodman, Chad M. Trent, et Jeffrey I. Gordon. 2007. « In Vivo Imaging and Genetic Analysis Link Bacterial Motility and Symbiosis in the Zebrafish Gut ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (18): 7622-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702386104>.

Raza, Asif. 2018. « Microplastics in Freshwater Systems: A Review on Its Accumulation and Effects on Fishes », octobre. <https://doi.org/10.20944/preprints201810.0696.v1>.

Rillig, Matthias C., et Anika Lehmann. 2020. « Microplastic in Terrestrial Ecosystems ». *Science* 368 (6498): 1430-31. <https://doi.org/10.1126/science.abb5979>.

Ritchie, Hannah, et Max Roser. 2018. « Plastic Pollution ». *Our World in Data*, septembre. <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>.

Rochman, Chelsea M., et Timothy Hoellein. 2020. « The Global Odyssey of Plastic Pollution ». *Science* 368 (6496): 1184-85. <https://doi.org/10.1126/science.abc4428>.

Sá, Luís Carlos de, Miguel Oliveira, Francisca Ribeiro, Thiago Lopes Rocha, et Martyn Norman Futter. 2018. « Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? » *Science of The Total Environment* 645 (décembre): 1029-39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>.

Santos, Dércia, Luís Félix, Ana Luzio, Susana Parra, Juan Bellas, et Sandra M. Monteiro. 2021. « Single and Combined Acute and Subchronic Toxic Effects of Microplastics and Copper in Zebrafish (Danio Rerio) Early Life Stages ». *Chemosphere* 277 (août): 130262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130262>.

Santos, Dércia, Luís Félix, Ana Luzio, Susana Parra, Edna Cabecinha, Juan Bellas, et Sandra M. Monteiro. 2020. « Toxicological Effects Induced on Early Life Stages of Zebrafish (Danio Rerio) after an Acute Exposure to Microplastics Alone or Co-Exposed with Copper ». *Chemosphere* 261 (décembre): 127748. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127748>.

Sardet, C., M. Pisam, et J. Maetz. 1979. « The Surface Epithelium of Teleostean Fish Gills. Cellular and Junctional Adaptations of the Chloride Cell in Relation to Salt Adaptation. » *Journal of Cell Biology* 80 (1): 96-117. <https://doi.org/10.1083/jcb.80.1.96>.

Scornaienchi, Marcus L., Cammi Thornton, Kristine L. Willett, et Joanna Y. Wilson. 2010. « Functional

Differences in the Cytochrome P450 1 Family Enzymes from Zebrafish (*Danio Rerio*) Using Heterologously Expressed Proteins ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 502 (1): 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.018>.

Sepulcre, María P., Francisca Alcaraz-Pérez, Azucena López-Muñoz, Francisco J. Roca, José Meseguer, María L. Cayuela, et Victoriano Mulero. 2009. « Evolution of Lipopolysaccharide (LPS) Recognition and Signaling: Fish TLR4 Does Not Recognize LPS and Negatively Regulates NF-KB Activation ». *The Journal of Immunology* 182 (4): 1836-45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801755>.

Sharifinia, Moslem, Zahra Afshari Bahmanbeigloo, Mehrzad Keshavarzifard, Mohammad Hossein Khanjani, et Brett P. Lyons. 2020. « Microplastic Pollution as a Grand Challenge in Marine Research: A Closer Look at Their Adverse Impacts on the Immune and Reproductive Systems ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 204 (novembre): 111109. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111109>.

Sharma, Shivika, et Subhankar Chatterjee. 2017. « Microplastic Pollution, a Threat to Marine Ecosystem and Human Health: A Short Review ». *Environmental Science and Pollution Research* 24 (27): 21530-47. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9910-8>.

Song, Jin Ah, Cheol Young Choi, et Heung-Sik Park. 2020. « Exposure of Bay Scallop *Argopecten Irradians* to Micro-Polystyrene: Bioaccumulation and Toxicity ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 236 (octobre): 108801. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108801>.

Souza Machado, Anderson Abel de, Werner Kloas, Christiane Zarfl, Stefan Hempel, et Matthias C. Rillig. 2018. « Microplastics as an Emerging Threat to Terrestrial Ecosystems ». *Global Change Biology* 24 (4): 1405-16. <https://doi.org/10.1111/gcb.14020>.

Spead, Olivia, Tine Verreet, Cory J. Donelson, et Fabienne E. Poulain. 2018. « Characterization of the Caspase Family in Zebrafish ». *PLOS ONE* 13 (5): e0197966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197966>.

Spence, Rowena. 2011. « Zebrafish Ecology and Behaviour ». In *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*, édité par Allan V. Kalueff et Jonathan M. Cachat, 1-46. Neuromethods. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-922-2_1.

Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, et Carl Smith. 2008. « The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio Rerio* ». *Biological Reviews* 83 (1): 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.

Stagaman, Keaton, Adam R. Burns, Karen Guillemin, et Brendan JM Bohannan. 2017. « The Role of Adaptive Immunity as an Ecological Filter on the Gut Microbiota in Zebrafish ». *The ISME Journal* 11 (7): 1630-39. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.28>.

Steer, Madeleine, Matthew Cole, Richard C. Thompson, et Penelope K. Lindeque. 2017. « Microplastic Ingestion in Fish Larvae in the Western English Channel ». *Environmental Pollution* 226 (juillet): 250-59. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.062>.

Stephens, W. Zac, Adam R. Burns, Keaton Stagaman, Sandi Wong, John F. Rawls, Karen Guillemin, et Brendan J. M. Bohannan. 2016. « The Composition of the Zebrafish Intestinal Microbial Community Varies across Development ». *The ISME Journal* 10 (3): 644-54. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.140>.

Tan, Fang, Samwel Mchele Limbu, Ye Qian, Fang Qiao, Zhen-Yu Du, et Meiling Zhang. 2019. « The Responses of Germ-Free Zebrafish (*Danio rerio*) to Varying Bacterial Concentrations, Colonization Time Points, and Exposure Duration ». *Frontiers in Microbiology* 10: 2156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02156>.

« Tecniplast France | ZebTEC ». s. d. Consulté le 3 septembre 2021. <https://www.tecniplast.it/fr/product/zebtec.html>.

Tort, Lluís. 2011. « Stress and Immune Modulation in Fish ». *Developmental & Comparative Immunology*,

Special issue on Teleost Fish Immunology, 35 (12): 1366-75. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.

Trede, Nikolaus S, David M Langenau, David Traver, A. Thomas Look, et Leonard I Zon. 2004. « The Use of Zebrafish to Understand Immunity ». *Immunity* 20 (4): 367-79. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00084-6).

Umamaheswari, Sathisaran, Sheela Priyadarshinee, Monojit Bhattacharjee, Krishna Kadirvelu, et Mathan Ramesh. 2021. « Exposure to Polystyrene Microplastics Induced Gene Modulated Biological Responses in Zebrafish (Danio Rerio) ». *Chemosphere* 281 (octobre): 128592. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128592>.

Umamaheswari, Sathisaran, Sheela Priyadarshinee, Krishna Kadirvelu, et Mathan Ramesh. 2021. « Polystyrene Microplastics Induce Apoptosis via ROS-Mediated P53 Signaling Pathway in Zebrafish ». *Chemico-Biological Interactions* 345 (août): 109550. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109550>.

Unamur. s. d. « Histologie spéciale animale ». Consulté le 11 avril 2020. <https://www.histology.be/atlas/HSA/general/menuHSA.htm>.

Vaart, Michiel van der, Herman P. Spaink, et Annemarie H. Meijer. 2012. « Pathogen Recognition and Activation of the Innate Immune Response in Zebrafish ». *Advances in Hematology* 2012 (juillet): e159807. <https://doi.org/10.1155/2012/159807>.

Varela, M., S. Dios, B. Novoa, et A. Figueras. 2012. « Characterisation, Expression and Ontogeny of Interleukin-6 and Its Receptors in Zebrafish (Danio Rerio) ». *Developmental & Comparative Immunology* 37 (1): 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.004>.

Wallace, Kenneth N, et Michael Pack. 2003. « Unique and Conserved Aspects of Gut Development in Zebrafish ». *Developmental Biology* 255 (1): 12-29. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00034-9).

Wan, Zhiqin, Caiyun Wang, Jiajie Zhou, Manlu Shen, Xiaoyu Wang, Zhengwei Fu, et Yuanxiang Jin. 2019. « Effects of Polystyrene Microplastics on the Composition of the Microbiome and Metabolism in Larval Zebrafish ». *Chemosphere* 217 (février): 646-58. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.070>.

Wang, Qiongjie, Xiaoxue Wangjin, Yong Zhang, Ningxin Wang, Yulai Wang, Guanhua Meng, et Yihua Chen. 2020. « The Toxicity of Virgin and UV-Aged PVC Microplastics on the Growth of Freshwater Algae *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *Science of The Total Environment* 749 (décembre): 141603. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141603>.

Wang, Wenfeng, Jing Ge, et Xiangyang Yu. 2020. « Bioavailability and Toxicity of Microplastics to Fish Species: A Review ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189 (février): 109913. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109913>.

Wang, Ying, Zheng Mao, Mingxing Zhang, Guanghui Ding, Jingxian Sun, Meijia Du, Quanbin Liu, et al. 2019. « The Uptake and Elimination of Polystyrene Microplastics by the Brine Shrimp, *Artemia Parthenogenetica*, and Its Impact on Its Feeding Behavior and Intestinal Histology ». *Chemosphere* 234 (novembre): 123-31. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.267>.

Wen, Bin, Nan Zhang, Shi-Rong Jin, Zai-Zhong Chen, Jian-Zhong Gao, Ying Liu, Han-Peng Liu, et Zhe Xu. 2018. « Microplastics Have a More Profound Impact than Elevated Temperatures on the Predatory Performance, Digestion and Energy Metabolism of an Amazonian Cichlid ». *Aquatic Toxicology* 195 (février): 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.010>.

Windsor, Fredric M., Isabelle Durance, Alice A. Horton, Richard C. Thompson, Charles R. Tyler, et Steve J. Ormerod. 2019. « A Catchment-Scale Perspective of Plastic Pollution ». *Global Change Biology* 25 (4): 1207-21. <https://doi.org/10.1111/gcb.14572>.

Wright, Stephanie L., Richard C. Thompson, et Tamara S. Galloway. 2013. « The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review ». *Environmental Pollution* 178 (juillet): 483-92.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>.

Xia, Xiaohua, Menghan Sun, Miao Zhou, Zhongjie Chang, et Li Li. 2020. « Polyvinyl Chloride Microplastics Induce Growth Inhibition and Oxidative Stress in *Cyprinus Carpio* Var. Larvae ». *Science of The Total Environment* 716 (mai): 136479. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136479>.

Xu, Kaihang, Yindan Zhang, Yumei Huang, et Jun Wang. 2021. « Toxicological Effects of Microplastics and Phenanthrene to Zebrafish (*Danio Rerio*) ». *Science of The Total Environment* 757 (février): 143730. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143730>.

Yin, Liyun, Bijuan Chen, Bin Xia, Xiaotao Shi, et Keming Qu. 2018. « Polystyrene Microplastics Alter the Behavior, Energy Reserve and Nutritional Composition of Marine Jacopever (*Sebastes Schlegelii*) ». *Journal of Hazardous Materials* 360 (octobre): 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.110>.

Yin, Liyun, Haiyan Liu, Hongwu Cui, Bijuan Chen, Lingli Li, et Fan Wu. 2019. « Impacts of Polystyrene Microplastics on the Behavior and Metabolism in a Marine Demersal Teleost, Black Rockfish (*Sebastes Schlegelii*) ». *Journal of Hazardous Materials* 380 (décembre): 120861. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120861>.

Zapata, A., B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-de Frías, et A. Cortés. 2006. « Ontogeny of the Immune System of Fish ». *Fish & Shellfish Immunology, Reviews in Fish Immunology*, 20 (2): 126-36. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>.

« Zebrafish Embryo Collection for research - Aquatic Solutions ». s. d. Consulté le 4 septembre 2021. <http://www.aquaticsolutions.it/products/zebrafish-breeding.html>.

« ZFIN Gene: mpx ». s. d. Consulté le 14 novembre 2021. <http://zfin.org/ZDB-GENE-030131-9460>.

« ZFIN Gene: pcna ». s. d. Consulté le 12 novembre 2021. <http://zfin.org/ZDB-GENE-000210-8#summary>.

« ZFIN Gene: tfa ». s. d. Consulté le 14 novembre 2021. <http://zfin.org/ZDB-GENE-980526-35#summary>.

Zhang, Rui, Martin R. Silic, Andy Schaber, Ola Wasel, Jennifer L. Freeman, et Maria S. Sepúlveda. 2020. « Exposure Route Affects the Distribution and Toxicity of Polystyrene Nanoplastics in Zebrafish ». *Science of The Total Environment* 724 (juillet): 138065. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138065>.

Zhang, Run, Meng Wang, Xiaoping Chen, Changming Yang, et Lingling Wu. 2020. « Combined Toxicity of Microplastics and Cadmium on the Zebrafish Embryos (*Danio Rerio*) ». *Science of The Total Environment* 743 (novembre): 140638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140638>.

Zhang, Yu-Ting, Wei Wei, Qi-Su Huang, Chen Wang, Yun Wang, et Bing-Jie Ni. 2020. « Insights into the Microbial Response of Anaerobic Granular Sludge during Long-Term Exposure to Polyethylene Terephthalate Microplastics ». *Water Research* 179 (juillet): 115898. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115898>.

Zhao, Yao, Zhen Qin, Zhuizui Huang, Zhiwei Bao, Ting Luo, et Yuanxiang Jin. 2021. « Effects of Polyethylene Microplastics on the Microbiome and Metabolism in Larval Zebrafish ». *Environmental Pollution* 282 (août): 117039. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117039>.

7 Remerciements

Au cours de ce mémoire, plusieurs personnes ont contribué à sa bonne réalisation.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, Monsieur Patrick Kestemont, pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire et d'intégrer l'équipe de l'URBE.

Ensuite, je souhaite remercier mon encadrante et co-promotrice, Valérie Cornet, pour son aide, son suivi, ses conseils et sa confiance au cours de la réalisation de ce mémoire. Je tiens également à remercier Andry Ny Aina Rabezanahary et Thaïs Disneur pour leur confiance, leur aide, leurs conseils et leur soutien lorsque je rencontrais un problème ou avais des questions sur nos manipulations et/ou résultats.

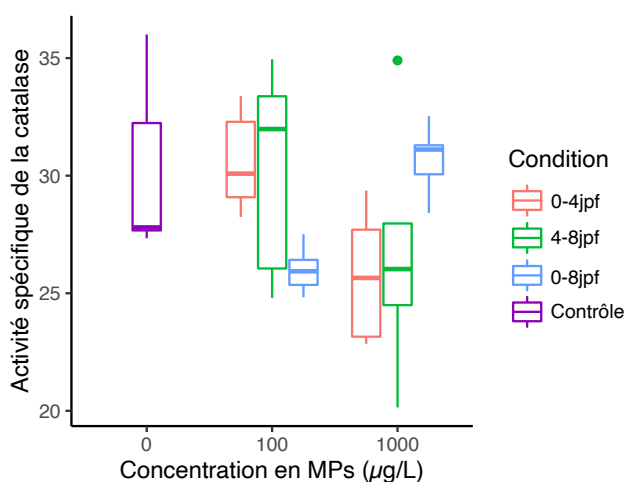
Merci également à toute l'équipe de l'URBE pour l'accueil et l'ambiance au sein du laboratoire.

Enfin, je remercie ma famille et mes ami(e)s pour l'aide et le soutien dont ils ont fait preuve au cours de l'élaboration de ce travail. Plus particulièrement, je tiens à faire part de ma gratitude envers Maguy Masset (ma maman), Estelle Cornez (ma cousine) et Harmony Piette (ma sœur) pour avoir relu et corrigé mon mémoire au niveau de l'orthographe et de la syntaxe. Je les remercie également toutes les trois chaleureusement ainsi que mes colocataires (Charlotte De Wulf et Inès Bouriez) pour leur soutien, leur réconfort et leurs encouragements durant l'élaboration de ce travail et toutes ces années qui n'ont pas tous les jours été faciles.

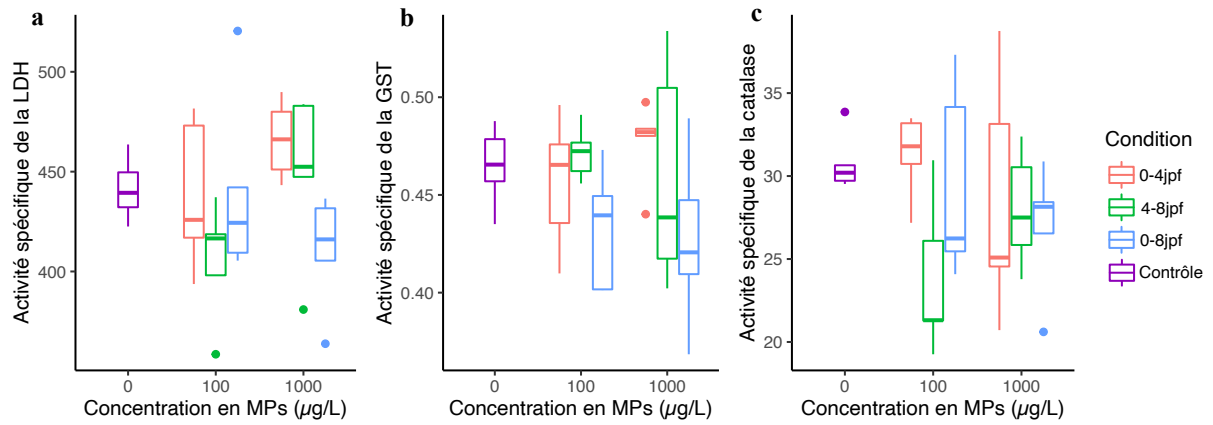
8 Annexes

Annexe 1 : Plan de plaque 384 puits pour les analyses qPCR. Les numéros (1 à 70) correspondent aux échantillons en duplicats alors que les ligne G et O reprennent les dilutions pour la droite de calibration (D1 – D6) en triplicats ainsi que les blancs également en triplicats.

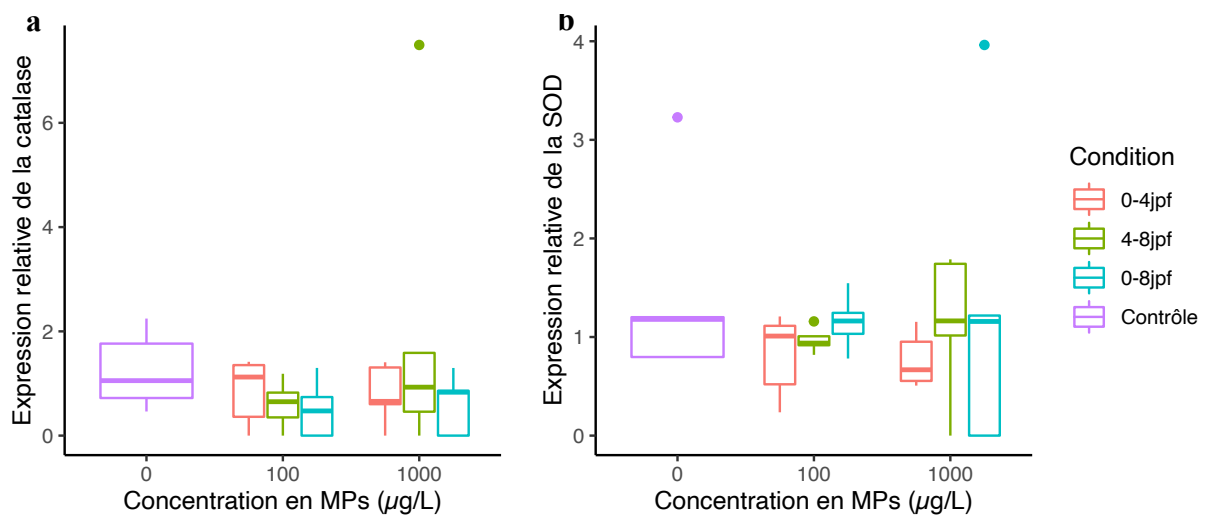
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 | 8 | 8 | 9 | 9 | 10 | 10 | 11 | 11 | 12 | 12 |
| B | 13 | 13 | 14 | 14 | 15 | 15 | 16 | 16 | 17 | 17 | 18 | 18 | 19 | 19 | 20 | 20 | 21 | 21 | 22 | 22 | 23 | 23 | 24 | 24 |
| C | 25 | 25 | 26 | 26 | 27 | 27 | 28 | 28 | 29 | 29 | 30 | 30 | 31 | 31 | 32 | 32 | 33 | 33 | 34 | 34 | 35 | 35 | 36 | 36 |
| D | 37 | 37 | 38 | 38 | 39 | 39 | 40 | 40 | 41 | 41 | 42 | 42 | 43 | 43 | 44 | 44 | 45 | 45 | 46 | 46 | 47 | 47 | 48 | 48 |
| E | 49 | 49 | 50 | 50 | 51 | 51 | 52 | 52 | 53 | 53 | 54 | 54 | 55 | 55 | 56 | 56 | 57 | 57 | 58 | 58 | 59 | 59 | 60 | 60 |
| F | 61 | 61 | 62 | 62 | 63 | 63 | 64 | 64 | 65 | 65 | 66 | 66 | 67 | 67 | 68 | 68 | 69 | 69 | 70 | 70 | | | | |
| G | D1 | D1 | D1 | D2 | D2 | D2 | D3 | D3 | D3 | D4 | D4 | D4 | D5 | D5 | D5 | D6 | D6 | D6 | B | B | B | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 | 8 | 8 | 9 | 9 | 10 | 10 | 11 | 11 | 12 | 12 |
| J | 13 | 13 | 14 | 14 | 15 | 15 | 16 | 16 | 17 | 17 | 18 | 18 | 19 | 19 | 20 | 20 | 21 | 21 | 22 | 22 | 23 | 23 | 24 | 24 |
| K | 25 | 25 | 26 | 26 | 27 | 27 | 28 | 28 | 29 | 29 | 30 | 30 | 31 | 31 | 32 | 32 | 33 | 33 | 34 | 34 | 35 | 35 | 36 | 36 |
| L | 37 | 37 | 38 | 38 | 39 | 39 | 40 | 40 | 41 | 41 | 42 | 42 | 43 | 43 | 44 | 44 | 45 | 45 | 46 | 46 | 47 | 47 | 48 | 48 |
| M | 49 | 49 | 50 | 50 | 51 | 51 | 52 | 52 | 53 | 53 | 54 | 54 | 55 | 55 | 56 | 56 | 57 | 57 | 58 | 58 | 59 | 59 | 60 | 60 |
| N | 61 | 61 | 62 | 62 | 63 | 63 | 64 | 64 | 65 | 65 | 66 | 66 | 67 | 67 | 68 | 68 | 69 | 69 | 70 | 70 | | | | |
| O | D1 | D1 | D1 | D2 | D2 | D2 | D3 | D3 | D3 | D4 | D4 | D4 | D5 | D5 | D5 | D6 | D6 | D6 | B | B | B | | | |
| P | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



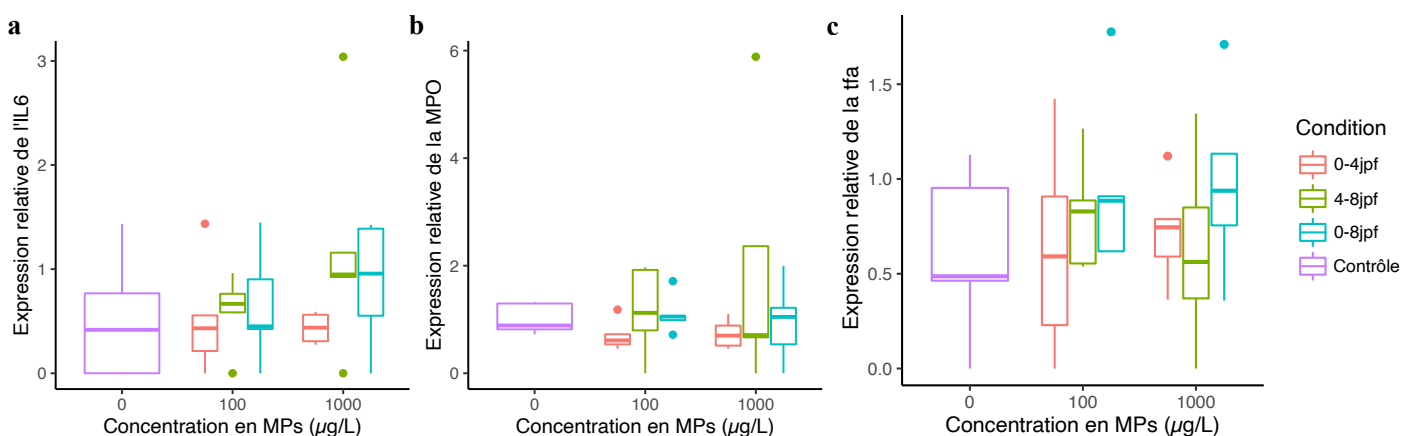
Annexe 2 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'activité spécifique de la catalase chez les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations d'exposition (0, 100 et 1000 µg/L) pour les trois conditions d'exposition (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes conditions et concentrations d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



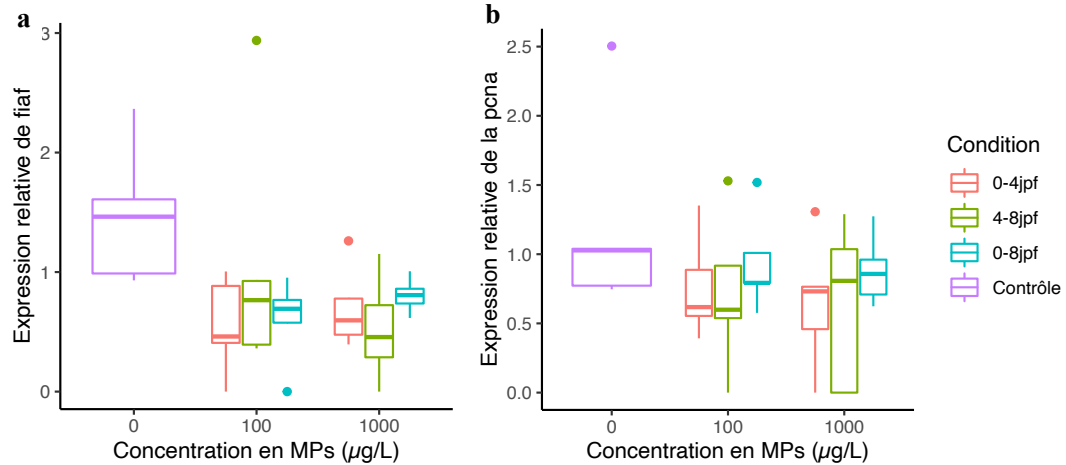
Annexe 3 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'activité spécifique de la LDH (a), la GST (b) et la catalase (c) chez les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations d'exposition (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions d'exposition (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes conditions et concentrations d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



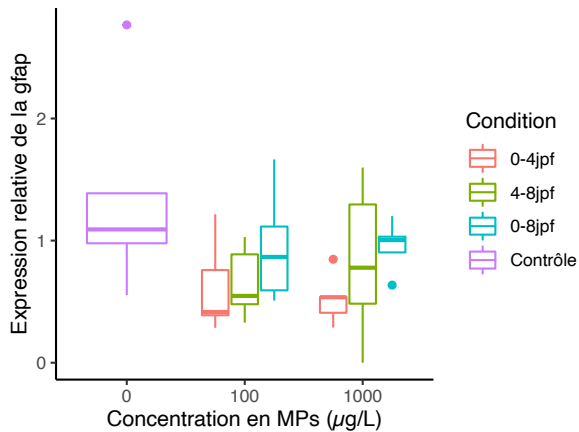
Annexe 4 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative des gènes cat (a) et sod (b) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



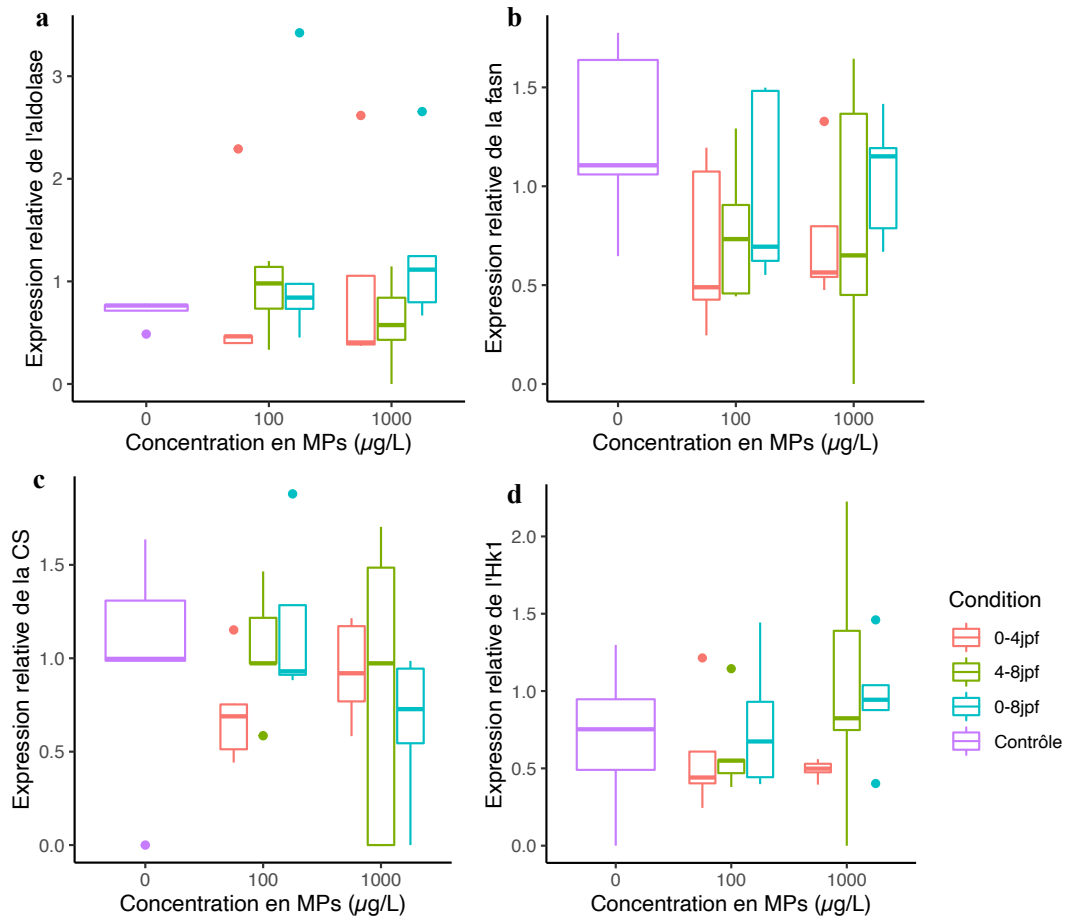
Annexe 5 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative des gènes il6 (a), mpo (b) et tfa (c) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



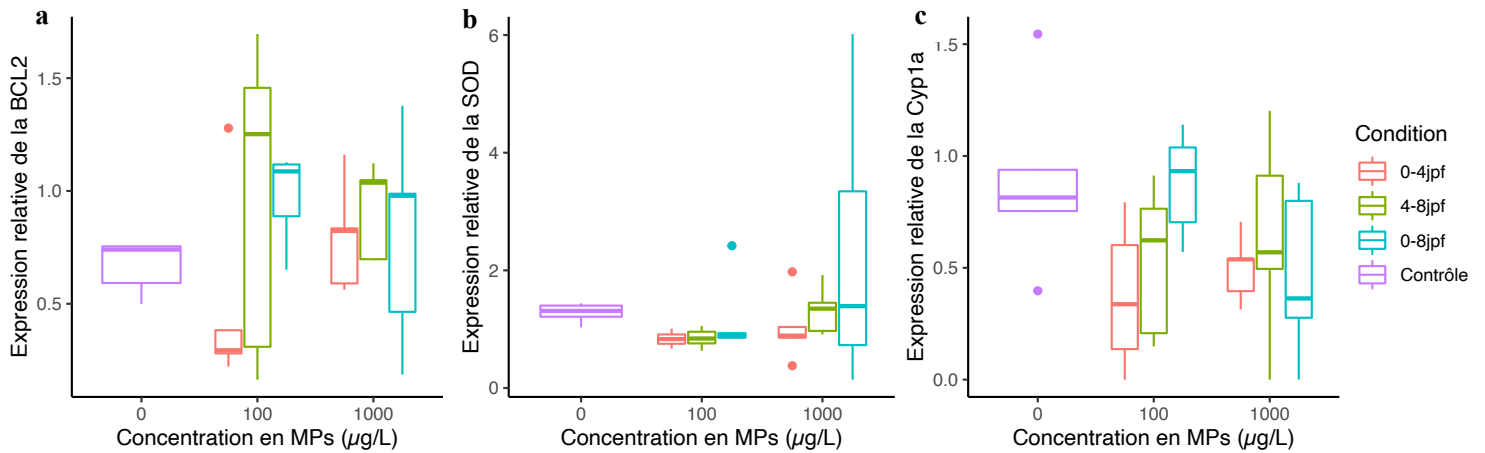
Annexe 6 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative des gènes *fiaf* (a) et *pcna* (b) sur les larves de poisson-zèbres selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



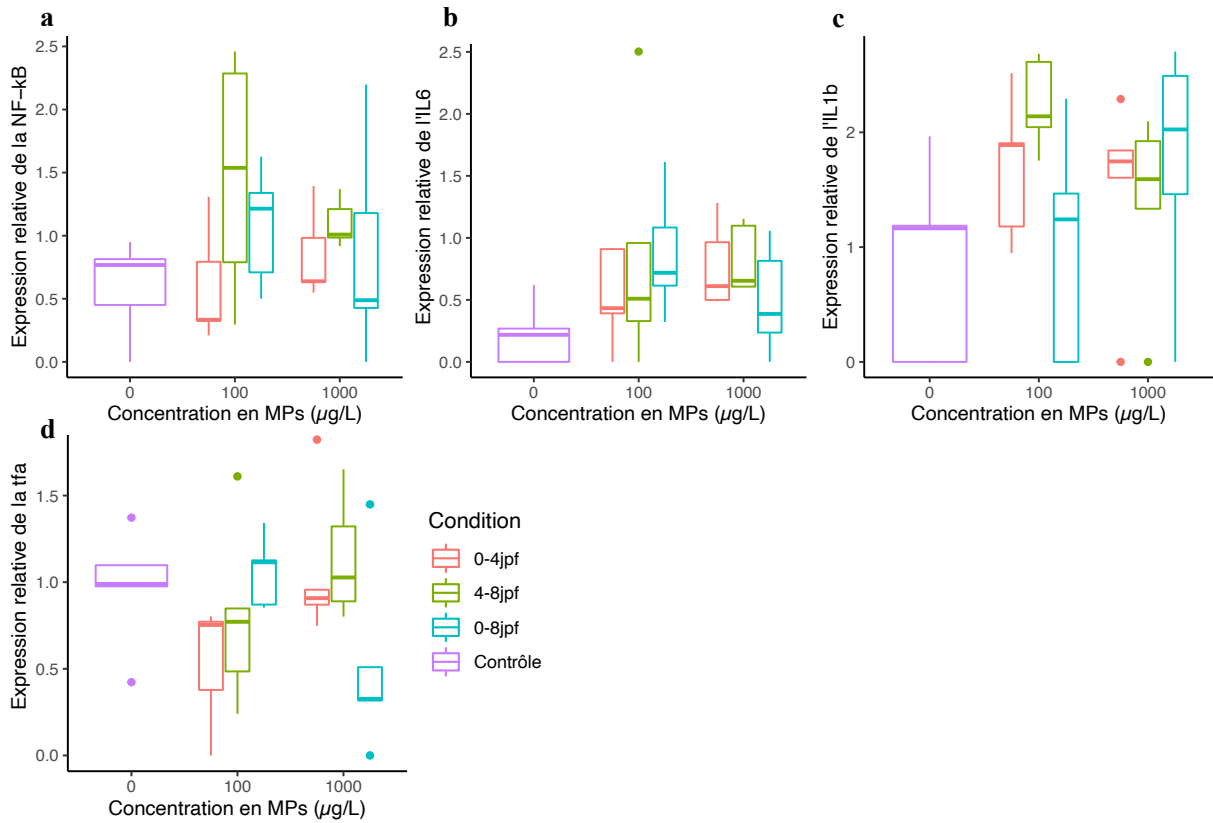
Annexe 7 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative du gène *gfap* sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 $\mu\text{g/L}$) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



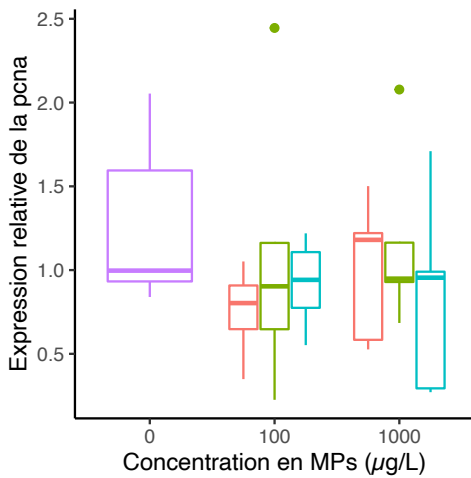
Annexe 8 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs sur l'expression relative des gènes aldo (a), fasn (b), cs (c) et hk1 (d) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



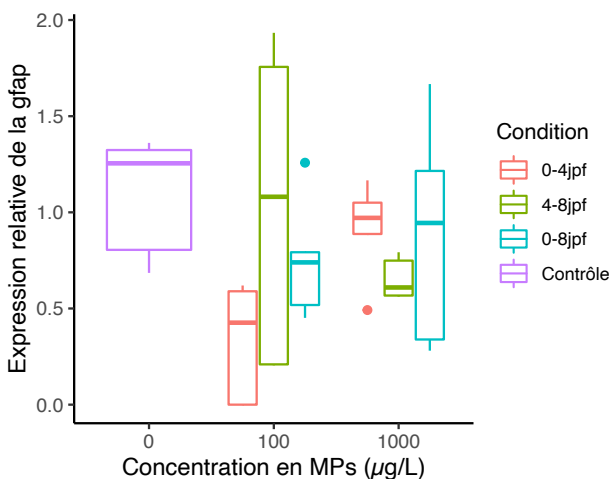
Annexe 9 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative des gènes bcl2 (a), sod (b) et cyp1a (c) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000µg/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



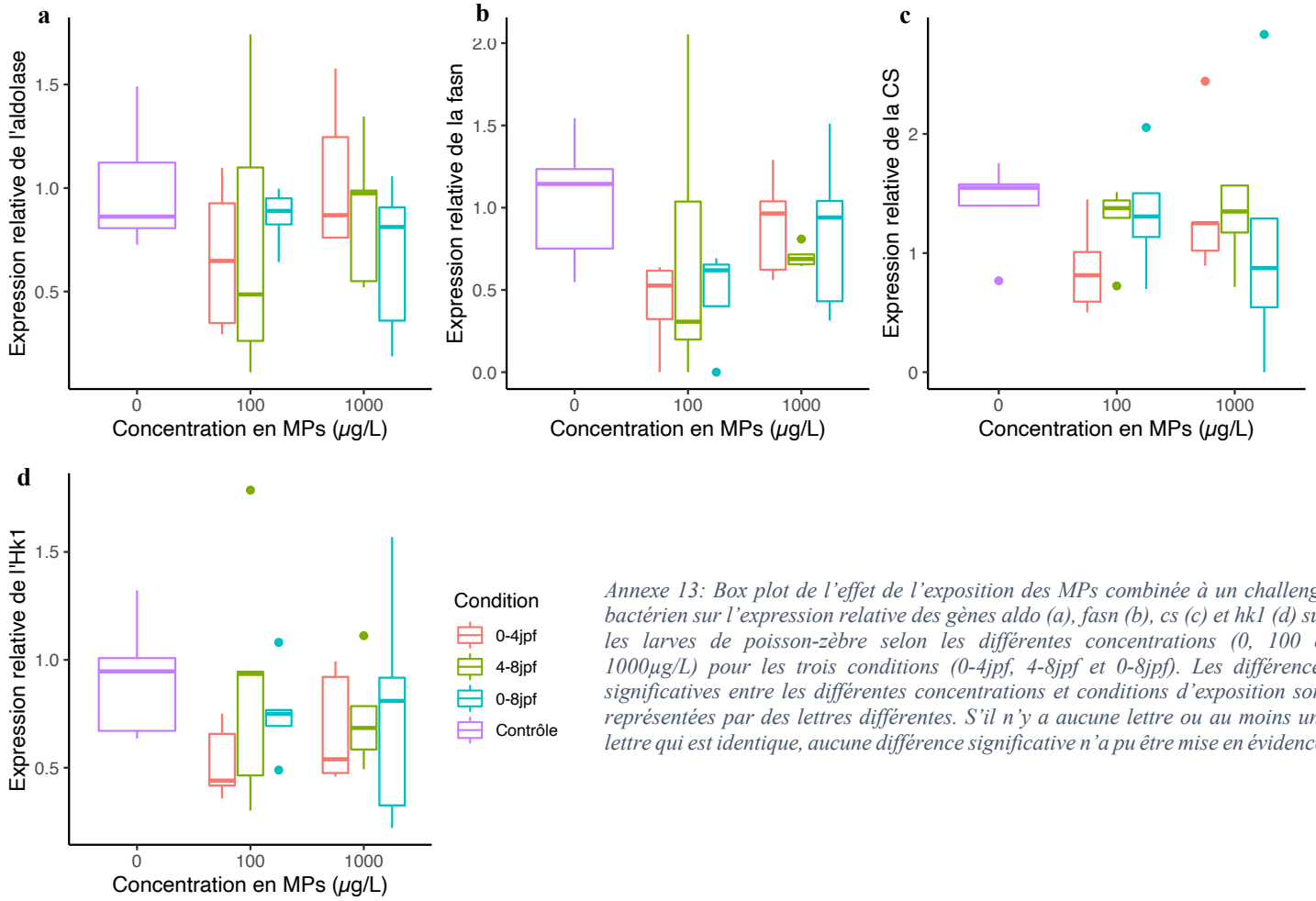
Annexe 10 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative des gènes *nfkb* (a), *il6* (b), *il1b* (c) et *tfa* (d) sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 μ g/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

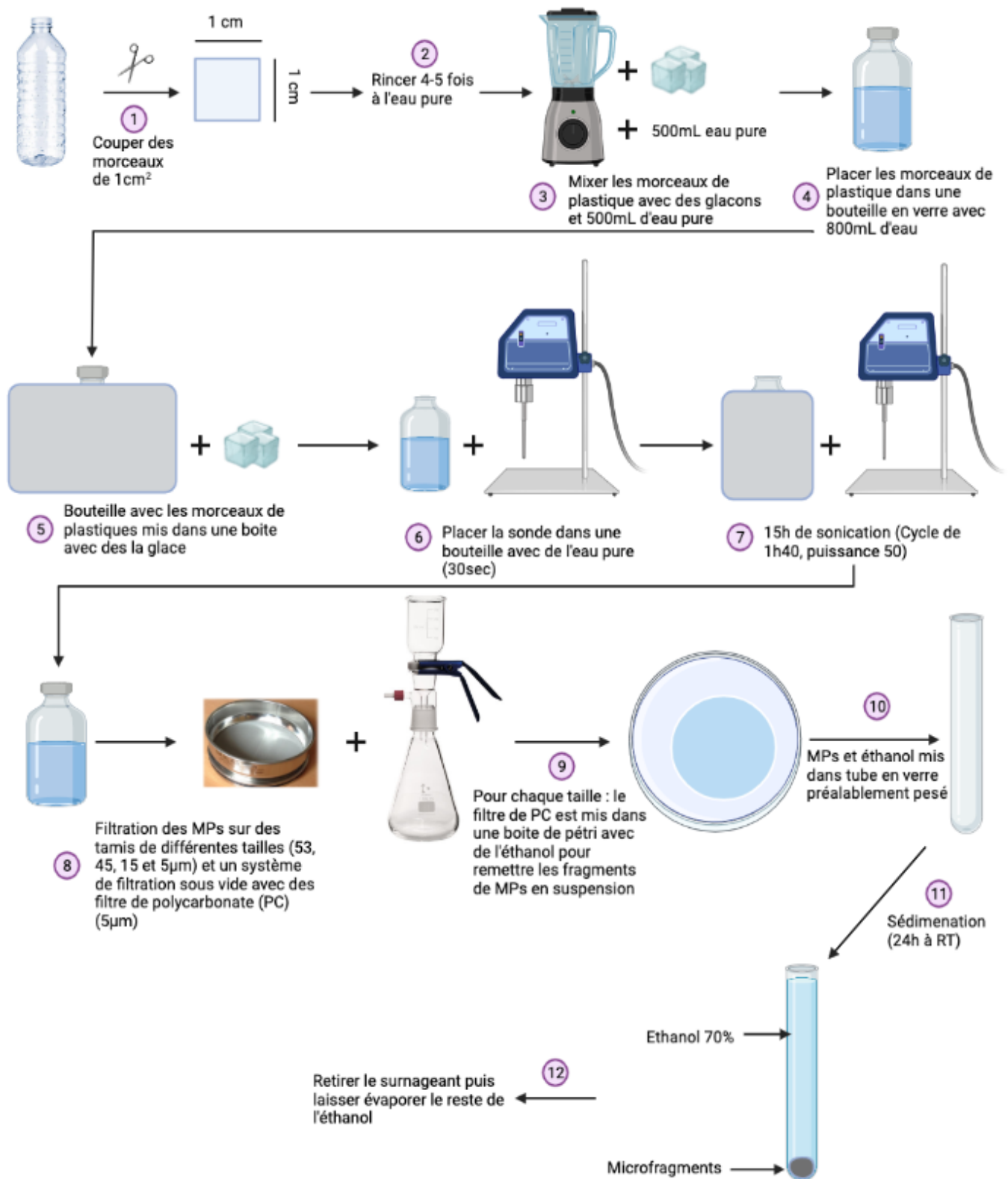


Annexe 11 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *pcna* sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 μ g/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.



Annexe 12 : Box plot de l'effet de l'exposition des MPs combinée à un challenge bactérien sur l'expression relative du gène *gfap* sur les larves de poisson-zèbre selon les différentes concentrations (0, 100 et 1000 μ g/L) pour les trois conditions (0-4jpf, 4-8jpf et 0-8jpf). Les différences significatives entre les différentes concentrations et conditions d'exposition sont représentées par des lettres différentes. S'il n'y a aucune lettre ou au moins une lettre qui est identique, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.





Annexe 14 : Protocole mis en place pour la production de fragments de MPs (PET). Lors de l'étape 8, soit l'étape de filtration, tous les tamis sont superposés sauf celui de 5µm qui est remplacé par un bécber afin de directement récupérer les MPs de 5µm. La bouteille contenant les MPs nouvellement formés est vidée sur ces tamis placés par-dessus le bécber. Elle sera ensuite rincée 2-3 fois avec de l'eau pure afin de récupérer un maximum de matériel. Puis le bécber contenant les MPs de 5µm est vidé dans le système de filtration à vide où un filtre de polycarbonate a été mis à l'endroit prévu. Une série de rinçage est effectuée pour le bécber et le système de filtration. Pour chacun des trois tamis, il faut rincer leur surface à l'eau pure et récupérer dans un bécber puis verser le contenu dans le système de filtration. Entre chacun des tamis, il faut rincer le bécber et le système de filtration afin de récupérer un maximum de matériel (von der Esch et al. 2020).

