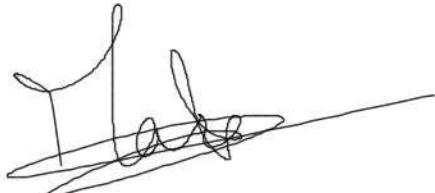


ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Mathilde Madre, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :



Quels sont les effets des microplastiques par voies trophique et directe sur le crabe *Pachygrapsus marmoratus* ?

Mathilde Madre

Laboratoire BiOSSE

Encadrants :

Vincent Leignel
Oihana Latchere
Amélie Châtel
Alexandre Popier

Durée : 5 mois
Période : Janvier-Juin

Année académique : 2022-2023

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes encadrants Vincent Leignel et Amélie Châtel qui ont accepté de me prendre en charge et de me former au cours de ces cinq mois.

Merci également à mes co-encadrantes, à savoir Oihana Latchere qui m'a été d'une grande aide pour la première partie de mon stage ainsi qu'Isabelle Métais pour sa formation en biologie moléculaire.

Tout autant, je remercie Alexandre Popier pour son intérêt et sa collaboration pour mon stage.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des employés du Laboratoire BiOSSE d'Angers et du Mans, dont les techniciennes Marie-Hélène Roche, Mélanie Bruneau et Yolène Letertre qui m'ont orientée pour l'organisation de mon stage. Merci à Clémentine Labbé pour m'avoir permis de participer aux expérimentations de sa thèse et pour sa formation en zootechnie.

Enfin, je remercie les stagiaires Lucie Messager et Clément Baracchini avec qui j'ai pu coopérer et échanger des compétences.

Abréviation

MP	Microplastique
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
PE	Polyéthylène
PP	Polypropylène
GST	Glutathion-S-Transférase
SOD	Superoxyde Dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathion Peroxydase
AchE	Acétylcholinestérase
KOH	Hydroxyde de potassium
TBS	Solution saline Tamponnée au Tris
BSA	Albumine de Sérum Bovin
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
DTNB	Réactif d'Ellman
BET	Bromure d'éthidium
DMP	Phtalate de diméthyle
DEP	Phtalate de diéthyle
DIPB	Phtalate de diisobutyle
DBP	Phtalate de dibutyle
DMEP	Phtalate de bis (2-éthoxyéthyle)
DPP	Phtalate de di-n-pentyle
DnHP	Phtalate de di-n-hexyle
DnPP	Phtalate de bis(2-butoéthyle)
DCHP	Phtalate de dicyclohexyle
DEHP	Phtalate de bis (2-éthylhexyle)
DNOP	Phtalate de dioctyle
DINP	Phtalate de diisononyle

Sommaire

I - Introduction.....	1
II - Matériel et Méthode.....	5
II – a) Récupération des organismes.....	5
II – b) Contamination du modèle proie : <i>Scrobicularia plana</i> (bivalve).....	5
II – c) Contamination du modèle prédateur.....	5
1/ Contamination par voie trophique.....	5
2/ Contamination par voie directe (balnéation).....	6
II – d) Préparation des microplastiques.....	6
II – e) Mesure de la contamination.....	6
II – f) Le dosage des enzymes du système antioxydant.....	7
II – g) Le dosage des acétylcholinestérases comme marqueur de neurotoxicité.....	8
II – h) Le test de génotoxicité : le test Comète.....	8
II – g) Analyses statistiques.....	8
III - Résultats.....	9
III – a) Morphométrie.....	9
III – b) Caractéristiques des microplastiques.....	9
III – c) Mesure de la contamination.....	10
III – d) Le dosage des enzymes du système antioxydant.....	11
III – e) Le dosage des acétylcholinestérases.....	11
III – f) Le test de génotoxicité : le test Comète.....	13
IV - Discussion.....	14
IV – a) Étude de la contamination en microplastiques.....	14
1/ Contamination aux microplastiques.....	14
2/ Sélection des microplastiques ingérés par la Scrobiculaire.....	14
3/ Fragmentation des microplastiques.....	14
4/ Améliorer la mesure de bioaccumulation de microplastiques.....	15
IV – b) Exposition des crabes par voies directe et trophique : le stress oxydant.....	15
1/ Effets des microplastiques.....	15
2/ Effets des polluants.....	15
IV – c) Exposition des crabes par voies directe et trophique : la neurotoxicité.....	16
1/ Effets des microplastiques.....	16
2/ Effets des polluants.....	17
IV – c) Exposition des crabes par voies directe et trophique : la génotoxicité.....	17
1/ Effets des microplastiques.....	17
2/ Effets des polluants.....	17
IV – d) Intérêts de cette étude en écotoxicologie aquatique.....	18
V - Conclusion et perspectives.....	19

I - Introduction

Le plastique, par sa simplicité de production et son coût peu important, est un élément mondialement utilisé et dont la production ne cesse de croître au fil des années (<https://plasticseurope.org/fr/>). Près de 390,7 mégatonnes ont été produits en 2021. De cette forte productivité découle un relargage massif dans l'environnement, que ce soit par les activités industrielles, agricoles ou maritimes (Carney Almroth et al., 2018² ; Zambrano et al., 2019³ ; Tian et al 2022⁴ ; García Rellán et al., 2023⁵). Ces composants sont classés selon leur nature, leur forme et leur taille. Les plastiques, sous l'effet de facteurs physico-chimiques et biologiques, se retrouvent fragmentés en différentes tailles dans l'environnement allant du niveau macro- au nano-plastique (Ivar do Sul et al., 2014⁶). La contamination environnementale en plastiques est influencée par de nombreux facteurs, tels que le dépôt atmosphérique, le ruissellement par l'érosion des sols ou par l'écoulement des cours d'eau. Selon leurs propriétés structurales (densité, forme...) et la salinité du milieu, les plastiques auront tendance à sédimer ou à flotter jusqu'aux estuaires qui sont considérés comme des puits à plastiques (Malli et al., 2022⁷).

Les microplastiques (MP, plastiques < 5mm) sont des polluants à forte préoccupation environnementale car ils pénètrent dans les tissus des organismes, flottent ou circulent sur de large distance *via* les courants (atmosphériques et aquatiques). Les vents marins et les vagues les emportent à travers les océans et les gyres où leurs concentrations ont été estimées à 10 µg MP/L (en estuaire) à 100 µg MP/L (dans les gyres) (Goldstein et al., 2012⁸). Il a été démontré que cette distribution varie selon les courants, les dégradations physico-chimiques voire le développement de biofilms (Bowley et al., 2021⁹). La bioturbation peut d'ailleurs remettre en suspension ces éléments et permettre leur redistribution. Si l'ensemble de ces événements influence la biodisponibilité des microplastiques pour la faune aquatique, leur toxicité est aussi influencée par la présence d'additifs qui peuvent être libérés dans l'organisme après ingestion ou pénétration dans les systèmes respiratoire et cutané. Parmi les composants possibles, on compte les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les métaux traces et les phtalates qui peuvent s'y adsorber (Avio et al., 2015¹⁰ ; Brennecke et al., 2016¹¹).

Les estimations récentes ont révélé que la charge en microplastiques dans les océans serait de 170 milliards de particules flottantes (Eriksen et al., 2023¹²). Plus proche des côtes littorales, une importante pollution a également été répertoriée dans les estuaires à travers le monde. Par exemple, dans les 17 estuaires d'Iran, la présence dominante de fibres ou de films de polyéthylène (PE) a été soulignée, tandis qu'en Chine, le polypropylène et le polyéthylène sont surreprésentés sous forme de fibres (Ghayebzadeh et al., 2021¹³). En Afrique du Sud, les microplastiques flottants ou trouvés dans les sédiments sont majoritairement le polyéthylène basse densité, le polypropylène (PP) et le poly-téréphtalate d'éthylène (Preston-Whyte et al., 2021¹⁴). Des fibres de PP et PE ont également été identifiées en grande quantité dans les eaux de surface en Espagne, tandis que ce sont des fragments de PE qui semblent majoritaires dans les estuaires en France (Frère et al., 2017¹⁵ ; Simon-Sánchez et al., 2019¹⁶). En zone littorale Nord-Ouest américaine, la concentration en microplastiques dans les eaux de surface peut atteindre les 0,1 mg par mètre cube (Goldstein et al., 2012⁸). La gamme de contamination dans ces différentes études est globalement de 0,97 à

2052 particules/kg de sédiment sec voire de 3,5 à 154 particules/m² d'eau de surface.

En parallèle des estimations d'abondances des MP dans l'environnement, de nombreuses études de bioaccumulation dans différentes espèces ont été réalisées. Par exemple, l'une d'entre elles démontrent que les fibres de microplastiques représentent la forme dominante dans les huîtres en Chine, dans la moule bleue en Europe ou dans diverses espèces de poissons dans l'estuaire de la Tamise (Vandermeersch et al., 2015¹⁷ ; Bessa et al., 2018¹⁸ ; Li et al., 2018¹⁹ ; McGoran et al., 2018²⁰). La même problématique a été remarquée dans des huîtres en Argentine et en Géorgie (De Sales-Ribeiro et al., 2020²¹ ; Keisling et al., 2020²²). Pour l'ensemble de ces taxa, les valeurs de contamination vont de 0,12 à 7,2 particules de microplastiques par gramme de tissu, soit de 0,72 à 7,0 particules par individu. Diverses formes de MP ont été caractérisées mais celle qui est majeure reste la fibre de PP et de PE. Ainsi, le PE est compté parmi les plus répandus dans les milieux aquatiques, notamment en raison de l'érosion des sols des agrosystèmes dont le matériel plastique, telles que les bâches, sont composés de PE (Phuong et al., 2016²³).

Des études de mesure de contamination en mer continuent d'émerger, largement focalisées sur les bivalves (filtreurs) et poisson (prédateur). Toutefois, les approches de contamination dans des modèles animaux assurant d'autres fonctions biologiques (brouteur, détritivore, fouisseur...) sont peu développées. C'est le cas des crustacés, dont le mode de vie ferait d'eux un clade particulièrement exposé aux microplastiques (Pisani et al., 2022²⁴). Par exemple, il a été démontré la présence de fibres de MP dans les branchies et le tube digestif chez la crevette grise et le crabe vert (McGoran et al., 2020²⁵ ; Villagran et al., 2020²⁶). Dans une autre investigation environnementale ciblée sur des crabes (*Pachygrapsus transversus*), 47,4 % d'entre eux étaient contaminés de microplastiques, notamment de fibres bleues de nylon (De Barros et al., 2020²⁷).

De multiples effets toxiques des MP ont été caractérisés en laboratoire. Chez la moule de Méditerranée (*Mytilus galloprovincialis*), la bioaccumulation de PE à une concentration de 0,01 mg/ml est associée à des histopathologies puis à la nécrose des branchies. Par ailleurs, la bioaccumulation serait plus importante pour les MP artificiellement vieillis par rapport aux particules commerciales (Bråte et al., 2018²⁸). La réduction de la viabilité des cellules de l'hémolymphé et l'induction de l'immunotoxicité chez la palourde (*Ruditapes philippinarum*) ont été notées après une semaine d'exposition aux microsphères de PE (10-25µg/L, Sikdokur et al., 2020²⁹). Des réponses de types stress oxydant, réponse inflammatoire et apoptose lors de l'exposition de PE à 1000 ng/L pendant 21 jours ont été démontrées dans les branchies de la carpe (*Cyprinus carpio*) (Cao et al., 2023³⁰). Cependant, il est parfois difficile de différencier l'effet des MP de celui des additifs (Alnajar et al., 2021³¹). Du PE sans polluant associé peut aussi avoir des effets délétères, tel que génotoxique (Avio et al., 2015¹⁰). De plus, les niveaux de réponse aux stress (peroxydation lipidique, stress oxydant) sont aussi liés à la taille des particules de MP (Bobori, 2022³²).

Un autre aspect émergent est le potentiel effet du transfert trophique des MP (proie-prédateur). Une étude portant sur le contenu du tube digestif de maquereaux et de fèces de phoques a démontré une probable contamination par voie alimentaire (Nelms et al., 2018³³). Le dénombrement des MP dans l'estomac chez la corbicule japonaise (*Corbicula japonica*), le crabe de vasière (*Chiromantes dehaani*) et le canard morillon

(*Aythya fuligula*) ont mis en avant un phénomène de bioamplification (Nakao et al., 2020³⁴). Ce processus trophique a également été démontré en laboratoire *via* la contamination par voie directe du modèle proie qu'est la moule bleue (*Mytilus edulis*), ensuite consommée par le crabe vert (*Carcinus maenas*). Les microsphères de polystyrène ou les fibres de polypropylène ont été retrouvées dans le tube digestif et l'hémolymphé du crabe (Farrel & Nelson, 2013³⁵ ; Watts et al., 2015³⁶).

Parmi une dizaine d'études de contamination de transfert trophique réalisées sur des espèces estuariennes, le MP le plus utilisé est la microsphère de polystyrène fluorescent, permettant un comptage rapide (Wang et al., 2021³⁷). Pour quelques autres, les types de plastique sélectionnés ont été choisis selon des formes présentes dans les milieux aquatiques, mais presque aucune étude d'effet biologique n'a été associée à ce transfert trophique (Setälä et al., 2014³⁸ ; Xu et al., 2022³⁹). La seule étude comportant des espèces estuariennes et couplant le phénomène de transfert trophique aux effets liés à cette ingestion est relativement récente (Wang et al., 2021³⁷). En consommant du tissu de moule bleue (*Mytilus edulis*) préalablement exposée à des microsphères de polystyrène à forte dose (1000 particules/ml), le crabe des mangroves (*Charybdis japonica*) contenait dans son tube digestif et ses branchies ces MP au bout de 7 jours, après en avoir consommé quotidiennement. Le prédateur a réagi par l'augmentation de l'activité EROD et de l'enzyme détoxifiante GST ainsi que par la réduction de l'activité de l'acétylcholinestérase.

Le crabe marbré (*Pachygrapsus marmoratus*, Grapsidae), apparaît comme un modèle estuarien d'intérêt dont l'aire géographique s'étend de la côte Atlantique française jusqu'au Portugal, ainsi qu'en Méditerranée (Flores et al., 2002⁴⁰ ; Yousef et al., 2022⁴¹). Son régime alimentaire est de type prédateur, dont la composition varie selon la disponibilité des diverses ressources. Elle peut inclure des algues, des cyanobactéries, des gastéropodes et des crustacés voire des morceaux de charognes. Les bivalves représentent toutefois son type de proie majoritaire et préférée au printemps et en été (Cannicci et al., 2007⁴² ; Silva et al., 2009⁴³). En écotoxicologie, *Pachygrapsus marmoratus* est proposé comme une espèce sentinelle et a déjà été utilisée pour évaluer les contaminations en métaux et HAP dans des zones portuaires (Caliani et al., 2023⁴⁴ ; Fratini et al., 2008⁴⁵). De plus, son transcriptome a été récemment caractérisé, ce qui ouvre la possibilité de développer des approches moléculaires pour évaluer l'expression génique de nombreux biomarqueurs (Pinosio et al., 2021⁴⁶). Cependant, aucune étude d'exposition aux microplastiques n'a encore été menée en laboratoire avec le crabe marbré.

En tant que modèle filtreur estuarien et potentielle proie de *P. marmoratus*, la scrobiculaire (*Scrobicularia plana*, Scrobiculariidae) représente un bivalve d'intérêt en écotoxicologie : non seulement pour sa répartition importante de la Grande-Bretagne jusqu'en Afrique sur Nord, mais aussi pour sa grande densité dans les milieux sableux (Verdelhos et al., 2011⁴⁷). Utilisée comme espèce sentinelle pour suivre la contamination en milieu portuaire, la présence de microplastiques chez ce crabe a été relevée (Solé et al., 2009⁴⁸ ; Vital et al., 2021⁴⁹). Des études de leurs réponses biologiques révèlent une bioaccumulation effective des MP, menant à du stress oxydant, de la génotoxicité voire de la neurotoxicité (O'Donovan et al., 2018⁵⁰ ; Ribeiro et al., 2017⁵¹ ; Rodrigues et al., 2022⁵²). De plus, il s'agit d'un modèle de bivalve robuste, et relativement simple à maintenir en laboratoire.

L'objectif de ce stage a été d'évaluer les activités des enzymes antioxydantes (Catalase, GPx, SOD),

la neurotoxicité (AchE) et la génotoxicité au niveau des tissus respiratoire (branchies) et digestif chez des crabes *P. marmoratus* contaminés en MP environnementaux (10 µg/L, 100 µg/L) par le biais de consommation de proies (*S. plana*) préalablement enrichies en MP (100 µg/L) ou par voie directe (balnéation) sur deux périodes (7 jours et 14 jours, contaminations sub-chroniques, 10 et 100 µg/L). En parallèle, une modélisation mathématique de la bioaccumulation a été entreprise, avec mon co-encadrant Alexandre Popier (Laboratoire de Mathématiques du Mans, LMM ; Le Mans Université), en comparant nos données de transfert de MP entre *P. marmoratus* (crabe) et *Scrobicularia plana* (bivalve) avec celles disponibles dans la littérature impliquant le modèle trophique *Necora puber* (crabe) et *Mytilus edulis* (bivalve).

II - Matériel et Méthode

II – a) Récupération des organismes

Les *Scrobicularia plana* ont été échantillonnées le 26 Janvier 2023 au Port du collet (sortie d'estuaire), localisé dans la baie de Bourgneuf (Loire Atlantique, 44). Le coefficient de la marée était de 90, permettant de récupérer les échantillons vivants dans le sédiment sableux. Au total, 89 individus ont été ramenés et acclimatés pendant une semaine. La température a été réglée sur 15 degrés avec une photopériode de 12/12, de 7 heures à 19 heures. L'eau, préparée en amont pour être également à 15°C, avec une salinité de 25 g/L. Ces conditions standardisées se rapprochent de celles observées dans le milieu naturel en période printanière.

Les *Pachygrapsus marmoratus* ont été récupérés le 11 Avril 2023 à Noirmoutier (Vendée 85), précisément au Vieil (coefficient : 63). Dans un milieu rocheux et sableux en médio- et infralittoral, une soixantaine de crabes ont été capturés. Dès la première semaine dédiée à l'acclimatation, les paramètres de l'expérimentation ont été fixés à 34 g/L de salinité avec une température de 18 °C et une photopériode de 14/10.

*II – b) Contamination du modèle proie : *Scrobicularia plana* (bivalve)*

Les individus contaminés par filtration à 100 µg MP/L et ceux contrôles, ont été disposés dans trois cristallisoirs (contenance par cristallisoir : 3 litres). Au moins 15 individus ont été répartis de façon homogène dans chaque cristallisoir. Le bullage a été assuré par la mise en place d'une pompe pour chaque cristallisoir. L'arrivée d'oxygène a été dédoublée par le biais de deux tubes en plastique et prolongés de pipettes en verre pour limiter le contact entre l'eau des cristallisoirs et du plastique.

L'eau (25 g/L et 15 °C) a été renouvelée deux fois par semaine, le lundi et jeudi. Les individus ont été alimentés chaque jeudi avec des microalgues (*Tetraselmis* spp) à une concentration de 70 000 cellules/individu/litre d'eau (Métais et al., 2023⁵³).

Après 21 jours d'exposition en continu, chaque individu a été pesé en entier puis uniquement leurs tissus mous. Pour chaque condition, 6 scrobiculaires ont été réservées pour l'étude de la bioaccumulation tandis que les 37 autres ont été broyées dans un mortier en vue d'homogénéiser les tissus car la distribution et la bioaccumulation sont possiblement tissu-dépendants (Wang et al., 2021³⁷). Seuls deux individus sont morts au cours de l'expérimentation.

II – c) Contamination du modèle prédateur

1/ Contamination par voie trophique

Les crabes ont été distribués de façon homogène (6 crabes/condition) dans les aquariums contenant un volume de 10 litres. L'eau a été changée deux fois par semaine ; le mardi et le vendredi. Chaque bulleur (un appareil par bac), assurant l'arrivée en oxygène, a été prolongé par des pipettes en verre afin de minimiser l'arrivée de plastiques dans les aquariums (**Figure 1**). Faisant preuve d'une certaine agressivité intraspécifique, les crabes ont été séparés par des grilles en fer. Ils ont été alimentés avec des tissus de

scrobiculaires. Trois fois par semaine, des portions congelées ont été coupées et pesées, de façon à homogénéiser les portions transmises à chaque crabe (572,7 mg de poids moyen, divisés en trois portions). Un gavage a permis de permettre une consommation complète des portions décongelées. Selon l'appétit, les crabes ont été nourris avec le poids moyen d'une scrobiculaire au cours de la première semaine, puis de deux scrobiculaires au cours de la seconde. Chaque jour, hormis le week-end, les fèces ont été récupérés pendant cinq minutes avec un siphon pour limiter une recontamination par coprophagie.

2/ Contamination par voie directe (balnéation)

Dans le cas de l'exposition directe, cinq crabes par condition (contrôle, 10 MP/L, 100 MP/L) ont été nourris les jours de changement d'eau avec du tissu de sardine. Les individus les plus agressifs ont été encagés dans des boîtes grillagées individuelles en métal pour limiter le comportement cannibalisme.

À la fin de la première semaine (J7) puis de la seconde (J14), les individus ont été disséqués. Après avoir mesuré la longueur et la largeur de la carapace, le tissu digestif et les branchies ont été pesés. Dans le cas des individus de 14 jours pour les deux types d'exposition (trophique et balnéation), l'hémolymph a été prélevée en piquant au niveau de la jonction céphalothorax/abdomen ou dans la patte avec une seringue à insuline (0,5x16 mm). De 60 à 160 microlitres ont été prélevés.

II – d) Préparation des microplastiques

Pour la solution de microplastique mère, une concentration de 1 g/L a été préparée en amont puis conservée au frigo pour limiter la photodégradation. Le volume total étant de trois litres pour 15 scrobiculaires, 300 µl de la solution mère ont été pipettés puis versés dans les trois cristallisoirs de la condition contaminée. La dilution revient donc à une exposition de 100 µg/L.

II – e) Mesure de la contamination

Les tissus récupérés ont été conservés au congélateur, puis digérés dans une solution d'hydroxyde de potassium dilué à 10 %. Pendant 24h, les tissus plongés dans le KOH ont été chauffés à 50 degrés et agités. Pour limiter la contamination atmosphérique, un verre de montre a été déposé sur le bêcher. Le jour suivant, le milieu digéré a été récupéré sur un filtre en fibre de cellulose. Au microscope (x400), le nombre, la longueur, la largeur, la forme et la couleur des microplastiques ont été relevés (protocole appliqué : Thiele et al., 2019⁵⁴).

Dans le cas des scrobiculaires, six individus par condition ont été entièrement digérés. Pour le crabe marbré, deux tubes digestifs complets par condition ont été récupérés pour estimer la bioaccumulation, les autres individus étant réservés pour les analyses biologiques. Les conditions expérimentales sont résumées dans la **Figure 1**.

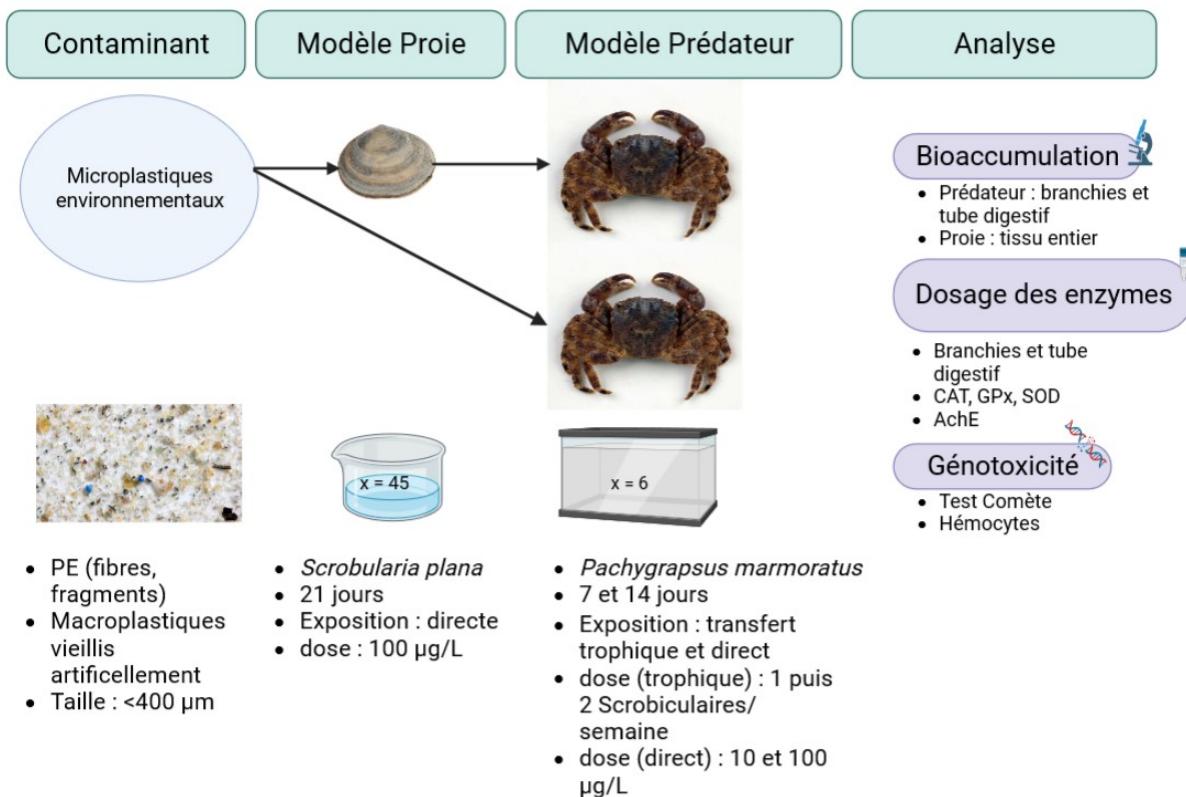


Figure 1 : Plan expérimental du transfert trophique avec pour modèle proie-prédateur (la scrobiculaire et le crabe marbré). Les conditions expérimentales pour chaque espèce sont indiquées sous l'organisme correspondant.

II – f) Le dosage des enzymes du système antioxydant

Le dosage enzymatique permet de déterminer la production réelle et différentielle des protéines selon les conditions. Pour cette raison, le dosage d'enzymes dans les branchies et le tube digestif pour chaque individu de l'ensemble des lots a été fait par spectrophotométrie.

Le dosage des protéines totales a été effectué par la méthode de Lowry et al. (1951⁵⁵). Suite au broyage à l'azote liquide et la centrifugation des tissus, le surnageant correspondant au cytosol a été conservé dans du TBS au congélateur à -80 °C. Le réactif de Folin, réagissant avec les acides aminés, produit un complexe de coloration bleue visible à 700 nm. En utilisant une courbe de BSA (*Bovine Serum Albumine*), la concentration protéique a été estimée pour chaque tissu ; ceci est nécessaire pour déterminer la concentration des dosages protéiques.

Les diverses enzymes antioxydantes abordées lors de cette étude ont été : la catalase (CAT), la Glutathion Peroxydase (GPx) et la Superoxyde Dismutase (SOD).

La Superoxyde Dismutase (SOD) transforme l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le mélange de riboflavine, de méthionine et de tert-butylamine produit une coloration bleue dont l'absorbance est lisible à 560 mn. Elle correspond à la mesure indirecte de SOD.

La Catalase (CAT), ayant pour rôle de transformer deux molécules d'H₂O₂ en dioxygène, est complémentaire et fonctionne suite à l'action de la SOD. Sa mesure directe à 240 nm consiste à estimer

l'absorbance différentielle dans un intervalle de temps lors de l'ajout d' H_2O_2 avec lequel il y a une réaction.

La Glutathion Peroxydase (GPx), assure le même rôle que la CAT, réagissant avec l' H_2O_2 . Elle utilise le processus de réduction du GSH en GSSG afin de former des molécules d'eau. Son activité a été mesurée à 412 nm, par le biais de l'estimation du taux de GSH transformé par rapport à un contrôle au sein duquel il n'y a aucune réaction enzymatique.

II – g) Le dosage des acétylcholinestérases comme marqueur de neurotoxicité

L'analyse de la littérature indique que des potentiels effets neurotoxiques peuvent s'observer lors de l'exposition d'animaux aux microplastiques par voie alimentaire, notamment par l'inhibition de la dopamine (Yu et al., 2022⁵⁶). Nous avons donc entrepris d'évaluer la neurotoxicité par un marqueur majeur du système nerveux : l'acétylcholinestérase (AchE). Dans le cas de l'AchE, la dégradation de l'acétylcholine en thiolcholine permet, par réaction de cette dernière avec le DTNB, de produire une coloration jaune mesurable 405 nm (application du protocole indiqué par Ellman et al., 1961⁵⁷).

II – h) Le test de génotoxicité : le test Comète

Après récupération de l'hémolymphe, la viabilité et la concentration des hémocytes a été mesurée. Ces derniers sont déposés sur gel d'agarose et lysées au détergent durant la nuit. Les lames contenant les dépôts de cellules ont été placées dans une cuve d'électrophorèse réglée à 300 milliampères pendant dix minutes (application des protocoles indiqués par Sahlmann et al., 2017⁵⁸; Akcha et al., 2003⁵⁹). En tant qu'intercalant à l'ADN, le bromure d'éthidium (BET) a permis de mesurer le pourcentage de queue de comète sur le logiciel *Komet3*.

II – g) Analyses statistiques

La normalité de distribution des données et de leurs résidus ainsi que l'homogénéité des variances ont été vérifiés avec un test de Shapiro-Wilk et le test de Barlett. Si les conditions sont réunies, une Anova à un facteur a été opérée, suivie d'un test de Tukey en cas de significativité. Dans le cas contraire, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé. Lorsque celui-ci était significatif, un test post-hoc de Dunnett a été fait afin de réaliser des comparaisons multiples. À l'exception de la SOD, les analyses seront non paramétriques.

III - Résultats

III – a) Morphométrie

Pour l'ensemble des lots constitués pour les expérimentations, les crabes et les scrobiculaires n'ont présenté aucune différence significative de taille et de poids entre les différentes conditions.

III – b) Caractéristiques des microplastiques

Le pourcentage des additifs liés aux microplastiques environnementaux utilisés sont de 14 % de métaux traces (Cadmium, Cuivre, Plomb et Zinc), 4 % d'HAPs 2 % d'alkylphénols ainsi que 80 % de phtalates (**Figure 2**). Pas moins de 60 % de ces derniers correspondaient au phtalate de dibutyle (DBP), dosés à 126,6 µg/g de microplastiques.

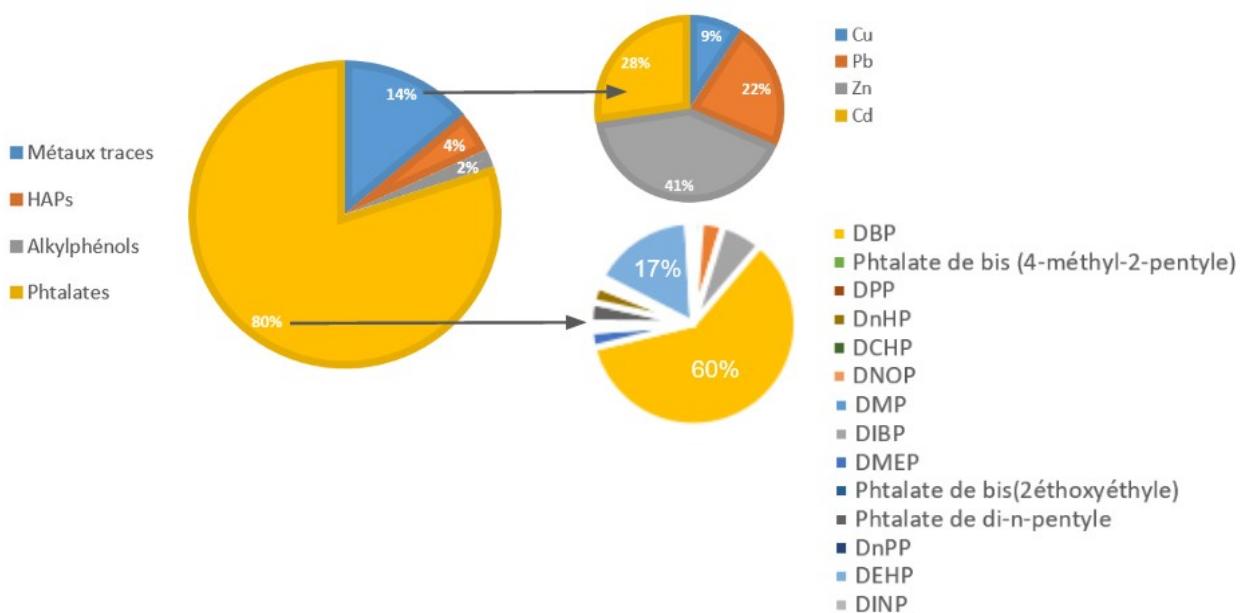


Figure 2 : Pourcentage d'additifs dans les microplastiques utilisés pour les expositions trophique et directe.

III – c) Mesure de la contamination

La mesure de la bioaccumulation par lecture de filtre a montré une présence de microfibres, parfois enchevêtrées (**Figure 3**). Les valeurs de contamination pour chaque individu ont été renseignées sur la **Figure 4**.

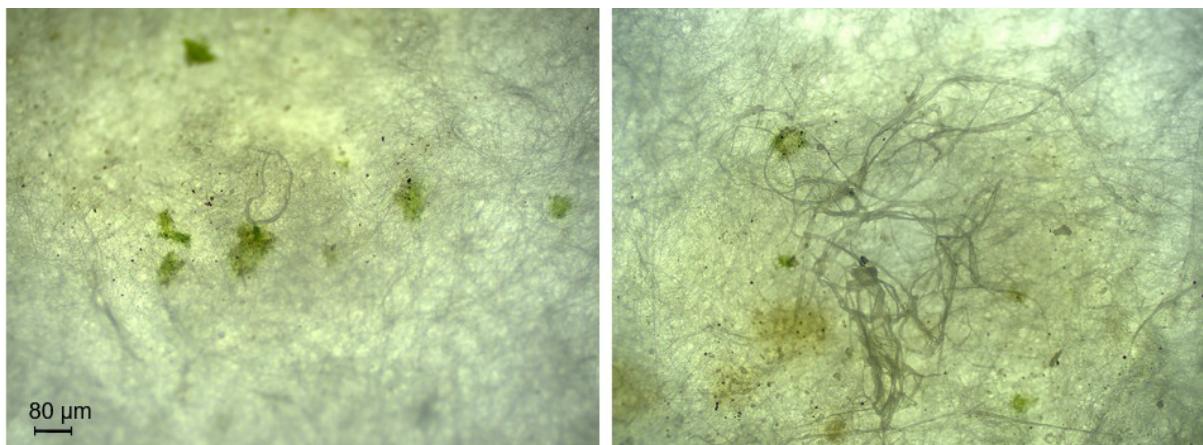


Figure 3 : Photographies de fibres transparentes de microplastiques bioaccumulées dans les tissus de scrobiculaires contaminées, prises avec le logiciel Focus (microscope x400).

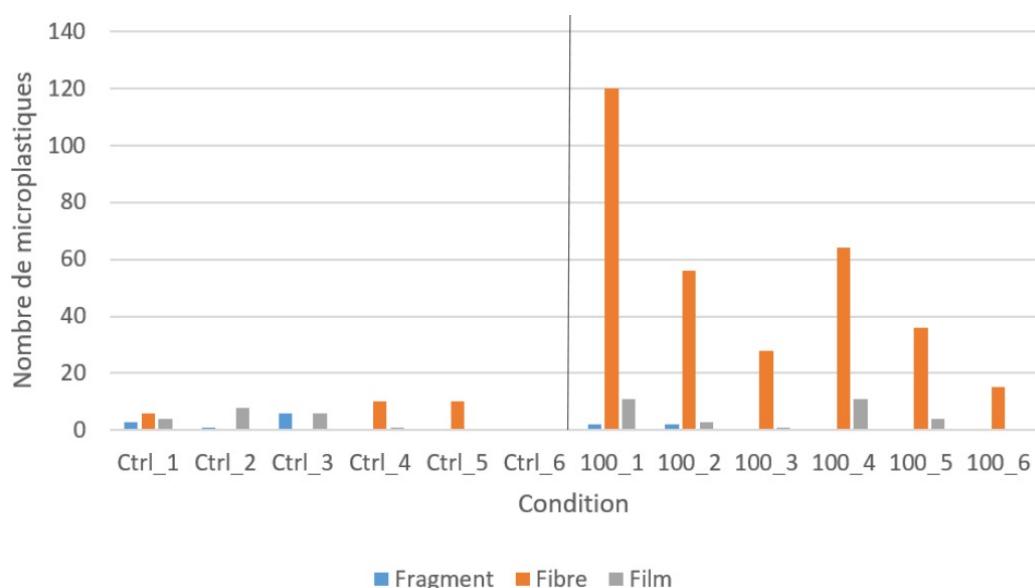


Figure 4 : Mesure de la bioaccumulation des six scrobiculaires par condition (Contrôle et 100 µg/L). Le nombre et la forme des microplastiques ont été reportés pour chaque individu.

III – d) Le dosage des enzymes du système antioxydant

Pour l'exposition directe aux microplastiques, des différences significatives de l'activité SOD ont été mesurées dans la majorité des cas entre les branchies et le tube digestif. Il y a donc un effet tissu dépendant. Une réduction significative de l'activité SOD par rapport à la condition contrôle a été mesurée au bout de 14 jours (J14) pour la dose de 10 µg/L, dans le tube digestif (**Figure 5**). Une tendance à la réduction (non significative) a été observée pour les individus exposés à 100 µg/L au bout de 14 jours. Le même schéma est observé pour les branchies au bout de 14 jours.

Pour l'exposition trophique, seule l'activité GPx pour les crabes contaminés montre une différence significative par rapport au contrôle. Plus précisément, l'effet a été mesuré au bout de 7 jours (J7) dans les branchies (**Figure 6**). Cette augmentation significative ne se prolonge pas à 14 jours. Une légère tendance à l'augmentation de la GPx est observée pour le tube digestif au bout de 14 jours.

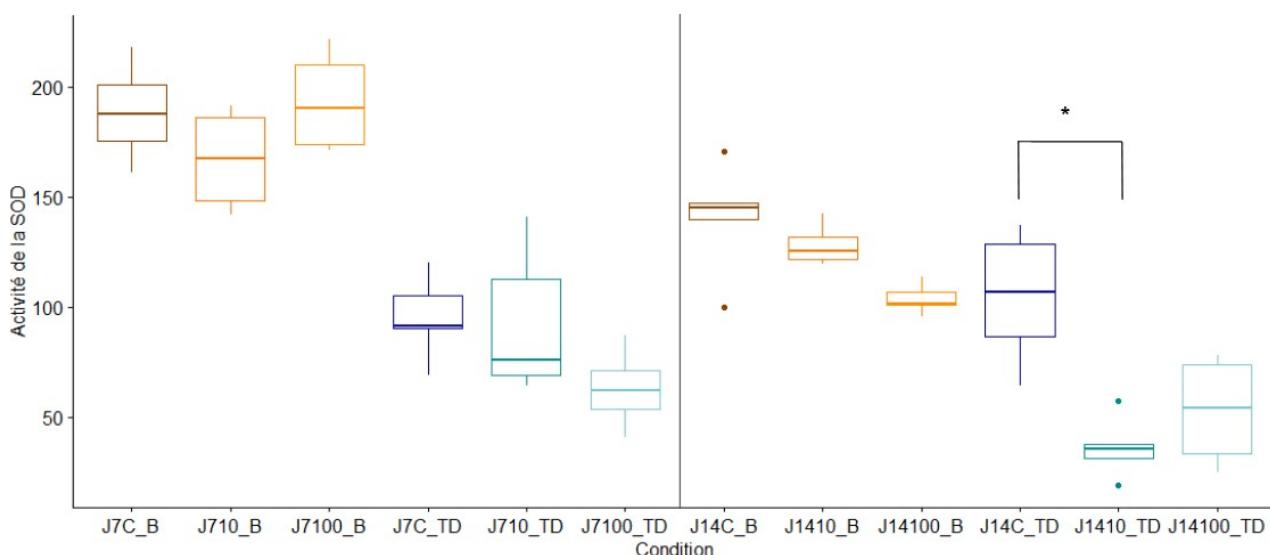


Figure 5 : Activité de la SOD (U/mg protéines) dans les branchies (B, en orange) et le tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie directe (10 ou 100 µg/L), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours. N = 4 individus par condition pour J7 et 5 pour J14.

III – e) Le dosage des acétylcholinestérases

Pour l'AchE, le biomarqueur de neurotoxicité, les analyses statistiques ne sont pas significatives pour les deux modes de contaminations. Dans le cas de l'exposition trophique, seule une tendance à l'induction de l'activité de l'AchE est remarquable pour le tube digestif au bout de 7 jours (**Figure 7**). Les figures pour les autres résultats du dosage d'enzymes ont été placées en annexe. Une différence significative tissu dépendant est de nouveau observée à J14 pour l'activité de l'AchE entre les branchies et le tube digestif.

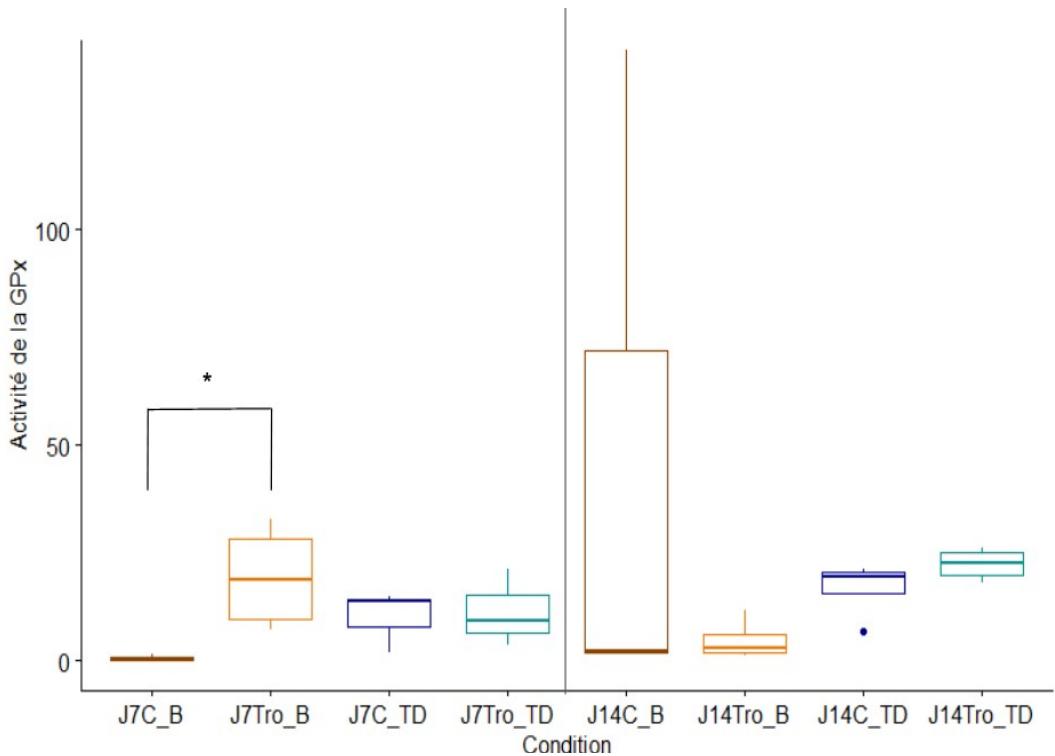


Figure 6 : Activité de la GPx ($\mu\text{moles/min}$ de protéines) dans les branchies (B, en orange) et le tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie trophique (Tro), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours. N = 4 individus par condition.

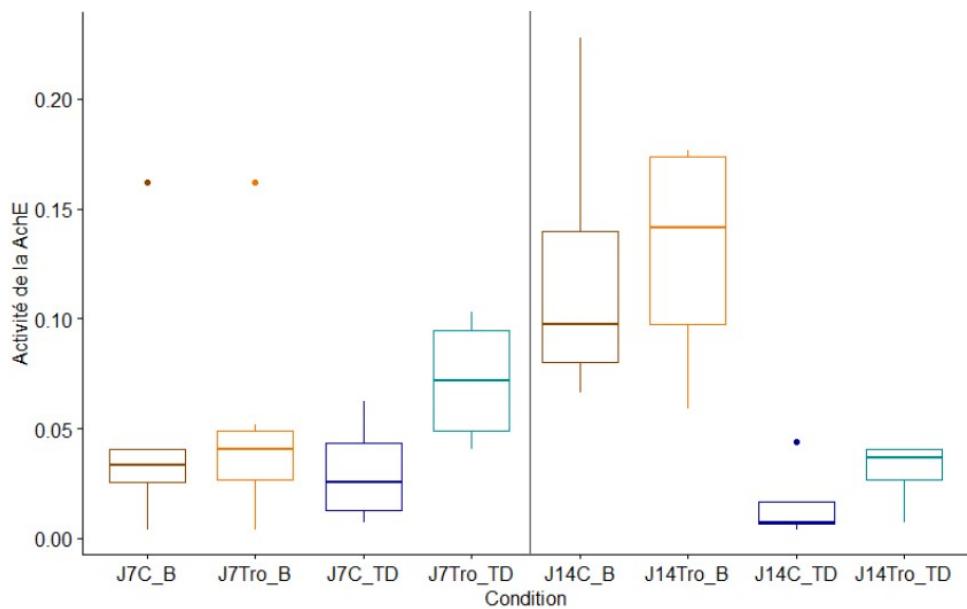


Figure 7 : Activité de l’AchE (U/mg de protéines) dans les branchies (B, en orange) et le tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie trophique (Tro), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours. N = 4 individus par condition.

III-f) Le test de génotoxicité : le test Comète

Le test comète, rendant compte de la génotoxicité potentielle des MP dans l'hémolymphé, a été effectué pour les crabes exposés par voie trophique ou directe au bout de 14 jours de contamination (**Figure 8**). Aucune différence significative n'a été relevée dans le cas de l'exposition trophique, tandis qu'il y a une augmentation significative du pourcentage de queue de comète pour l'exposition directe de 10 µg/L par rapport au contrôle.

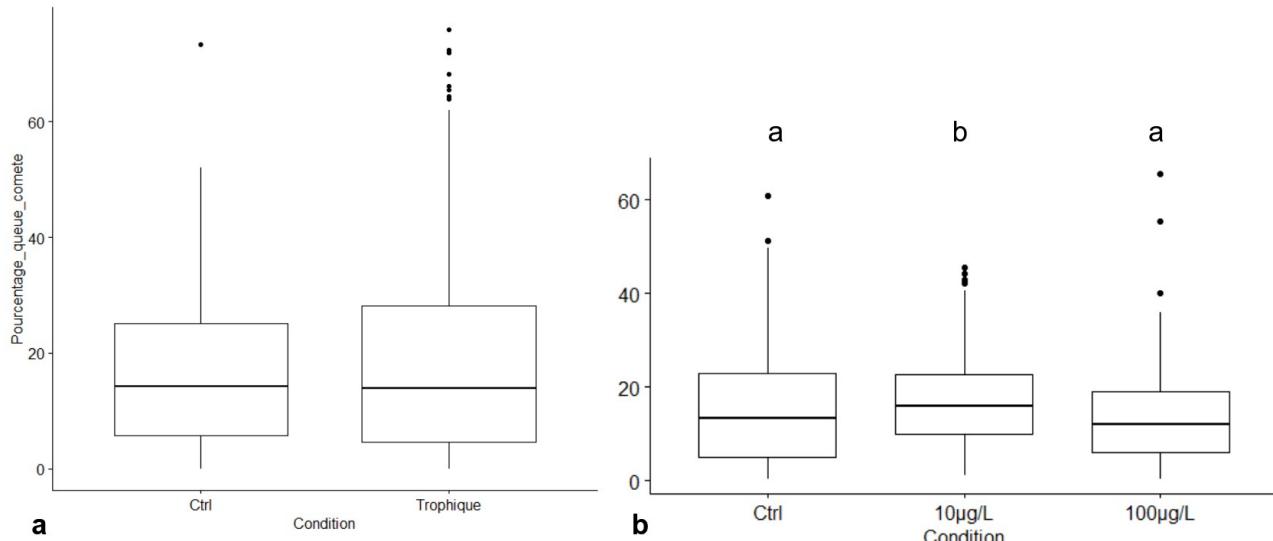


Figure 8 : Pourcentage de queue de Comète (génotoxicité) des hémocytes en fonction de chaque condition pour l'exposition trophique (**a**) et directe (**b**). Pour l'exposition trophique, le nombre d'individus est de 4, avec un total de 229 cellules pour le contrôle et de 300 pour la condition trophique. Pour l'exposition directe, n = 4 pour le contrôle (261 cellules), n = 5 pour 10 µg MP/L (169 cellules) et n = 2 pour 100 µg MP/L (200 cellules).

IV - Discussion

L'objectif de ce stage était d'évaluer les effets d'une contamination du crabe *P. marmoratus* en MP environnementaux par voies directe (10 et 100 µg/L) et trophique (consommation de proies *S. plana* préalablement contaminés) sur deux périodes de 7 jours et 14 jours.

IV – a) Étude de la contamination en microplastiques

1/ Contamination aux microplastiques

L'analyse de bioaccumulation des scrobiculaires contaminées par voie directe rend compte d'une forte présence de fibres, puis de fragments et de très peu de films. De la contamination naturelle a été non seulement remarquée par la présence de particules de couleurs vert, rouge ou orange dans les filtres contenant seulement la solution de KOH voire dans les individus non contaminés. La contamination en microplastiques est planétaire, si bien qu'il est possible d'en trouver dans l'eau courante et dans l'air (Zhang et al., 2020⁶⁰). Ainsi, malgré les nombreuses précautions prises lors de nos expériences, une part de bioaccumulation « parasite » (récupération de MP probablement aériens) n'a pu être évitée.

2/ Sélection des microplastiques ingérés par la Scrobiculaire

Les MP de PE (inférieurs à 400 µm de diamètre) étaient majoritairement composés de petits fragments et de fibres transparentes ou bleues. Par consommation entière des portions, le crabe ne peut effectuer une sélection des MP. Les bivalves, en revanche, par leur mode d'alimentation par filtration, peuvent opérer une bioaccumulation sélective selon la taille et la forme des MP. La quantité et la taille d'ingestion varient selon le taux de filtration et la taille du modèle bivalve, comme le montre l'étude de Ward (2019⁶¹) ciblée sur la moule bleue (*M. edulis*) et l'huître américaine (*Crassostreas virginica*). L'huître absorberait davantage de fibres, mais aurait plus de mal à évacuer les plus grandes (75-1075 µm, exposées pendant 2 heures) via les pseudofécès. Lors des analyses de scrobiculaires contaminées, des enchevêtements de grandes fibres ont été remarquées. Celles-ci pourraient potentiellement ralentir leur avancée dans le tractus digestif et limiter leur excrétion. La contamination du modèle prédateur (crabe marbré) serait de ce fait conditionnée par la capacité d'absorption des MP par la proie (bivalve, filtreur).

3/ Fragmentation des microplastiques

L'analyse complète de bioaccumulation des crabes marbrés n'a pu être achevée dans les temps impartis du stage. Cependant, l'analyse des premiers échantillons démontre une présence moins importante de grandes fibres. Plusieurs études indiquent le rôle des crustacés benthiques dans la fragmentation des microplastiques ingérés dans l'environnement. La langoustine (*Nephrops norvegicus*) aurait dans son tube digestif des tailles de microplastiques significativement inférieures à celles identifiées dans son milieu, suggérant une fragmentation dans le tractus digestif (Cau et al., 2020⁶²). De la même manière, il a été démontré que le krill d'Antarctique (*Euphausia superba*), exposée à des microplastiques de 31,5 µm, excrétrait des MP inférieurs à 1 µm (Dawson et al., 2018⁶³).

4/ Améliorer la mesure de bioaccumulation de microplastiques

Tout d'abord, l'identification des MP au microscope ne permet pas de prendre en compte les microplastiques inférieurs à 6 µm, ce qui peut biaiser le comptage. Une autre méthode plus précise que le dénombrement sous microscope est la méthode FTIR (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier). Elle permet d'identifier et de qualifier la composition des microplastiques supérieurs à un diamètre de 0,2 µm par spectroscopie infrarouge (Corami et al., 2020⁶⁵). Cependant, cette méthode présentant aussi des biais d'analyses (mauvaise lecture des fibres fines), pouvant fausser l'analyse quantitative. Coupler les deux méthodes permettrait d'obtenir des résultats plus précis. Afin de s'affranchir de ces difficultés d'identification et de comptage des MPs, les études de bioaccumulation de MP mentionnées dans la littérature utilisent généralement des microsphères fluorescentes commerciales, permettant un comptage simplifié. Toutefois, ces microsphères ne sont pas représentatives des MP majoritairement présents dans l'environnement.

IV – b) Exposition des crabes par voies directe et trophique : le stress oxydant

1/ Effets des microplastiques

Lors de la mesure des réponses antioxydantes, des différences significatives ont été observées entre les tissus (branchies / tube digestif). Pour les expositions directe et trophique, les branchies ont (par rapport au tube digestif) une activité plus importante pour la SOD, moins importante pour la CAT et la GPx. Dans le cas de l'exposition directe, une réduction significative de l'activité de la SOD a été démontrée à 10 µg/L au bout de 14 jours dans le tube digestif. Dans le cas de l'exposition trophique, une induction est observée dans les branchies des crabes contaminés au bout de 7 jours. Il a aussi été remarqué une tendance non significative à l'induction de l'activité de la SOD et de la CAT vis-à-vis du contrôle.

Il a été démontré que l'exposition trophique à des microsphères de PE sur des crevettes juvéniles *Macrobrachium rosenbergii* (1 à 10mg/g de nourriture pendant 6 jours) a provoqué l'induction de l'activité de la GPx, de façon dose-dépendante (Jaikumar et al., 2020⁶⁶). Le crabe chinois (*Eriocheir chinensis*), quant à lui, exposé par voie directe à des microsphères de PS pendant 21 jours, a réagi par une induction du système antioxydant à faible dose (40 et 400 µg/L) et son inhibition à forte dose (4000 et 40000 µg MP/L), (Yu et al., 2018⁶⁷). Ainsi, l'effet des microplastiques semblent dépendre de la dose, de leurs caractéristiques et du modèle animal.

2/ Effets des polluants

Les effets toxiques observés peuvent également être liés aux additifs présents sur les plastiques. Par l'action des paramètres physico-chimiques du tube digestif, les polluants peuvent être dissociés du support plastique et devenir biodisponibles pour l'organisme. Il a été démontré que le poisson-zèbre (*Danio rerio*), après avoir consommé des larves d'artémias, a ingéré des microsphères contenant du Benzo[a]pyrène. Ce dernier s'est ensuite détaché de son support (Batel et al., 2016⁶⁴). Cette libération a provoqué l'activation du système EROD et du CYP1A dans le foie, démontrant ainsi une absorption de HAP par l'épithélium intestinal et une distribution par le système circulatoire.

D'après les analyses de composition des MP utilisés dans notre étude, plusieurs classes de polluants ont été reportées, à savoir des phtalates, des HAP et des métaux traces. Plus particulièrement, une nette

dominance du phtalate de dibutyle (DBP) est observé (126,6 µg/g de microplastiques). Celui-ci est reconnu pour avoir un comportement de perturbateur endocrinien (van Wezel et al., 2000⁶⁸). Il a aussi été démontré que le crabe bleu japonais (*Portunus trituberculatus*) pouvait le bioaccumuler (He et al., 2022⁶⁹). Des néonates et des adultes de *Daphnia magna* (crustacé, Branchiopode) ont été exposés pendant 24 et 48 h à des doses de DBP (3,48 mg/L, 4,92 mg/L), provoquant à plus faible concentration une réduction de l'activité SOD et son induction à plus forte concentration (Shen et al., 2019⁷⁰). En revanche, l'activité de la CAT a été diminuée à la fois chez les adultes et les jeunes. L'effet varie au cours du temps et selon la dose.

À l'inverse, la présence de métaux traces aurait tendance à induire une activation du système antioxydant. Une des études environnementales (lagon de Óbidos, Portugal) sur le crabe vert (*Carcinus maenas*) a démontré une augmentation de l'activité de la CAT et de la GPx dans son hépatopancréas (Pereira et al., 2009⁷¹).

En raison de cet assemblage de polluants dans les microplastiques, un effet cocktail peut être envisagé. Une étude de contamination des scrobiculaires a été faite avec les même MP environnementaux que ceux testés dans notre étude (Métais et al., 2023⁵³) à des doses comparables (0,008, 10 et 100 µg/L) pendant 7 puis 21 jours. Dans cette étude, l'activité de la CAT ne semble pas avoir été modulée dans le tube digestif à 7 et 21 jours, quelle que soit la dose. Au contraire, elle a été augmentée dans les branchies pour la dose de 100 µg/L au bout de 21 jours. Dans le cas de la GPx, une réduction de son activité a été reportée dans le tube digestif et les branchies au bout de 7 et 21 jours, à la dose de 0,008 µg/L.

Dans le cas de notre étude lors de l'exposition directe pour les crabes marbrés, il est d'abord possible qu'il y ait eu l'ingestion de microplastiques qui seraient entrés dans le tube digestif. Comme cité précédemment, les paramètres physico-chimiques ont pu provoquer la libération de ces contaminants (surtout composés de DBP) qui auraient induit une modulation de l'activité de la SOD.

Lors de l'exposition trophique, l'induction de la GPx dans les branchies au bout de 7 jours pourrait être expliquée par l'ingestion de MP qui seraient ensuite excrétés via les fèces (malgré les nettoyages journaliers), les rendant biodisponibles par ventilation. Dans l'étude de Gray & Weinsteins. (2017⁷²), des crevettes (*Palaemonetes pugio*) ont été exposées à différentes tailles de microplastiques (de 34 à 93 µm pour les fibres et les fragments, à 50 000 particules/L). Il a été observé de la mortalité, suggérant des ingestions, excrétions et contaminations par ventilation, le tout provoquant des effets délétères.

Pour compléter les données et mieux comprendre le mécanisme de toxicité, il serait intéressant de faire un suivi éventuel de la présence de ROS et de quantifier l'expression de gène des enzymes antioxydantes.

IV – c) Exposition des crabes par voies directe et trophique : la neurotoxicité

I/ Effets des microplastiques

L'activité de l'acétylcholinestérase n'a montré aucun effet significatif par rapport aux contrôles pour les deux expérimentations. Une tendance à l'augmentation de l'activité de l'AchE a été remarquée dans le tube digestif des crabes contaminés par voie trophique au bout de 7 jours. Dans la littérature, des études de

transfert trophique de microplastiques (0.1 particules de PE de 40 µm par mg de nourriture) ont démontré une hyperactivité du système cholinergique chez le poisson-zèbre au bout de 7 jours (Yu et al., 2022⁵⁶). Dans le cas du crabe des mangroves (*Charybdis japonica*), une alimentation quotidienne (dose : 3 % de leur poids) de moules contaminées (microosphère PS, 5 µm) a provoqué une réduction de l'AchE au bout de 7 jours (Wang et al 2021³⁷).

La sélection du modèle animal, le type, la forme et la taille des MP choisis pourraient ainsi expliquer la variation des réponses neurotoxiques au sein des études.

2/ Effets des polluants

Le DBP (0,17 à 1,42 mg/L) a provoqué chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) une modulation de l'activité de l'AchE au bout de 15 jours. Le DBP s'est révélé avoir une action temps-dépendant (Yuan et al 2022⁷³). Parmi les métaux traces, le zinc est trouvé en grande majorité (4 mg/g MP). Celui-ci provoquerait une inhibition de l'AchE chez une crevette d'eau douce (*Atyaephyra desmarestii*) après 48 heures d'exposition à 0,13 mg/L (Quintaneiro et al., 2014⁷⁴). Ces ensembles de polluants aux multiples effets pourraient en partie expliquer la difficulté de percevoir les effets des MP environnementaux dans le cas de nos expositions.

IV – c) Exposition des crabes par voies directe et trophique : la génotoxicité

1/ Effets des microplastiques

Le test comète n'a révélé aucun effet génotoxique des hémocytes des crabes marbrés exposés par voie trophique. Malgré la bioaccumulation effective des MP par les scrobiculaires, le manque de significativité pourrait être en grande partie expliqué par un délai trop court d'exposition et l'ingestion insuffisante des portions contaminées. L'exposition directe a démontré de la génotoxicité au bout de 14 jours, seulement pour les individus à 10 µg/L, tandis qu'une tendance est observée pour les individus à 100 µg/L.

Une étude d'exposition de microplastiques de PE seuls (10^{12} particules/m³) ou associés à du pyrène pendant 15 jours a révélé de la génotoxicité dans les érythrocytes chez le poisson-zèbre (Araújo et al., 2022⁷⁵). Les deux types de microplastiques auraient un effet toxique comparable, démontrant que les MP sans polluant peuvent être génotoxiques au même titre que les MP contenant des HAP.

2/ Effets des polluants

Parmi les polluants pouvant expliquer les résultats significatifs obtenus, la participation du DBP est à privilégier. Une exposition de 0,08 à 2 mg/L de DBP pendant 28 jours a provoqué de la génotoxicité et de l'apoptose dans le cerveau du poisson-zèbre (Jiang et al., 2022⁷⁶). Dans le cas de cocktail de polluants, l'exposition avec les mêmes MP environnementaux chez la scrobiculaire a engendré des effets de génotoxicité à 0,008 et 10 µg/L dans l'hépatopancréas du bivalve au bout de 21 jours. Comparable à nos résultats, aucune différence significative n'a été obtenue quant à l'exposition à 100 µg/L (Métais et al., 2023⁵³).

Comme il a été dit précédemment, des microplastiques ont pu être ingérés et libérés dans le tube digestif des additifs (tels que les phtalates) et contaminants (les métaux traces) absorbés. Leurs présences

dans l'hémolymphé auraient alors pu induire de la génotoxicité chez les hémocytes. Deux hypothèses peuvent expliquer le résultat non significatif pour les individus exposés à 100 µg/L : soit les MP (dont l'effet ne dépendait pas seulement de la dose) n'ont pas engendré de génotoxicité chez ces individus, soit la toxicité est telle que les hémocytes endommagés seraient déjà entrés en apoptose. Cela pourrait être vérifié par une évaluation de l'expression de divers éléments des voies apoptotiques (Bcl2 ou les caspases). Une étude sur la contamination de corbicule (*Corbicula fluminea*) aux nanoplastiques (1000 µg/L, 48h), aurait émis l'hypothèse d'une tendance d'agrégation des nanoplastiques présents en forte concentration (Baudrimont et al., 2020⁷⁷). Par cette observation, il est aussi possible de proposer cette hypothèse dans le cas des microplastiques dans la condition de 100 µg/L : leur forte concentration permet leur agrégation, les rendant moins biodisponibles pour les scrobiculaires et les crabes. Cet état diminuerait donc les capacités à induire des effets génotoxiques. Procéder à une mesure de l'apoptose dans les tissus des crabes et l'examen de l'état agrégé ou non des MP permettrait de définir la véracité de ces hypothèses.

IV – d) Intérêts de cette étude en écotoxicologie aquatique

Les études de contaminations environnementales révèlent une bioaccumulation sur différents taxons, majoritairement de fibres, fragments voire de films (Latchere et al., 2021⁷⁸). Les sphères restent minoritaires. Pourtant, les études d'exposition en laboratoire ont souvent recours à des sphères de PP et PE, la plupart du temps sans additif. Dans ces études, les MP sont très souvent parfaitement calibrés (taille et forme) tandis que l'on trouve une grande diversité de taille et de forme dans les milieux aquatiques. D'autres études font des co-expositions de MP et un seul type de polluant, sans que ce dernier ne soit associé aux MP. Les études utilisant des doses représentatives et des plastiques environnementaux ne sont pas assez nombreuses mais compléteraient les données actuelles pour mieux simuler et comprendre les conditions réelles.

Comparer les résultats de l'exposition trophique n'est pas aisné. Il existe peu d'études de transfert de MP avec le modèle bivalve-crabe. Les doses et le temps d'exposition des proies (*M. edulis*) ne sont pas standardisés, tout comme le nombre de portions ingérées par les prédateurs, les tissus ciblés pour la bioaccumulation et le temps attendu avant l'analyse (Farrel & Nelson, 2013³⁵ ; Crooks et al., 2019⁷⁹ ; Wang et al., 2021³⁷). De plus, la taille et le type de MP (micropshères) ne sont pas représentatifs. Citée précédemment, l'étude de Wang sur le transfert trophique (bivalve / crabe) a démontré l'intérêt de combiner l'effet de la contamination par voie alimentaire et directe. La condition couplant les deux voies s'est avérée être significativement plus neurotoxique et hépatotoxique que les expositions directe et trophique séparées.

Dans le cas de l'exposition directe des crabes marbrés (*P. marmoratus*), du cannibalisme n'a pu être contrôlé malgré les précautions mises en place (encagement). Il est possible que les individus se soient relativement contaminés par consommation de chair de crabe. Le nombre d'individus, initialement prévu à huit, a été réduit à cinq (J7) et six (J14). Cela a pu contribuer à de la variabilité inter-individuelle (écart-types importants), et a potentiellement masqué des effets. En vue de faire d'autres études d'effets plus approfondies des microplastiques, *P. marmoratus* reste un modèle robuste et d'intérêt, mais qui nécessiterait quelques recommandations : séparer les individus avec du grillage, préférer des bacs avec une grande surface (50x25 cm pour quatre individus) et les nourrir trois fois par semaine.

V - Conclusion et perspectives

L'étude du transfert trophique proie / prédateur avec nos deux modèles *S. plana* / *P. marmoratus* auraient nécessité une exposition plus longue, permettant davantage de consommation de tissus et de mieux comprendre des effets sur le moyen ou long terme. D'autres biomarqueurs pourraient être ajoutés aux études, tels que le dosage de ROS, la mesure du taux d'expression de gènes et la mesure de l'apoptose. Les résultats des expositions, dont l'effet global est difficile à estimer, sont potentiellement dues à la résistance du modèle et à la mixture d'additifs et de contaminants couplés aux microplastiques. Cependant, à dose environnementale (estuaire : 10 µg/L), il y aurait une libération de contaminants dans le tube digestif et leur distribution dans l'hémolymphe, qui provoqueraient non seulement de la génotoxicité mais une réduction de l'activité de la SOD. Si l'étude de transfert trophique n'a pu clairement démontrer un effet毒ique clair lors de l'ingestion de microplastiques environnementaux, l'étude directe a quant à elle prouvé une réponse relativement précoce avec des effets irréversibles (génotoxicité) et une modulation temporaire du système antioxydant chez le crabe marbré en dépit de sa robustesse.

Pour compléter ces analyses, l'étude de l'expression des gènes des enzymes antioxydantes est en cours ainsi que la finalisation de l'étude de la bioaccumulation des crabes. Également, à l'aide des données générées par cette étude et par les publications disponibles, une collaboration avec le mathématicien Alexandre Popier (Laboratoire de Mathématiques du Mans, LMM ; Le Mans Université) permettra d'améliorer la modélisation du transfert trophique des microplastiques entre le modèle bivalve / crabe.

Pour les prochaines études, il serait intéressant de continuer des expositions d'espèces estuariennes sur des temps plus longs avec des microplastiques environnementaux à dose environnementale. Pour mieux comparer les études, il est important de standardiser les temps d'expositions trophiques. La méthode FTIR, par son protocole permettant de procéder à des analyses quantitatives et qualitatives, apporterait des informations complémentaires à l'étude de la bioaccumulation par analyse sur filtre.

Bibliographie

- (1) *Plastics Europe - Plastics Europe FR.* <https://plasticseurope.org/fr/>
- (2) Carney Almroth, B. M.; Åström, L.; Roslund, S.; Petersson, H.; Johansson, M.; Persson, N.-K. Quantifying Shedding of Synthetic Fibers from Textiles; a Source of Microplastics Released into the Environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2018), 25 (2), 1191–1199.
- (3) Zambrano, M. C.; Pawlak, J. J.; Daystar, J.; Ankeny, M.; Cheng, J. J.; Venditti, R. A. Microfibers Generated from the Laundering of Cotton, Rayon and Polyester Based Fabrics and Their Aquatic Biodegradation. *Mar. Pollut. Bull.* (2019), 142, 394–407.
- (4) Tian, L.; Jinjin, C.; Ji, R.; Ma, Y.; Yu, X. Microplastics in Agricultural Soils: Sources, Effects, and Their Fate. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* (2022), 25, 100311.
- (5) García Rellán, A.; Vázquez Ares, D.; Vázquez Brea, C.; Francisco López, A.; Bello Bugallo, P. M. Sources, Sinks and Transformations of Plastics in Our Oceans: Review, Management Strategies and Modelling. *Sci. Total Environ.* (2023), 854, 158745.
- (6) Ivar do Sul, J. A.; Costa, M. F. The Present and Future of Microplastic Pollution in the Marine Environment. *Environ. Pollut.* (2014), 185, 352–364.
- (7) Malli, A.; Corella-Puertas, E.; Hajjar, C.; Boulay, A.-M. Transport Mechanisms and Fate of Microplastics in Estuarine Compartments: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* (2022), 177, 113553.
- (8) Goldstein, M. C.; Rosenberg, M.; Cheng, L. Increased Oceanic Microplastic Debris Enhances Oviposition in an Endemic Pelagic Insect. *Biol. Lett.* (2012), 8 (5), 817–820.
- (9) Bowley, J.; Baker-Austin, C.; Porter, A.; Hartnell, R.; Lewis, C. Oceanic Hitchhikers – Assessing Pathogen Risks from Marine Microplastic. *Trends Microbiol.* (2021), 29 (2), 107–116.
- (10) Avio, C. G.; Gorbi, S.; Milan, M.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; d'Errico, G.; Pauletto, M.; Bargelloni, L.; Regoli, F. Pollutants Bioavailability and Toxicological Risk from Microplastics to Marine Mussels. *Environ. Pollut.* (2015), 198, 211–222.
- (11) Brennecke, D.; Duarte, B.; Paiva, F.; Caçador, I.; Canning-Clode, J. Microplastics as Vector for Heavy Metal Contamination from the Marine Environment. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* (2016), 178, 189–195.
- (12) Eriksen, M.; Cowger, W.; Erdle, L. M.; Coffin, S.; Villarrubia-Gómez, P.; Moore, C. J.; Carpenter, E. J.; Day, R. H.; Thiel, M.; Wilcox, C. A Growing Plastic Smog, Now Estimated to Be over 170 Trillion Plastic Particles Afloat in the World's Oceans—Urgent Solutions Required. *PLOS ONE* (2023).
- (13) Ghayebzadeh, M.; Taghipour, H.; Aslani, H. Abundance and Distribution of Microplastics in the Sediments of the Estuary of Seventeen Rivers: Caspian Southern Coasts. *Mar. Pollut. Bull.* (2021), 164, 112044.
- (14) Preston-Whyte, F.; Silburn, B.; Meakins, B.; Bakir, A.; Pillay, K.; Worship, M.; Paruk, S.; Mdazuka, Y.; Mooi, G.; Harmer, R.; Doran, D.; Tooley, F.; Maes, T. Meso- and Microplastics Monitoring in Harbour Environments: A Case Study for the Port of Durban, South Africa. *Mar. Pollut. Bull.* (2021), 163, 111948.
- (15) Frère, L.; Paul-Pont, I.; Rinnert, E.; Petton, S.; Jaffré, J.; Bihannic, I.; Soudant, P.; Lambert, C.; Huvet, A. Influence of Environmental and Anthropogenic Factors on the Composition, Concentration and Spatial Distribution of Microplastics: A Case Study of the Bay of Brest (Brittany, France). *Environ. Pollut.* (2017), 225, 211–222.
- (16) Simon-Sánchez, L.; Grelaud, M.; Garcia-Orellana, J.; Ziveri, P. River Deltas as Hotspots of Microplastic Accumulation: The Case Study of the Ebro River (NW Mediterranean). *Sci. Total Environ.* (2019), 687, 1186–1196.
- (17) Vandermeersch, G.; Van Cauwenbergh, L.; Janssen, C. R.; Marques, A.; Granby, K.; Fait, G.; Kotterman, M. J. J.; Diogène, J.; Bekaert, K.; Robbens, J.; Devriese, L. A Critical View on Microplastic Quantification in Aquatic Organisms. *Environ. Res.* (2015), 143, 46–55.
- (18) Bessa, F.; Barria, P.; Neto, J. M.; Frias, J. P. G. L.; Otero, V.; Sobral, P.; Marques, J. C. Microplastics in Juvenile Commercial Fish from an Estuarine Environment. In *Proceedings of*

- the International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea*; Cocca, M., Di Pace, E., Errico, M. E., Gentile, G., Montarsolo, A., Mossotti, R., Eds.; Springer Water; Springer International Publishing: Cham, (2018) ; pp 131–135.
- (19) Li, H.-X.; Ma, L.-S.; Lin, L.; Ni, Z.-X.; Xu, X.-R.; Shi, H.-H.; Yan, Y.; Zheng, G.-M.; Rittschof, D. Microplastics in Oysters *Saccostrea Cucullata* along the Pearl River Estuary, China. *Environ. Pollut.* (2018), *236*, 619–625.
- (20) McGoran, A. R.; Cowie, P. R.; Clark, P. F.; McEvoy, J. P.; Morritt, D. Ingestion of Plastic by Fish: A Comparison of Thames Estuary and Firth of Clyde Populations. *Mar. Pollut. Bull.* (2018), *137*, 12–23.
- (21) De Sales-Ribeiro, C.; Brito-Casillas, Y.; Fernandez, A.; Caballero, M. J. An End to the Controversy over the Microscopic Detection and Effects of Pristine Microplastics in Fish Organs. *Sci. Rep.* (2020), *10* (1), 12434.
- (22) Keisling, C.; Harris, R. D.; Blaze, J.; Coffin, J.; Byers, J. E. Low Concentrations and Low Spatial Variability of Marine Microplastics in Oysters (*Crassostrea Virginica*) in a Rural Georgia Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* (2020), *150*, 110672.
- (23) Phuong, N. N.; Zalouk-Vergnoux, A.; Poirier, L.; Kamari, A.; Châtel, A.; Mouneyrac, C.; Lagarde, F. Is There Any Consistency between the Microplastics Found in the Field and Those Used in Laboratory Experiments? *Environ. Pollut.* (2016), *211*, 111–123.
- (24) Pisani, X. G.; Lompré, J. S.; Pires, A.; Greco, L. L. Plastics in Scene: A Review of the Effect of Plastics in Aquatic Crustaceans. *Environ. Res.* (2022), *212*, 113484.
- (25) McGoran, A. R.; Clark, P. F.; Smith, B. D.; Morritt, D. High Prevalence of Plastic Ingestion by *Eriocheir Sinensis* and *Carcinus Maenas* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) in the Thames Estuary. *Environ. Pollut.* (2020), *265*, 114972.
- (26) Villagran, D. M.; Truchet, D. M.; Buzzi, N. S.; Forero Lopez, A. D.; Fernández Severini, M. D. A Baseline Study of Microplastics in the Burrowing Crab (*Neohelice Granulata*) from a Temperate Southwestern Atlantic Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* (2020), *150*, 110686.
- (27) de Barros, M. S. F.; dos Santos Calado, T. C.; de Sá Leitão Câmara de Araújo, M. Plastic Ingestion Lead to Reduced Body Condition and Modified Diet Patterns in the Rocky Shore Crab *Pachygrapsus Transversus* (Gibbes, 1850) (Brachyura: Grapsidae). *Mar. Pollut. Bull.* (2020), *156*, 111249.
- (28) Bråte, I. L. N.; Blázquez, M.; Brooks, S. J.; Thomas, K. V. Weathering Impacts the Uptake of Polyethylene Microparticles from Toothpaste in Mediterranean Mussels (*M. Galloprovincialis*). *Sci. Total Environ.* (2018), *626*, 1310–1318.
- (29) Sikdokur, E.; Belivermiş, M.; Sezer, N.; Pekmez, M.; Bulan, Ö. K.; Kılıç, Ö. Effects of Microplastics and Mercury on Manila Clam *Ruditapes Philippinarum*: Feeding Rate, Immunomodulation, Histopathology and Oxidative Stress. *Environ. Pollut.* (2020), *262*, 114247.
- (30) Cao, J.; Xu, R.; Wang, F.; Geng, Y.; Xu, T.; Zhu, M.; Lv, H.; Xu, S.; Guo, M. Polyethylene Microplastics Trigger Cell Apoptosis and Inflammation via Inducing Oxidative Stress and Activation of the NLRP3 Inflammasome in Carp Gills. *Fish Shellfish Immunol.* (2023), *132*, 108470.
- (31) Alnajar, N.; Jha, A. N.; Turner, A. Impacts of Microplastic Fibres on the Marine Mussel, *Mytilus Galloprovincialis*. *Chemosphere* (2021), *262*, 128290.
- (32) Bobori, D. C.; Dimitriadi, A.; Feidantsis, K.; Samiotaki, A.; Fafouti, D.; Sampsonidis, I.; Kalogiannis, S.; Kastrinaki, G.; Lambropoulou, D. A.; Kyza, G. Z.; Koumoundouros, G.; Bikiaris, D. N.; Kaloyianni, M. Differentiation in the Expression of Toxic Effects of Polyethylene-Microplastics on Two Freshwater Fish Species: Size Matters. *Sci. Total Environ.* (2022), *830*, 154603.
- (33) Nelms, S. E.; Galloway, T. S.; Godley, B. J.; Jarvis, D. S.; Lindeque, P. K. Investigating Microplastic Trophic Transfer in Marine Top Predators. *Environ. Pollut.* (2018), *238*, 999–1007.
- (34) Nakao, S.; Ozaki, A.; Yamazaki, K.; Masumoto, K.; Nakatani, T.; Sakiyama, T. Microplastics Contamination in Tidelands of the Osaka Bay Area in Western Japan. *Water*

- Environ. J.* (2020), 34 (3), 474–488.
- (35) Farrell, P.; Nelson, K. Trophic Level Transfer of Microplastic: *Mytilus Edulis* (L.) to *Carcinus Maenas* (L.). *Environ. Pollut.* (2013), 177, 1–3.
- (36) Watts, A. J. R.; Urbina, M. A.; Corr, S.; Lewis, C.; Galloway, T. S. Ingestion of Plastic Microfibers by the Crab *Carcinus Maenas* and Its Effect on Food Consumption and Energy Balance. *Environ. Sci. Technol.* (2015), 49 (24), 14597–14604.
- (37) Wang, T.; Hu, M.; Xu, G.; Shi, H.; Leung, J. Y. S.; Wang, Y. Microplastic Accumulation via Trophic Transfer: Can a Predatory Crab Counter the Adverse Effects of Microplastics by Body Defence? *Sci. Total Environ.* (2021), 754, 142099.
- (38) Setälä, O.; Fleming-Lehtinen, V.; Lehtiniemi, M. Ingestion and Transfer of Microplastics in the Planktonic Food Web. *Environ. Pollut.* (2014), 185, 77–83.
- (39) Xu, X.; Wong, C. Y.; Tam, N. F. Y.; Lo, H.-S.; Cheung, S.-G. Microplastics in Invertebrates on Soft Shores in Hong Kong: Influence of Habitat, Taxa and Feeding Mode. *Sci. Total Environ.* (2020), 715, 136999.
- (40) Flores, A. A. V.; Paula, J. Population dynamics of the shore crab *Pachygrapsus marmoratus* (Brachyura: Grapsidae) in the central Portuguese coast. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* (2002), 82 (2), 229–241.
- (41) Yousef, H. A.; Eisay, A. F.; Ali, R. A. S.; Ali, S. M. Food and Feeding Habits of *Pachygrapsus Marmoratus* (Grapsidae) Crab in the Southern Mediterranean Sea (Eastern Libya). *Int. Res. J. Nat. Sci.* (2022), 10 (3), 1–13.
- (42) Cannicci, S.; Gomei, M.; Dahdouh-Guebas, F.; Rorandelli, R.; Terlizzi, A. Influence of Seasonal Food Abundance and Quality on the Feeding Habits of an Opportunistic Feeder, the Intertidal Crab *Pachygrapsus Marmoratus*. *Mar. Biol.* (2007), 151 (4), 1331–1342.
- (43) Silva, A. C. F.; Brazão, S.; Hawkins, S. J.; Thompson, R. C.; Boaventura, D. M. Abundance, Population Structure and Claw Morphology of the Semi-Terrestrial Crab *Pachygrapsus Marmoratus* (Fabricius, 1787) on Shores of Differing Wave Exposure. *Mar. Biol.* (2009), 156 (12), 2591–2599.
- (44) Caliani, I.; Cannicci, S.; Pretti, C.; Baratti, M.; Contini, G.; Vitale, M.; Casini, S.; Fossi, M. C.; Iannucci, A.; Fratini, S. A Multidisciplinary Integrated Approach Using *Pachygrapsus Marmoratus* to Assess the Impact of Port Activities on Mediterranean Marine Protected Areas. *Chemosphere* (2023), 312, 137129.
- (45) Fratini, S.; Zane, L.; Ragonieri, L.; Vannini, M.; Cannicci, S. Relationship between Heavy Metal Accumulation and Genetic Variability Decrease in the Intertidal Crab *Pachygrapsus Marmoratus* (Decapoda; Grapsidae). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* (2008), 79 (4), 679–686.
- (46) Pinosio, S.; Fratini, S.; Cannicci, S.; Oliva, M.; Pretti, C.; Baratti, M. De Novo Transcriptome Assembly for *Pachygrapsus Marmoratus*, an Intertidal Brachyuran Crab. *Mar. Genomics* (2021), 55, 100792.
- (47) Verdelhos, T.; Cardoso, P.; Dolbeth, M.; Pardal, M. Latitudinal Gradients in *Scrobicularia Planula* Reproduction Patterns, Population Dynamics, Growth, and Secondary Production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (2011), 442, 271–283.
- (48) Solé, M.; Kopecka-Pilarczyk, J.; Blasco, J. Pollution Biomarkers in Two Estuarine Invertebrates, *Nereis Diversicolor* and *Scrobicularia Planula*, from a Marsh Ecosystem in SW Spain. *Environ. Int.* (2009), 35 (3), 523–531.
- (49) Vital, S. A.; Cardoso, C.; Avio, C.; Pittura, L.; Regoli, F.; Bebianno, M. J. Do Microplastic Contaminated Seafood Consumption Pose a Potential Risk to Human Health? *Mar. Pollut. Bull.* (2021), 171, 112769.
- (50) O'Donovan, S. Ecotoxicological effects of polyethylene microplastics, with and without adsorbed contaminants, on the clam *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) using a multi-biomarker approach. masterThesis, 2018.
- (51) Ribeiro, F.; Garcia, A. R.; Pereira, B. P.; Fonseca, M.; Mestre, N. C.; Fonseca, T. G.; Ilharco, L. M.; Bebianno, M. J. Microplastics Effects in *Scrobicularia Planula*. *Mar. Pollut. Bull.* (2017), 122 (1), 379–391.

- (52) Rodrigues, A. R.; Mestre, N. C. C.; Fonseca, T. G. da; Pedro, P. Z.; Cartenay, C. C.; Cormier, B.; Keiter, S.; Bebianno, M. J. Influence of Particle Size on Ecotoxicity of Low-Density Polyethylene Microplastics, with and without Adsorbed Benzo-a-Pyrene, in Clam *Scrobicularia Planula*. *Biomolecules* (2022), *12* (1), 78.
- (53) Métais, I.; Latchere, O.; Roman, C.; Perrein-Ettajani, H.; Mouloud, M.; Georges, D.; Audroin, T.; Catrouillet, C.; Gigault, J.; Agnès-Feurtet-Mazel; Baudrimont, M.; Châtel, A. Continuum from Microplastics to Nanoplastics: Effects of Size and Source on the Estuarine Bivalve *Scrobicularia Planula*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2023), *30* (16), 45725–45739.
- (54) Thiele, C. J.; Hudson, M. D.; Russell, A. E. Evaluation of Existing Methods to Extract Microplastics from Bivalve Tissue: Adapted KOH Digestion Protocol Improves Filtration at Single-Digit Pore Size. *Mar. Pollut. Bull.* (2019), *142*, 384–393.
- (55) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* (1951), *193*, 265–275.
- (56) Yu, H.; Chen, Q.; Qiu, W.; Ma, C.; Gao, Z.; Chu, W.; Shi, H. Concurrent Water- and Foodborne Exposure to Microplastics Leads to Differential Microplastic Ingestion and Neurotoxic Effects in Zebrafish. *Water Res.* (2022), *219*, 118582.
- (57) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* (1961), *7* (2), 88–95.
- (58) Sahlmann, A.; Wolf, R.; Holth, T. F.; Titelman, J.; Hylland, K. Baseline and Oxidative DNA Damage in Marine Invertebrates. *J. Toxicol. Environ. Health A* (2017), *80* (16–18), 807–819.
- (59) Akcha, F.; Vincent Hubert, F.; Pfhol-Leszkowicz, A. Potential Value of the Comet Assay and DNA Adduct Measurement in Dab (*Limanda Limanda*) for Assessment of in Situ Exposure to Genotoxic Compounds. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* (2003), *534* (1), 21–32.
- (60) Zhang, Q.; Xu, E. G.; Li, J.; Chen, Q.; Ma, L.; Zeng, E. Y.; Shi, H. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* (2020), *54* (7), 3740–3751.
- (61) Ward, J. E.; Zhao, S.; Holohan, B. A.; Mladinich, K. M.; Griffin, T. W.; Wozniak, J.; Shumway, S. E. Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus Edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea Virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. *Environ. Sci. Technol.* (2019), *53* (15), 8776–8784.
- (62) Cau, A.; Avio, C. G.; Dessì, C.; Moccia, D.; Pusceddu, A.; Regoli, F.; Cannas, R.; Follesa, M. C. Benthic Crustacean Digestion Can Modulate the Environmental Fate of Microplastics in the Deep Sea. *Environ. Sci. Technol.* (2020), *54* (8), 4886–4892.
- (63) Dawson, A. L.; Kawaguchi, S.; King, C. K.; Townsend, K. A.; King, R.; Huston, W. M.; Bengtson Nash, S. M. Turning Microplastics into Nanoplastics through Digestive Fragmentation by Antarctic Krill. *Nat. Commun.* (2018), *9* (1), 1001.
- (64) Batel, A.; Linti, F.; Scherer, M.; Erdinger, L.; Braunbeck, T. Transfer of Benzo[a]Pyrene from Microplastics to Artemia Nauplii and Further to Zebrafish via a Trophic Food Web Experiment: CYP1A Induction and Visual Tracking of Persistent Organic Pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* (2016), *35* (7), 1656–1666.
- (65) Corami, F.; Rosso, B.; Bravo, B.; Gambaro, A.; Barbante, C. A Novel Method for Purification, Quantitative Analysis and Characterization of Microplastic Fibers Using Micro-FTIR. *Chemosphere* (2020), *238*, 124564.
- (66) Jaikumar, I. M.; Periyakali, S. B.; Rajendran, U.; Joen-Rong, S.; Thanasekaran, J.; Tsorng-Harn, F. Effects of Microplastics, Polystyrene, and Polyethylene on Antioxidants, Metabolic Enzymes, HSP-70, and Myostatin Expressions in the Giant River Prawn *Macrobrachium Rosenbergii*: Impact on Survival and Growth. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2021, *80* (3), 645–658.
- (67) Yu, P.; Liu, Z.; Wu, D.; Chen, M.; Lv, W.; Zhao, Y. Accumulation of Polystyrene Microplastics in Juvenile *Eriocheir Sinensis* and Oxidative Stress Effects in the Liver. *Aquat. Toxicol.* (2018), *200*, 28–36.

- (68) van Wezel, A. P.; van Vlaardingen, P.; Posthumus, R.; Crommentuijn, G. H.; Sijm, D. T. H. M. Environmental Risk Limits for Two Phthalates, with Special Emphasis on Endocrine Disruptive Properties. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2000), **46** (3), 305–321..
- (69) He, Y.; Lin, W.; Shi, C.; Li, R.; Mu, C.; Wang, C.; Ye, Y. Accumulation, Detoxification, and Toxicity of Dibutyl Phthalate in the Swimming Crab. *Chemosphere* (2022), **289**, 133183.
- (70) Shen, C.; Wei, J.; Wang, T.; Wang, Y. Acute Toxicity and Responses of Antioxidant Systems to Dibutyl Phthalate in Neonate and Adult Daphnia Magna. *PeerJ* (2019), **7**, e6584. 4.
- (71) Pereira, P.; de Pablo, H.; Dulce Subida, M.; Vale, C.; Pacheco, M. Biochemical Responses of the Shore Crab (*Carcinus Maenas*) in a Eutrophic and Metal-Contaminated Coastal System (Óbidos Lagoon, Portugal). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2009), **72** (5), 1471–1480.
- (72) Gray, A., Weinsteins E. Size- and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Environmental Toxicology*. (2017), **36** (11), 3074-3080,
- (73) Yuan, L.; Liu, J.; Huang, Y.; Shen, G.; Pang, S.; Wang, C.; Li, Y.; Mu, X. Integrated Toxicity Assessment of DEHP and DBP toward Aquatic Ecosystem Based on Multiple Trophic Model Assays. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2022), **29** (58), 87402–87412.
- (74) Quintaneiro, C.; Monteiro, M.; Soares A. M. V. M.; Ranville., J.; Nogueira., A. J. A. Cholinesterase activity on *Echinogammarus meridionalis* (Pinkster) and *Atyaephyra desmarestii* (Millet): characterisation and in vivo effects of copper and zinc. *Ecotoxicology*. (2014), **23** (3), 449-458.
- (75) Araújo, A. P. da C.; Luz, T. M. da; Rocha, T. L.; Ahmed, M. A. I.; Silva, D. de M. e; Rahman, M. M.; Malafaia, G. Toxicity Evaluation of the Combination of Emerging Pollutants with Polyethylene Microplastics in Zebrafish: Perspective Study of Genotoxicity, Mutagenicity, and Redox Unbalance. *J. Hazard. Mater.* (2022), **432**, 128691.
- (76) Jiang, N.; Song, P.; Li, X.; Zhu, L.; Wang, J.; Yin, X.; Wang, J. Dibutyl Phthalate Induced Oxidative Stress and Genotoxicity on Adult Zebrafish (*Danio Rerio*) Brain. *J. Hazard. Mater.* (2022), **424**, 127749.
- (77) Baudrimont, M.; Arini, A.; Guégan, C.; Venel, Z.; Gigault, J.; Pedrono, B.; Prunier, J.; Maurice, L.; Ter Halle, A.; Feurtet-Mazel, A. Ecotoxicity of Polyethylene Nanoplastics from the North Atlantic Oceanic Gyre on Freshwater and Marine Organisms (Microalgae and Filter-Feeding Bivalves). *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2020), **27** (4), 3746–3755.
- (78) Latchere, O.; Audroin, T.; Hétier, J.; Métais, I.; Châtel, A. The Need to Investigate Continuums of Plastic Particle Diversity, Brackish Environments and Trophic Transfer to Assess the Risk of Micro and Nanoplastics on Aquatic Organisms. *Environ. Pollut.* (2021), **273**, 116449.
- (79) Crooks, N.; Parker, H.; Pernetta, A. P. Brain Food? Trophic Transfer and Tissue Retention of Microplastics by the Velvet Swimming Crab (*Necora Puber*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (2019), **519**, 151187.

Résumé

Les plastiques représentent un aspect économique majeur. Leur importante production engendre une contamination massive sous la forme de macro- et de microplastiques (MP) dans les systèmes aquatiques. La bioaccumulation fréquente de MP dans les tissus des organismes marins est communément confirmée, mais les mécanismes de toxicité sont encore mal compris. Au cours de ce stage, deux expériences de contamination par voie directe (10 et 100 µg MP/L) et trophique (bivalves contaminés avec 100 µg MP/L) ont eu pour objectif de caractériser les effets de MP à des doses environnementales sur les tissus respiratoire et digestif du crabe marbré (*Pachygrapsus marmoratus*). Une modulation du système antioxydant a été démontrée dans les deux expériences. Des dommages à ADN ont été mesurés pour l'exposition directe à 10 µg MP/L. Les nombreux contaminants présents dans les MP environnementaux, dont le phtalate de dibutyle (DBP), pourraient expliquer en partie les réponses observées.

Mots-clefs

Microplastiques, *Pachygrapsus marmoratus*, Transfert trophique, Bioaccumulation, Toxicité

Summary

Plastics represent an important economic asset. Their massive production lead to microplastic pollution in aquatic systems. If bioaccumulation in marine organisms has been showed, toxicity mechanism of MP is still not completely understood. During this internship, two experimentations have been done to characterize the effects of environmental microplastics at environmentally relevant concentration to the gills and guts of the marble crab (*Pachygrapsus marmoratus*): water contamination (10 and 100µg MPs/L) and trophic contamination (bivalve contaminated in MPs). The antioxidative system showed modulations through both studies. Significative DNA damage occurred for water exposition at 10 µg MPs/L. The numerous contaminants contained in environmental MP, as the di-butyl phthalate (DBP), could be involved in the organism's response

Key Word

Microplastics, *Pachygrapsus marmoratus*, Trophic transfer, Bioaccumulation, Toxicity

Annexes

Caractéristiques des microplastiques

	MP mixture	PE	PP	PVC	PET	Total ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
	Mass composition (%)	40	40	10	10	-
Metallic trace elements ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Cu	2.0	3.5	4.7	13.8	-
	Pb	4.9	9.0	786.0	19.5	-
	Zn	9.0	4169.8	432.3	52.6	-
	Cd	6.0	123.2	<LOQ	<LOQ	-
	Cr	<LOQ	77.9	23.1	359.5	-
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Naphthalene		<LOQ			6.924
	Acenaphthylene		0.178			
	Acenaphthene		0.066			
	Fluorene		0.255			
	Phenanthrene		0.659			
	Anthracene		0.537			
	Fluoranthene		0.471			
	Pyrene		0.835			
	Benzo[a]anthracene		0.041			
	Chrysene		0.053			
	Benzo[b]fluoranthene		0.358			
	Benzo[k]fluoranthene		0.090			
	Benzo[a]pyrene		0.356			
	Indeno[1,2,3]pyrene		0.695			
	Dibenzo[a,h]anthracene		0.233			
	Benzo[g,h,i]perylene		2.097			
Alkylphenols ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Bisphenol A	0.013				2.988
	4-Nonylphenol	2.349				
	Nonylphenol monoethoxylate	0.451				
	Nonylphenol diethoxylate	0.093				
	Nonylphenol carboxylic acid	<LOD				
	Octylphenol	0.012				
	Octylphenol monoethoxylate	0.062				
Phthalic acid esters ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Octylphenol diethoxylate	0.008				211.362
	Dimethyl phthalate	2.508				
	Diethyl phthalate	7.527				
	Diisobutyl phthalate	13.657				
	Dibutyl phthalate	126.612				
	Bis(2methoxyethyl) phthalate	5.706				
	Bis (4-methyl-2-pentyl) phthalate	0.633				
	Bis(2ethoxyethyl) phthalate	2.080				
	Di-n-pentyl phthalate	0.060				
	Butylbenzyl phthalate	6.905				
	Di-n-hexyl phthalate	5.698				
	Bis(2-butoxyethyl) phthalate	2.365				
	Dicyclohexyl phthalate	0.900				
	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	34.766				
	di-n-octyl-phthalate	0.694				
	Diisononylphthalate	1.251				

Morphométrie

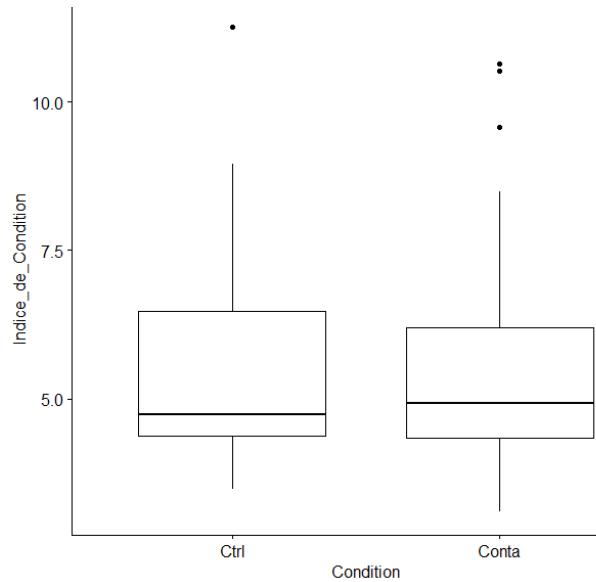


Figure A : Indice de condition des *Scrobicularia plana* pour les individus contrôles (Ctrl) et contaminés (Conta). La p-value est à 0,95.

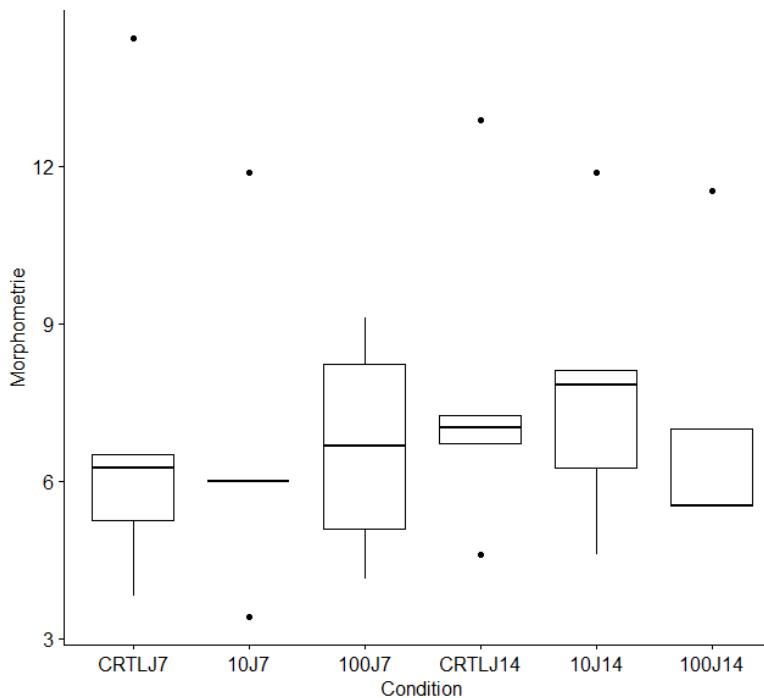


Figure B : Morphométrie des crabes exposés par voie directe (contrôle, 10 et 100) pendant 7 ou 14 jours. La p-value est à 0,89.

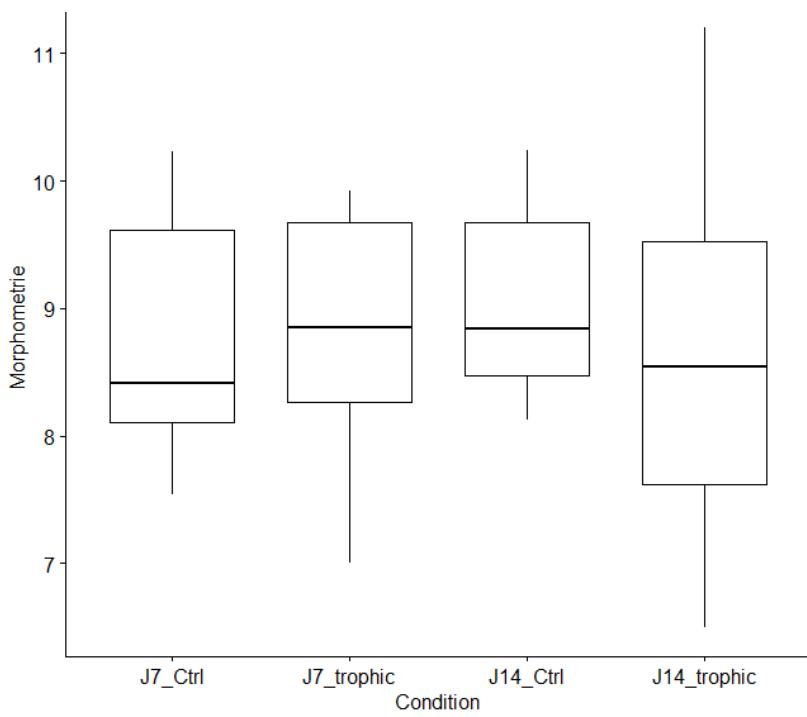


Figure C : Morphométrie des crabes exposés par voie trophique (contrôle et trophique) pendant 7 ou 14 jours. La p-value est à 0,94.

Dosage des enzymes : exposition trophique

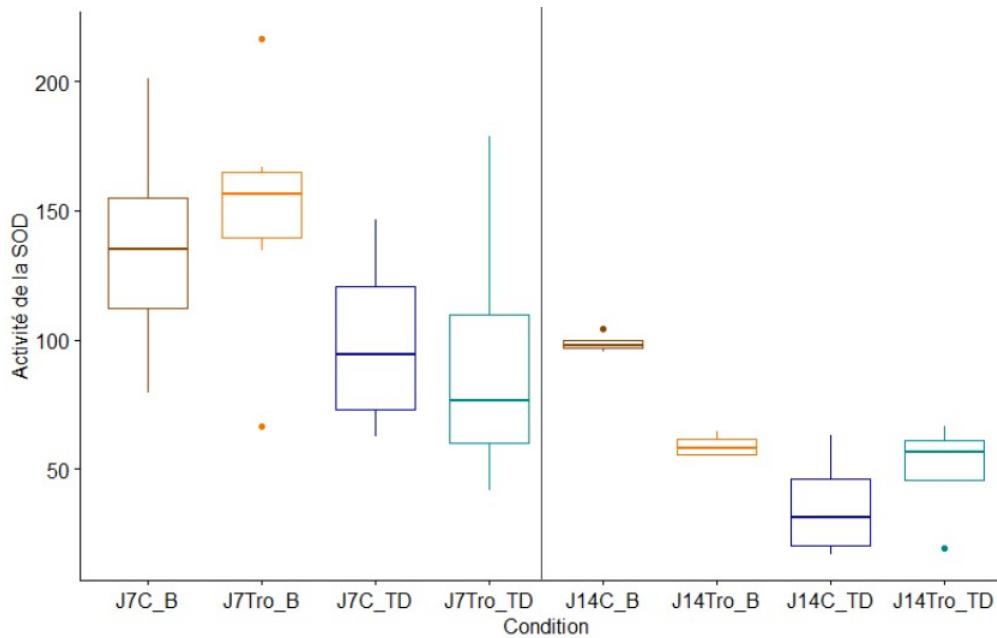


Figure : Activité de la SOD (U/mg de protéines) des branchies (B, en orange) et du tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie trophique (Tro), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours.

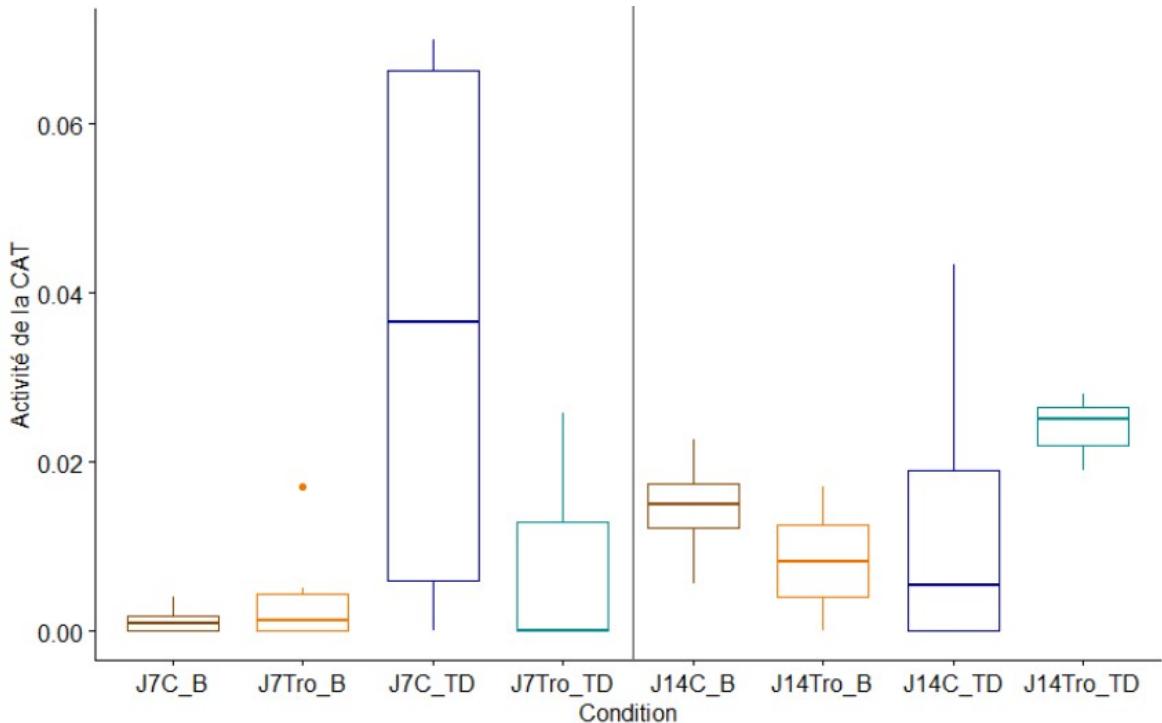


Figure D : Activité de la CAT ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) des branchies (B, en orange) et du tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie trophique (Tro), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours.

Dosage des enzymes : exposition directe

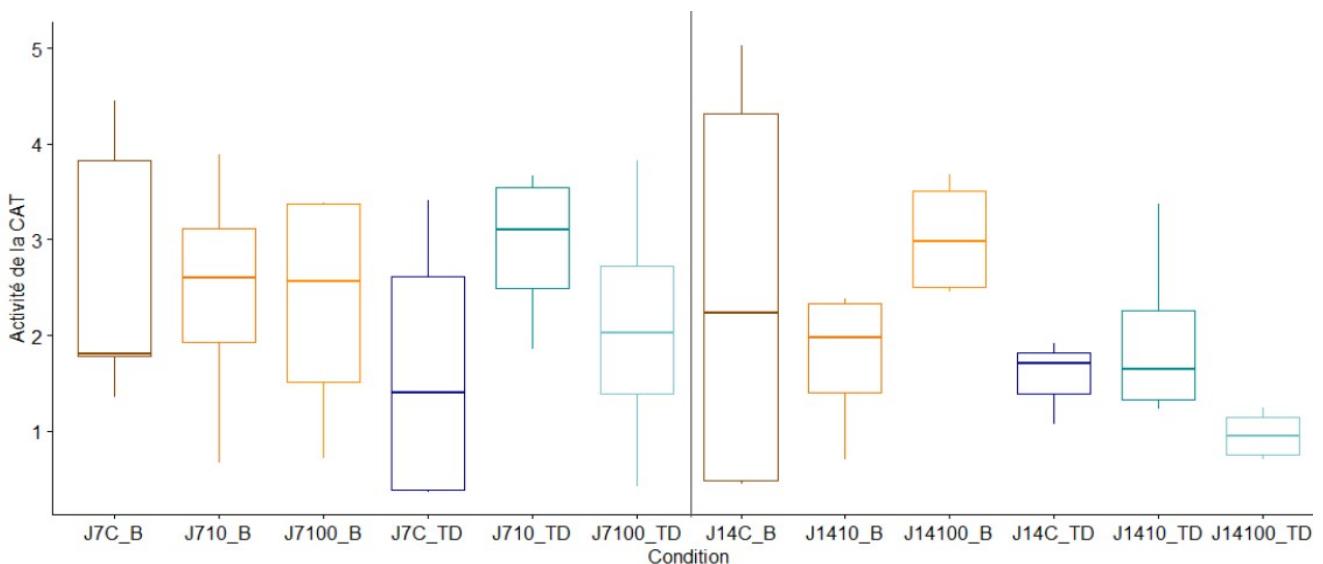


Figure E : Activité de la CAT ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) dans les branchies (B, en orange) et le tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie directe (10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{L}$), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours.

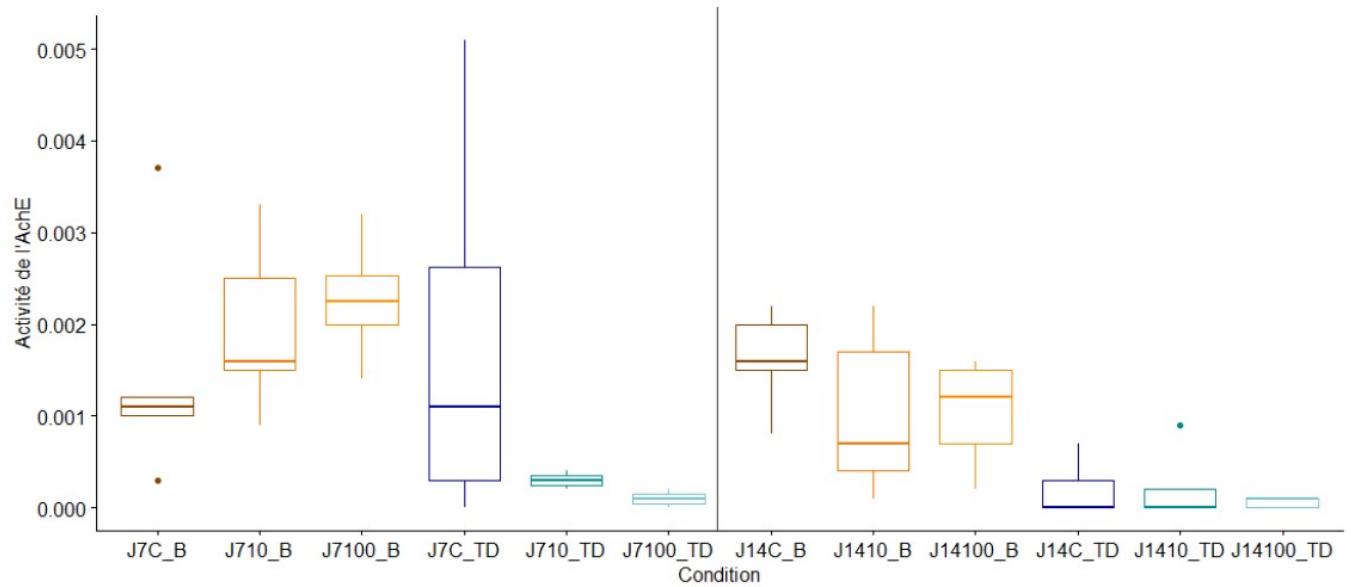


Figure F : Activité de l'AchE (U/mg de protéines) dans les branchies (B, en orange) et le tube digestif (TD, en bleu) pour les crabes marbrés contrôles (C) et contaminés par voie directe (10 ou 100 µg/L), au bout de 7 (J7) ou 14 (J14) jours.