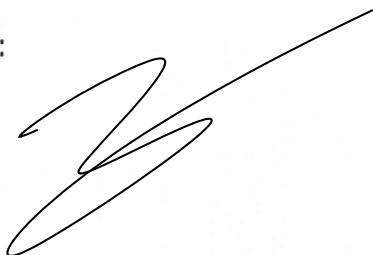


**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné (e) ...BOSSARD Evan....., 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 :



# Charte antiplagiat - Université d'Angers

## Préambule

Afin de garantir la qualité de ses diplômes et l'originalité des productions scientifiques et pédagogiques de ses étudiants et de ses personnels universitaires, enseignants, enseignants-chercheurs, chercheurs, l'Université d'Angers a mis en place une politique de lutte contre le plagiat. La présente charte en définit la philosophie et précise les règles, les outils et les mesures à mettre en œuvre pour s'assurer de la réalisation de travaux inédits, offrant une production originale et personnelle d'un sujet.

## Article 1<sup>er</sup>

Le plagiat est défini comme le fait, de s'approprier le travail créatif d'autrui et de le présenter comme sien ; de s'accaparer des extraits de textes, des images, des données provenant de sources externes et de les intégrer à son propre travail sans en mentionner la provenance ; de résumer l'idée originale d'un auteur en l'exprimant dans ses propres mots et en omettant d'en mentionner la source.

Toute édition d'écrits, de composition musicale, de dessin, de peinture ou de toute autre production, imprimée ou gravée en entier ou en partie, au mépris des lois et règlements relatifs à la propriété des auteurs est une contrefaçon (article L335-2 du code de la propriété intellectuelle).

La contrefaçon est considérée comme un délit au sens des articles L335-2 et L335-3 du code de la propriété intellectuelle.

## Article 2

Les étudiants et les personnels de l'Université d'Angers s'engagent à respecter les valeurs présentées dans cette charte et à ne pas commettre de plagiat, ni de contrefaçon, dans leurs travaux scientifiques et/ou pédagogiques.

Dans le strict respect de l'exception de courte citation, sont tolérées les reproductions de courts extraits de travaux préexistants en vue d'illustration ou à des fins didactiques, sous réserve que soit indiqué clairement le nom de l'auteur et la source (article L122-5 du code de la propriété intellectuelle), sans nécessité de demander le consentement de l'auteur.

Les étudiants sont tenus d'insérer et de signer l'engagement de non plagiat en première page de toutes leurs productions. Le libellé de cet engagement de non plagiat est défini dans la charte des examens de l'Université d'Angers.

## Article 3

Afin d'éviter le plagiat ou la contrefaçon, les étudiants et les personnels de l'Université d'Angers s'engagent à

indiquer clairement l'origine et la provenance de toute information prise dans des écrits, composition musicale, dessin, peinture ou toute autre production imprimée ou gravée. La citation des sources est, ainsi, à envisager dès qu'il est fait référence à l'idée, à l'opinion ou à la théorie d'une autre personne ; à chaque utilisation de données, résultats, illustrations d'autrui ; à chaque citation textuelle de paroles ou d'écrits d'autrui.

Dans le cadre de sa politique de lutte contre le plagiat, l'Université d'Angers propose des formations de sensibilisation à la recherche documentaire, à l'utilisation des documents trouvés et à la citation des sources.

#### **Article 4**

Afin de rechercher les éventuelles tentatives de plagiat ou de contrefaçon, l'Université d'Angers s'est dotée d'un logiciel de similitudes. Ainsi, les étudiants sont informés que leurs productions sont susceptibles d'être analysées par le dit logiciel. Ce logiciel compare les travaux rendus avec une vaste base de référence. Les rapports émis détaillent les similitudes repérées sans pouvoir les qualifier de plagiat ou de contrefaçon. Sur la base de ces rapports, l'appréciation du plagiat ou de la contrefaçon est laissée à l'appréciation des enseignants.

#### **Article 5**

Les manquements à la présente charte sont passibles de sanctions disciplinaires tant à l'égard des étudiants (Articles L. 811-6 et R.712-9 à R.712-46 du code de l'éducation et articles 40 et 41 du décret n°92-657 du 13 juillet 1992 – version consolidée du 21 août 2013) que des personnels (loi n°84-16 du 11 janvier 1984 et articles L952-8 et L952-9 du code de l'éducation). En cas de plagiat avéré ou de contrefaçon, la procédure disciplinaire ne préjuge pas d'éventuelles poursuites judiciaires.

**2022-2023**

Mention Toxicologie Ecotoxicologie

Spécialité Toxicologie Humaine et Environnementale

**Optimisation de la stabulation de  
*Sabellaria alveolata*, de sa  
fécondation *in vitro* et des  
hémocytes de *Scrobicularia plana*  
en laboratoire**

-

Evan BOSSARD

Sous la direction de :

Antoine Le Guernic | Maître de conférences  
Didier Georges | Maître de conférences



**UCO**  
ANGERS

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE L'OUEST

**Ua<sup>1</sup> FACULTÉ  
DES SCIENCES**  
UNIVERSITÉ D'ANGERS

[www.univ-angers.fr/sciences](http://www.univ-angers.fr/sciences)

# Optimisation de la stabulation de *Sabellaria alveolata*, de sa fécondation *in vitro* et des hémocytes des *Scrobicularia plana* en laboratoire

Bossard Evan, Le Guernic Antoine, Georges Didier

---

## Résumé

L'intensification et la diversification des activités humaines induisent inlassablement l'apparition de nouveaux contaminants dans l'environnement, dont certains qui ne sont toujours pas soumis aux législations en vigueur. Il est nécessaire de remédier au manque de connaissances sur ces polluants émergeants via la constante amélioration de méthode de détection et de caractérisation, grâce à l'usage de nouveaux modèles *in vitro*. *Sabellaria alveolata* est un candidat intéressant concernant la fécondation *in vitro*. Plusieurs tests avec ces organismes ont été réalisés dans l'objectif de rendre compte de la possibilité d'utiliser cet organisme pour des tests d'écotoxicité. Il a été observé que des variations physico-chimiques du milieu (température, salinité) influent sur la réussite de celle-ci. De plus, le volume de milieu utilisé pour la fécondation semble être un facteur limitant rendant l'utilisation de ce modèle pour des tests écotoxicologiques en routine difficile. Concernant *Scrobicularia plana*, la culture cellulaire d'hémocytes pourrait aider à la caractérisation des polluants qui se retrouvent couramment dans l'environnement de ce bivalve, comme les microplastiques. Divers milieux et temps ont été testés dans l'objectif d'établir un protocole de culture cellulaire pour ce modèle. Il a été démontré que les hémocytes supportent bien le maintien pendant plusieurs jours, et ce malgré un stress cellulaire engendré par des microparticules de polyéthylène. Ce modèle pourrait être utilisé dans des tests d'écotoxicité, afin de caractériser les effets de contaminants grâce l'étude de nombreux biomarqueurs.

Mots clefs : hémocytes, fécondation *in vitro*, culture primaire, *Scrobicularia plana*, *Sabellaria alveolata*.

## Abstract

Intensification and diversification of human activities lead to a constant emergence of new contaminants in the environment, some of which are still not subject to current legislation. It's necessary to remedy the lack of information about emerging pollutant via a continuous improvement of screening and characterization method thanks to the use of new *in vitro* models. *Sabellaria alveolata* is an interesting candidate for the *in vitro* fertilization. Some tests were realized to report on the possibility of using this organism in the future for ecotoxicity testing. It has been observed that physico-chemical variation in the medium (temperature, salinity) have an impact on the success of the fertilization. Furthermore, the medium volume used seems to be a limiting factor, making this model difficult to use routinely. For *Scrobicularia plana*, the hemocyte cellular culture could help for the characterization of the pollutants found in the environment of this bivalve, such as microplastics. Some culture medium and different time were tested to establish a cellular culture protocol for this model. Its hemocytes have been shown to withstand maintenance for several days, despite cellular stress caused by the presence of polyethylene microparticles. In the future, this model could be used in ecotoxicity tests to characterize the effects of numerous contaminants by



studying biomarkers.

Key words : hemocytes, fertilization *in vitro*, primary culture, *Scrobicularia plana*, *Sabellaria alveolata*.

## Abréviations

|        |   |
|--------|---|
| HAP    | : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques |
| NOAA   | : National Oceanic And Atmospheric        |
| REEHAB | : REEf HABitat                            |
| ERO    | : Espèces réactives de l'oxygène          |
| L-15   | : Leibovitz's 15 medium                   |
| FBS    | : Fetal Bovine Serum                      |
| HBSS   | : Solution Saline Equilibrée de Hanks     |
| PBS    | : Tampon Phosphate Salin                  |
| ALS    | : Alsever's Solution                      |

---

## 1. Introduction

### 1.1. La constante augmentation des polluants dans l'environnement, notamment dans les milieux aquatiques

De nos jours, de plus en plus de polluants de différentes natures se retrouvent dans l'environnement que ce soit des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) liés à une combustion incomplète de combustibles fossiles [1] ; des pesticides liés à une agriculture intensive ou encore des plastiques provenant d'une production massive. Cette pollution plastique est majoritairement liée aux secteurs de l'emballage et de la construction [2], et ne cesse d'augmenter. En effet, une production de 380 millions de tonnes de plastique a été enregistrée en 2020 et celle-ci pourrait atteindre une gigatonne d'ici 2050 si aucune législation n'est prise d'ici là [3]. Sachant que 20% de ces déchets plastiques sont gérés et recyclés, les 80% restant sont soit incinérés, soit rejetés dans l'environnement [4]. Ces plastiques finissent indubitablement par

polluer les océans. Il a été estimé qu'en 2010, 4,8 à 12,7 millions de tonnes de plastiques sont retrouvées dans les océans [5]. Ce type de polluant a tendance à persister durant de nombreuses années notamment dans les océans. En effet la dégradation des plastiques est majoritairement liée aux radiations UV solaires et à la température ; par conséquent les plastiques ayant sédimenté dans les fonds marins sont dégradés très lentement du fait de l'absence de lumière et une température relativement faible [6].

### 1.2. La découverte de nouveaux polluants

La toxicité des polluants retrouvés couramment dans l'environnement tels que les HAP et les pesticides est étudiée depuis de nombreuses années, engendrant à eux deux un grand nombre d'articles d'écotoxicologie. Bien que ces polluants soient maintenant soumis à certaines législations, d'autres polluants découverts récemment ne sont soumis à aucune réglementation. Les polluants qui n'exigent aucune surveillance concernant leur présence dans l'eau ou dans les rejets d'eaux usées, qui ne sont donc pas



soumis à une régulation, sont appelés des polluants émergents [7]. La découverte de polluants émergents est principalement due à l'amélioration des méthodes de détection [7]. Parmi ces polluants émergents se retrouvent les produits pharmaceutiques mais également des métaux, de nouveaux pesticides, des phtalates ou encore des plastiques [7, 8, 9]. En effet, la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) a inclus les déchets plastiques comme contaminants émergents et depuis, les dérivés plastiques tels que les microplastiques sont considérés comme menace émergente [9].

Bien que la toxicité des macroplastiques commence à être bien caractérisée, la réelle menace de la pollution plastique est liée à la présence de plastiques de faible taille, tels que les microplastiques (0,1-5 mm) et les nanoplastiques (< 0,1 µm). Ils proviennent d'une production directe ou sont engendrés via la dégradation de macroplastiques, et de nouveaux effets néfastes ne cessent d'être découverts [10, 11]. Leur omniprésence dans les différents compartiments hydriques, de l'eau douce à l'eau de mer en passant par les abysses [12,13] induit indubitablement une accumulation dans le vivant, que ce soit chez des invertébrés benthiques [14], des poissons [15], des oiseaux marins [16] ou encore des tortues [17]. Leur absorption et leur effet est directement en lien avec leur faible taille [17, 18]. Tandis que les macroplastiques induisent principalement des étranglements [19], les microplastiques peuvent pénétrer dans l'organisme via la prise alimentaire ou la respiration et induisent de l'inflammation, une satiété anormale via l'accumulation dans l'estomac ou encore des ulcères [11]. Concernant les nanoplastiques, ils possèdent une taille suffisante pour passer différentes barrières biologiques, comme la barrière intestinale, et pour se distribuer dans les différents organes induisant stress oxydant et effets indésirables sur diverses fonctions physiologiques [20, 21]. Plusieurs études concluent que plus la taille des particules de

plastique est faible, plus importante est leur toxicité [18]. De plus, lors de la production de plastique, l'ajout d'additifs est courant dans le but d'améliorer ses performances technologiques [22]. Cependant ces additifs tels que les phtalates, adipates ou phénol [23] finissent eux aussi par polluer l'environnement et les organismes en contact des plastiques [20]. Il est donc primordial d'améliorer les techniques de détection de ces polluants plastiques dans l'environnement et de s'assurer de leur innocuité, ou non, dans le but d'imposer des normes pour préserver la faune et la flore et *in fine* la santé humaine.

### 1.3. La nécessité d'améliorer les méthodes d'analyses des effets des polluants

Pour accomplir ces deux missions, il est nécessaire de faire appel à des organismes sentinelles. Un organisme sentinelle est un organisme qui traduit (par des variations physiologiques, comportementales, moléculaires, génétiques etc...) une perturbation de son environnement et ce de manière la plus directe et précise possible. Plusieurs critères sont nécessaires pour sélectionner une bonne espèce sentinelle tels que la résistance aux différents stress, l'abondance, la capacité à bioaccumuler les polluants, la représentativité d'une zone géographique, le contact direct avec les différentes matrices, la taille suffisamment importante et enfin la capacité à être maintenue en laboratoire. Plusieurs espèces regroupent l'ensemble de ces critères et sont largement utilisées comme *Mytilus edulis* ou *Dreissena polymorpha* [24, 25] tandis que d'autres peuvent être considérées comme de potentielles espèces sentinelles telles que *Sabellaria alveolata* et *Scrobicularia plana*.

*Sabellaria alveolata* est une espèce grégaire d'annélide marine découverte par Linné en 1767 et répartie sur un grand nombre de côtes méditerranéennes et atlantiques [26]. Cette espèce tubicole est qualifiée d'espèce bio-constructrice formant des



structures en sable comportant un grand nombre de tubes et servant de lieu de vie pour *Sabellaria* et de nombreux autres organismes [27]. Cette espèce joue donc un rôle important au sein de l'écosystème et retranscrit de façon précise l'état de son environnement via leur physiologie et la présence de leur bioconstruction au même titre que des récifs coralliens. En effet un indice normalisé concernant la santé des récifs de *Sabellaria* a été mis au point par Stanislas Dubois pour le projet REEHAB (REEf HABitat) de l'Ifremer dans le but de retrécire les effets de différents facteurs environnementaux sur ces récifs [49]. De plus, *Sabellaria alveolata* est suspensivore, c'est-à-dire qu'elle se nourrit en filtrant une quantité importante d'eau de son milieu ce qui induit une accumulation au sein de l'organisme d'un grand nombre de composants du milieu avec une filtration de  $7,5 \times 10^{-4}$  L.h<sup>-1</sup> [28]. Un autre aspect intéressant chez cette espèce est son mode de reproduction. En effet cette espèce gonochorique émet un grand nombre de gamètes dans le milieu durant deux périodes de l'année, une en avril et une autre en août-septembre [29] permettant de réaliser des fécondations *in vitro* [30]. Cela permettrait la réalisation de tests de toxicité sur la fécondation ou le développement embryonnaire de cette espèce comme cela est déjà réalisé chez le poisson zèbre (OCDE 236).

*Scrobicularia plana* est une espèce de bivalve qui pourrait également être utilisée à l'avenir comme espèce sentinelle. Les bivalves sont largement utilisés comme organismes sentinelles car ils traduisent de façon précise l'état de leur environnement. En effet ce sont des espèces sédentaires pour la plupart et souvent sessiles [31] ce qui permet d'affilier des organismes à une zone géographique bien précise. Ces espèces sont également suspensivores ce qui permet de retrécire l'état du milieu de la même manière que le modèle précédent. De plus, une notion importante chez les bivalves est leurs

résistances aux stress qui va permettre d'une part de résister à la contamination et d'une autre part d'être maintenus pendant un certain temps au laboratoire. Dans le cas de *Scrobicularia plana*, cette espèce a la particularité d'être endo-benthique au niveau des côtes et estuaires, c'est-à-dire que l'organisme va passer l'essentiel de sa vie dans les sédiments. Cette particularité ne se retrouve pas chez les organismes sentinelles couramment utilisées en écotoxicologie (*Mytilus edulis*, *Dreissena polymorpha*). Cela fait de *S. plana* une potentielle espèce sentinelle plus spécialisée dans l'étude des polluants se retrouvant dans les sédiments notamment des métaux lourds ou donc les microplastiques. Cet organisme est un modèle déjà utilisé en écotoxicologie [31, 32, 33, 34, 35] de par ces caractéristiques. Ces potentiels organismes pourront être utilisés au laboratoire pour caractériser les effets de diverses pollutions, via des cultures *in vitro* notamment, et également sur le terrain lors de programmes de biosurveillance.

Les tests *in vitro* sont de plus en plus utilisés afin de réaliser un screening important des effets d'une molécule ou un ensemble de molécules sur un type cellulaire choisi et ce dans des conditions contrôlées. Ces tests permettent de réduire de façon conséquente le nombre d'organismes utilisés tout en multipliant les conditions tels que le temps d'exposition ou la concentration. Ces tests peuvent être réalisés à partir de divers types cellulaires qu'ils proviennent de culture primaire ou non, le choix du type cellulaire dépendant entre autres des molécules testées ou de leurs mécanismes d'action. Concernant les tests de fécondation *in vitro*, ils sont couramment utilisés dans le but d'observer les effets délétères engendrés sur les différents stades de développement embryonnaire de différentes espèces. Ces tests permettent d'identifier des possibles effets tératogènes ou cytotoxiques sur des stades de développement bien définis.



De nombreux tests *in vitro* sont également réalisés sur des hémocytes de bivalves [36, 37, 38]. Les hémocytes sont des cellules circulantes de l'hémolymphé et remplissent un grand nombre de fonctions telles que la défense immunitaire, la cicatrisation ou encore la phagocytose [39]. De plus l'hémolymphé participe au transport de nutriment, de déchets métaboliques et à l'élimination de molécules toxiques exogènes [40]. Par conséquent les hémocytes sont au contact direct de l'ensemble de ces composés permettant l'obtention des informations sur l'organisme et donc indirectement sur son milieu. Un stress exogène, par un polluant par exemple, subit par *S. plana* aura donc directement des conséquences sur les hémocytes que ce soit au niveau de leur viabilité, la production d'espèce réactive de l'oxygène (ERO) ou encore des dommages à l'ADN. Il est donc intéressant de réaliser une culture primaire d'hémocytes de *S. plana* dans le but de déterminer les effets de divers polluants que l'on retrouve majoritairement dans les sédiments dans les buts de vérifier leur innocuité ou non et de caractériser au mieux leur effets le cas échéant.

#### 1.4. Les organismes sentinelles, un outil de choix contre la pollution

A terme, après avoir caractérisé de façon précise les effets des différents polluants plastiques, ces espèces pourront être utilisées pour des missions de biosurveillance active ou passive. La biosurveillance consiste à observer les altérations de l'environnement et leurs impacts grâce à l'utilisation d'espèces sentinelles sur le terrain. Ces espèces sont soit amenées sur le terrain (biosurveillance active) ou prélevées directement depuis le terrain (biosurveillance passive). Cependant, cette méthode prend en compte un nombre de variables très important d'où la nécessité de réaliser des tests *in vitro* en amont dans le but de comprendre les effets de ces polluants dans des conditions contrôlées.

#### 1.5. Objectif du stage

L'intensification de la pollution plastique dans les différents compartiments hydriques et la découverte de leurs effets néfastes nécessitent la mise en place de nouveau modèles *in vivo* et *in vitro* dans l'objectif de vérifier ou non l'innocuité de ces plastiques et d'autres polluants en conditions contrôlées, tout en limitant le nombre d'organismes sacrifiés. Ce stage consiste donc en la mise en place de différents protocoles pour atteindre cet objectif.

Pour le modèle, *Scrobicularia plana*, il est nécessaire d'établir un protocole de culture primaire de ses hémocytes dans l'objectif de les maintenir pendant une durée suffisamment longue afin de réaliser des tests d'expositions de différents polluants tels que les micro- et nanoplastiques.

Concernant *Sabellaria alveolata*, il est nécessaire dans un premier temps de réussir à maintenir l'espèce en laboratoire pendant une longue durée. Puis, établir un protocole de fécondation *in vitro* suffisamment précis dans le but de réaliser à terme des tests de toxicité sur son développement embryonnaire.

## 2. Matériels & Méthodes

### 2.1. Modèles animaux

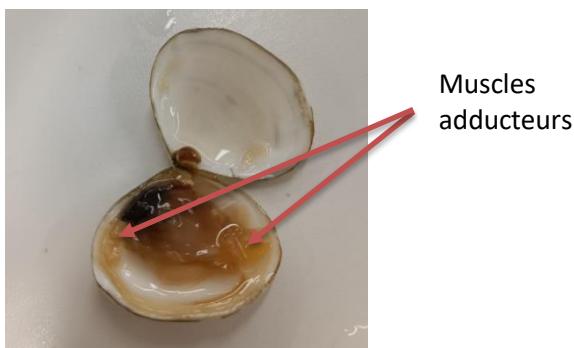
#### 2.1.1. Récupération de *Scrobicularia plana* et de son hémolymphé

Les organismes, *Scrobicularia plana*, ont été récupérés sur la plage de Pont-Mahé (47,44474° N ; 2,45278° O) le 5 avril 2023. Cette date a été choisie de sorte à éviter la période de reproduction (dans le but de faciliter le prélèvement d'hémocytes en évitant une contamination par des gamètes). Les organismes ont ensuite été entreposés dans des bacs contenant 15L d'eau de mer artificiel à 25 g/L de sel (zoo mix), pour obtenir



une conductivité se rapprochant des conditions naturelles à environ 35 mS/cm. Cette eau a été renouvelée deux fois par semaine. Les bivalves sont nourris également deux fois par semaine en amont du changement d'eau avec des algues *Tetraselmis suecica* à hauteur de 70 000 cellules/individu et ce jusqu'à la période d'exposition aux microplastiques. La température de la pièce a été maintenue à 18°C avec une photopériode 12D/12L (Dark-Light) dans l'objectif de reproduire les conditions naturelles.

L'hémolymph a été extrait des organismes à partir du muscle adducteur en utilisant une seringue de 1 mL et une aiguille de 26G (fig. 1)



**Figure 1 :** photo de *Scrobicularia plana*

#### 2.1.2. *Récupération de Sabellaria alveolata et de leurs gamètes*

Les organismes, *Sabellaria alveolata*, ont été récupérés sur la plage de la promenade Georges Godet aux Sables-d'Olonne (46,490827° N ; -1,773978° O) le 20 avril 2023 et sur la plage de Penchâteau (47.258829° N ; -2.417210° O) le 20 mai 2023. Ces dates ont été choisies de sorte à obtenir des organismes matures sexuellement pour le bien des expérimentations.

Par manque d'informations concernant l'alimentation de cette espèce, 60 L d'eau du site ont été récupérés pour remplir les aquariums et ainsi remédier au manque

d'apport en nourriture grâce aux particules initialement présentes dans l'eau. Les aquariums ont été entreposés dans une pièce dont la lumière et la température ne sont pas régulés artificiellement.

Les organismes sont récupérés en effritant leur habitat et la détermination de leur sexe a été permise grâce à la coloration de leur abdomen. Les gamètes ont ensuite été récupérés directement dans le milieu si les organismes les ont expulsés à cause du stress ou via une incision de l'abdomen dans le cas contraire.

### 2.2. *Protocoles*

#### 2.2.1. *Protocole de fécondation in vitro*

Après prélèvement des différents gamètes, une observation au microscope optique est réalisée afin de vérifier l'intégrité de celles-ci. Les gamètes mâles et femelles sont ensuite placés dans différents volumes (30 mL, 50 mL et 200 µL) d'eau de mer artificielle stérile à 25 g/L de NaCl. La suspension est ensuite incubée à 18°C et 20°C.

#### 2.2.2. *Préparation des différentes solutions pour la culture d'hémocytes*

Les hémocytes, de par leur nature, ont tendance à s'adhérer facilement entre eux et créer des agglomérats ce qui peut engendrer une mortalité ou une diminution du nombre d'hémocytes récupérés. Pour remédier à cela, la solution d'Aslever, solution couramment utiliser comme anticoagulant, a été préparé (20,8 g/L de glucose, 8,0 g/L de citrate de sodium, 3,36 g/L d'EDTA, 22,5 g/L de NaCl dans de l'eau osmosé et pH ajusté à 7 (par l'ajout de KOH) et stérilisé par filtration à 0,45 µm.

Grâce à la méta-analyse de différents articles sur la culture primaire d'hémocytes de bivalves (Annexe 1) trois milieux ont été



préparés et testés :

- Milieu du protocole d'Andrew Barrick, 2018 [41] : utilisation de milieu Leibovitz's (L-15) supplémenté de 0,3465 de NaCl, 7,2 mM de KCl, 5,4 mM de CaCl<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O, 8,3 mM de MgSO<sub>4</sub> et 40,83 mM de MgCl<sub>2</sub>. Juste avant l'utilisation de ce milieu 10% de glucose, 10% de sérum de veau foetal (FBS), 100 unités/mL de pénicilline G, 100 µg/mL de streptomycine et 10 µg/mL de gentamicine ont été ajoutés.

- Milieu de la thèse de M. Droguet [42] : utilisation de milieu L-15 dilué au 10<sup>e</sup> dans de l'eau de mer artificielle (25 g/L de NaCl) puis supplémenté de 10 mM d'HEPES. Juste avant l'utilisation de ce milieu ont été ajouté 10% de FBS, 50 unités/mL de pénicilline G, 50 µg/mL de streptomycine et 20 µg/mL de gentamicine

- Milieu de l'article de Ladhar-Chaabouni Rim, 2021 [43] : utilisation de HBSS solution saline équilibrée de Hank (HBSS) 1X supplémenté de 250 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 25 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O, 10 mM d'HEPES et 2mM de L-glutamine. 100 unités/mL de pénicilline G et 100 µg/mL de streptomycine ont été ajoutés en amont de l'utilisation.

Les 3 milieux ont ensuite été ajustés à un pH de 7,2 par ajout de HCl (Annexe 2).

#### 2.2.3. Test de viabilité cellulaire

Dans un premier temps, la viabilité cellulaire est déterminée par comptage en cellule de Malassez après ajout de bleu trypan. Le bleu trypan est un colorant capable d'intégrer le cytoplasme des cellules mortes de par la perte de sélectivité de leur membrane ce qui n'est pas le cas pour les cellules encore vivantes qui excluent activement le colorant [44].

Le réactif Alamar blue a également été utilisé comme second test de viabilité. Le réactif de l'Alamar blue est la résazurine. Cette molécule, non fluorescente et de

couleur bleue, est perméable aux cellules et peut être réduite en résorufine par la NADH déshydrogénase ou la NADPH déshydrogénase mitochondriales [48]. La résorufine, étant de couleur rose et fluorescente dans le rouge, permet donc de rendre compte de la viabilité d'un échantillon. Plus celui-ci présentera un nombre important de cellules vivantes, plus l'absorbance ou la fluorescence de l'échantillon sera importante [48]. Pour les tests de viabilité effectués, un indice a été calculé en se basant sur l'article d'Andrew Barrick 2018 [41] qui utilisait l'Alamar blue comme test de viabilité lors de la mise en place d'une culture primaire d'hémocytes de *Mytilus edulis*.

$$\frac{\varepsilon_{ox}\lambda_2 A^{\lambda_1} - \varepsilon_{ox}\lambda_1 A^{\lambda_2}}{\varepsilon_{red}\lambda_1 A'^{\lambda_2} - \varepsilon_{red}\lambda_2 A'^{\lambda_1}}$$

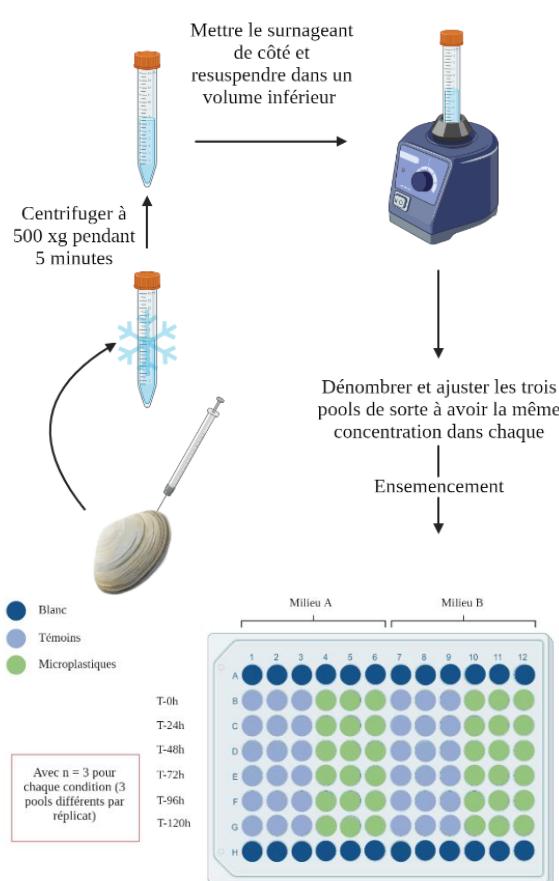
Avec  $\lambda_1 = 570$  nm et  $\lambda_2 = 600$  nm, A = l'absorbance de l'échantillon, A' = l'absorbance du blanc,  $\varepsilon_{ox}\lambda_2$  = le coefficient d'extinction molaire de l'Alamar blue oxydé à 600 nm,  $\varepsilon_{ox}\lambda_1$  = le coefficient d'extinction molaire de l'Alamar blue oxydé à 570 nm,  $\varepsilon_{red}\lambda_1$  = le coefficient d'extinction molaire de l'Alamar blue réduit à 570 nm et  $\varepsilon_{red}\lambda_2$  = le coefficient d'extinction molaire de l'Alamar blue réduit à 600 nm.

#### 2.2.4. Protocole de mise en culture d'hémocytes

Lors du prélèvement de l'hémolymphé, la seringue est prérincée avec de l'ALS puis l'hémolymphé est stockée dans la glace. L'hémolymphé des bivalves est récupérée dans 3 tubes différents qui formeront les 3 pools lors de l'ensemencement. Les 3 pools sont ensuite centrifugés (500 g pendant 5 min, 4°C) puis le culot cellulaire est repris dans un plus faible volume d'hémolymphé, l'objectif étant de concentrer l'échantillon. Le dénombrement est effectué par comptage en cellule de Malassez, puis les 3 pools sont ajustés à une même concentration. Un



volume de 100 µL de suspension est ensuite ajouté dans les puits, suivi de 90 µL de milieu et complété avec 10 µL de tampon phosphate salin (PBS) ou d'une suspension de polyéthylène dans ce tampon (PBS) pour obtenir une concentration finale en microplastiques de 100 µg/L (fig. 2). Ce plastique non vieilli a été acheté sur le commerce puis broyé afin d'obtenir une taille inférieure à 400 µm. Cette exposition aux microplastiques a pour objectif de vérifier la survie des hémocytes malgré un stress cellulaire.



**Figure 2 :** Protocole d'ensemencement des hémocytes de *Scrobicularia plana* sur plaque 96 puits.

## 2.2.5. Protocole de validité du test Alamar blue

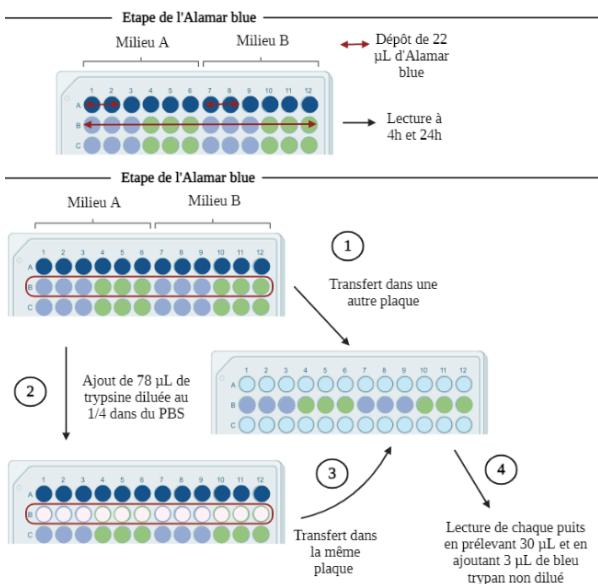
Dans l'objectif de vérifier que le test de viabilité réalisé à l'aide de l'Alamar blue fonctionne correctement pour les hémocytes de *Scrobicularia plana*, un contrôle positif a été mis en place. Les hémocytes ont été exposés pendant 24 heures avec de l'éthanol à 50% et 10% afin d'engendrer une certaine mortalité. La viabilité est ensuite mesurée et comparée avec un témoin non exposé.

## 2.2.6. Protocole de test de viabilité

Pour les tests de viabilité réalisés, 22 µL d'Alamar blue préalablement dilué au 2,5<sup>e</sup> dans du PBS sont ajoutés dans chaque puits de sorte à obtenir une dilution finale au 25<sup>e</sup>. Cette dilution a été choisie dans le but d'éviter une saturation lors de la lecture de l'absorbance. L'absorbance des échantillons et des blancs correspondant est ensuite mesurée au bout de 4 et 24 heures à une longueur d'onde de 570 nm et 600 nm. Les temps choisis dépendent de la concentration de nos échantillons ; moins l'échantillon est concentré, plus il est préférable d'incuber longtemps pour obtenir une meilleure précision.

Après la dernière lecture de l'Alamar blue, les puits sont transférés dans une autre plaque et 78 µL de trypsine diluée au 1/4 dans du PBS sont ajoutés à la plaque de culture. La trypsine est une peptidase largement utilisée en culture cellulaire notamment pour les cellules adhérentes car cette enzyme dégrade les protéines membranaires d'adhésion. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, la suspension contenant la trypsine est également transférée dans l'autre plaque. Après une bonne homogénéisation, 30 µL sont prélevés auquel sont ajoutés 3 µL de bleu trypan non dilué. La lecture se fait en cellule de Malassez (fig 3).





**Figure 3 :** protocole de test de viabilité à l'Alamar blue et au bleu trypan réalisé sur une culture de *Scrobicularia plana* en plaque 96 puits.

### 2.3. Méthodes

#### 2.3.1. Méthode de recherche bibliographique

Les recherches bibliographiques ont été réalisées sur un ensemble de moteur de recherche dédié (Google scholar, PubMed, Web of Science) avec comme mots-clefs principaux : hémocytes, Alamar blue, cultures primaires, *Scrobicularia plana*, *Sabellaria alveolata*, fécondation *in vitro*.

Les critères de sélection des articles étaient notamment leurs dates de publication en privilégiant les plus récentes quand cela était possible. Concernant les articles de *Sabellaria alveolata*, la plupart des articles étaient datés des années 80 voire 90 d'où la difficulté de trouver des informations récentes.

#### 2.3.2. Analyses statistiques

Les analyses statistiques et les graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version

4.2.1. Ayant des distributions toutes non-paramétriques (validé par le test de Shapiro-Wilk, afin de tester la normalité des résidus de l'ANOVA et le test de Levene, pour tester l'homogénéité des variances) et afin de connaître si des différences significatives existaient entre les distributions, un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc « pairwise Mann-Whitney » ont été réalisés en posant un risque  $\alpha$  de à 5%.

## 3. Résultats

### 3.1. *Sabellaria alveolata*

#### 3.1.1. Extraction des différents gamètes

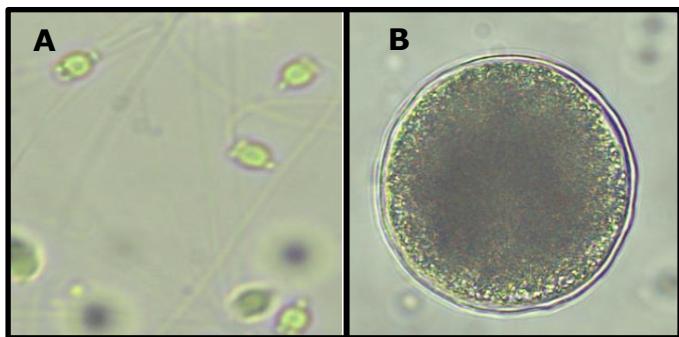
Le sexe des différents individus a été identifié sous loupe binoculaire après leur extraction de leur structure alvéolée. Les femelles possèdent un abdomen rouge de par la présence des ovules tandis que celui des mâles est blanc (fig. 4).



**Figure 4 :** Observation à la loupe binoculaire de *Sabellaria alveolata* mâle (A) et femelle (B).

Les gamètes ont ensuite été extraits depuis le milieu salin ou directement depuis leur abdomen. Ils ont ensuite été observés sous microscope pour vérifier leur intégrité (fig. 5).

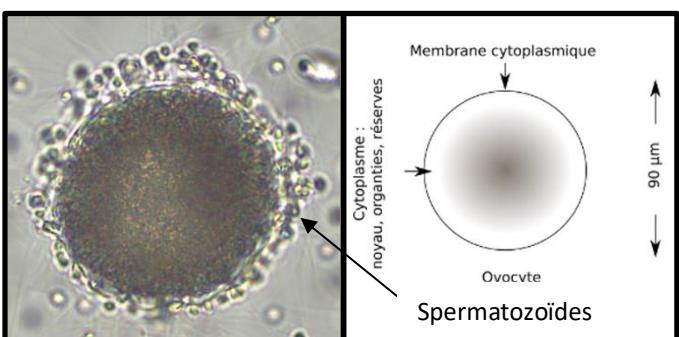




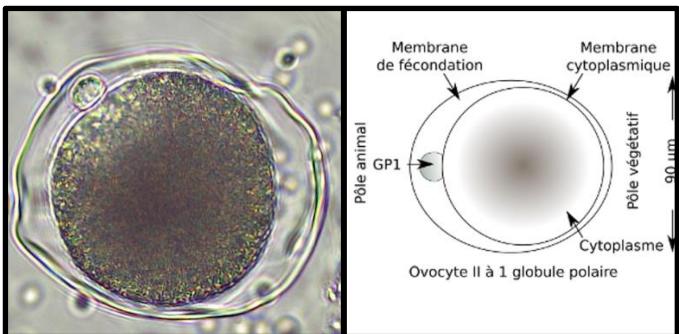
**Figure 5** : Observation au microscope optique des gamètes mâles (A) au grossissement x1000 et d'un gamète femelle (B) au grossissement x400 de *S. alveolata*.

### 3.1.2. Fécondation *in vitro*

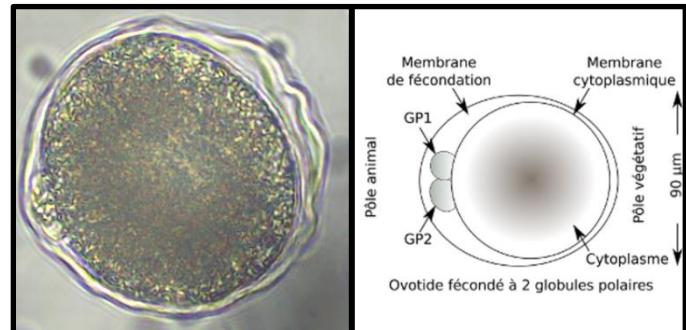
La fécondation a ensuite été mise en place et observée pendant plusieurs jours (fig.6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).



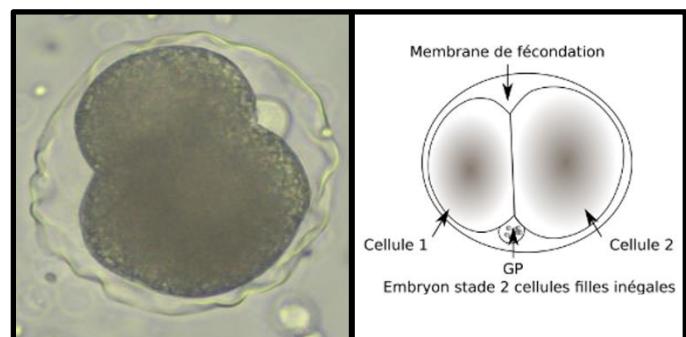
**Figure 6** : Observation au microscope optique (x 400) d'un ovule entouré de spermatozoïdes avec schéma légendé [47].



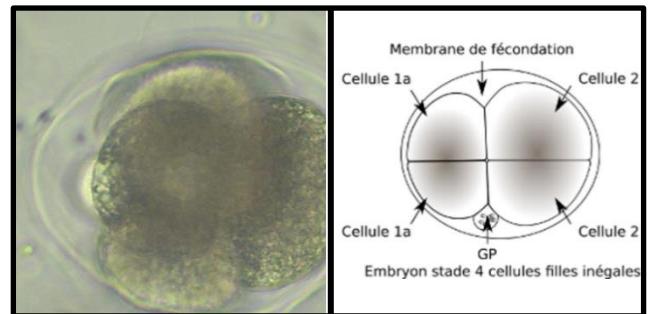
**Figure 7** : Observation au microscope optique (x400) de l'apparition du premier globule polaire avec schéma légendé [47]



**Figure 8** : Observation au microscope optique (x400) de l'apparition du deuxième globule polaire avec schéma légendé [47]

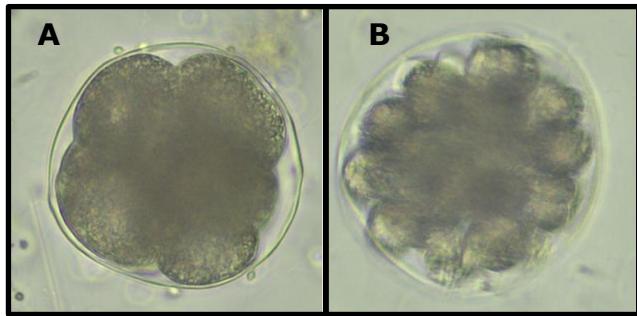


**Figure 9** : Observation au microscope optique (x400) de la première division avec schéma légendé [47].

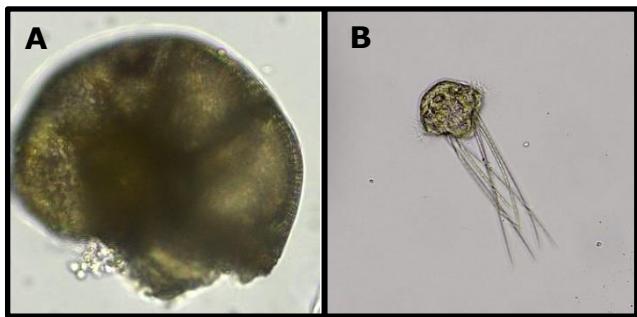


**Figure 10** : Observation au microscope optique (x400) de la deuxième division avec schéma légendé [47]





**Figure 11** : Observation au microscope optique (x400) du stade 8 cellules (A) et 32 cellules (B).



**Figure 12** : Observation au microscope optique (x400) du stade gastrula (A) et larve trochophore (B) au microscope inversé x100 [47]

### 3.2. *Scrobicularia plana*

#### 3.2.1. Méta-analyse

Aucune culture primaire d'hémocytes de *Scrobicularia plana* n'ayant été mise en place de nos jours, les informations concernant les milieux de culture préférentiels pour cet organisme et le protocole à suivre étaient inconnus. Il était donc nécessaire d'analyser différents articles traitant de la culture primaire d'hémocytes de bivalves dans l'objectif d'obtenir des informations concernant les milieux communément utilisés, ainsi que les différentes étapes à suivre dans l'objectif d'établir une culture primaire pour *Scrobicularia plana* (Annexe 1).

A partir de l'ensemble de ces articles, 3 milieux ont été choisis : le milieu B, R et I. Le

choix de ces milieux a été défini en prenant en compte la différence de composition entre ces milieux. En effet, le milieu B contient majoritairement de l'eau de mer artificielle ; le milieu R contient principalement du milieu Leibovitz's tandis que le milieu I est à base de solution saline équilibrée de Hank.

#### 3.2.2. Mise au point du protocole

Durant les premières manipulations, une grande perte d'hémocytes a été observée. Pour comprendre ce phénomène, un test d'adhérence a été effectué (Tab. I).

| Temps d'incubation en minutes | Conditions        | Pourcentage de cellules récupérées |
|-------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| 30                            | Surnageant        | 87%                                |
|                               | Après décollement | 6%                                 |
| 60                            | Surnageant        | 47%                                |
|                               | Après décollement | 44%                                |
| 90                            | Surnageant        | 15%                                |
|                               | Après décollement | 56%                                |

**Tableau I** : Pourcentage de cellules récupérées dans le surnageant ou après décollement mécanique en fonction du temps d'incubation (n=2)

Les résultats ont permis de comprendre que la perte en hémocytes était due à une faible adhérence au support de ces cellules. Le protocole a été adapté pour les manipulations suivantes dans l'objectif de remédier à cette perte.

#### 3.2.3. Extraction et dénombrement

Après extraction de l'hémolymphé, les hémocytes (fig. 13) sont dénombrés en excluant les cellules mortes colorées en bleu par le bleu trypan.





**Figure 13** : Observation microscopique (x400) d'hémocytes de *Scrobicularia plana*.

#### 3.2.4. Validité du test Alamar blue

L'exposition avec de l'éthanol à 50% engendre une mortalité d'environ 70% par rapport aux conditions non exposés. Cependant, l'exposition à de l'éthanol 10% ne semble pas avoir d'effet sur la viabilité des hémocytes (tab. II).

| Conditions  | Viabilités |
|-------------|------------|
| Contrôles   | 100 %      |
| Ethanol 10% | 107,8 %    |
| Ethanol 50% | 27,8 %     |

**Tableau II** : Viabilité des hémocytes après 24h d'exposition à de l'éthanol (50% et 10%), n=2.

#### 3.2.5. Effet du temps sur la viabilité des hémocytes

La manipulation a été conduite à deux reprise afin d'avoir un nombre de pool par condition compris entre 5 et 9.

Comme montré sur la figure 14, aucune différence significative n'est observée sur la viabilité mesurée à l'aide du bleu trypan qu'importe le temps (24H, 48H, 72H, 192H). Concernant la viabilité obtenue à l'aide du test Alamar blue, une diminution significative est observée après 24h d'incubation atteignant environ 90% de viabilité. Une diminution significative est également observée au bout de 192h correspondant à une diminution de la viabilité de 40 % environ. La viabilité correspond au pourcentage de l'indice obtenu au temps 24H, 48H, 72H ou 192H divisé par l'indice moyen à H0.

#### 3.2.6. Effet du milieu sur la viabilité des hémocytes

Concernant l'effet du milieu, aucune différence significative n'est observée sur la viabilité mesurée à l'aide du bleu trypan. Concernant la viabilité obtenue avec le test Alamar blue, des différences significatives sont observées pour le milieu I (fig. 15). En prenant en compte l'indice de chaque test réalisé et non pas un rapport de viabilité à la condition témoin, des différences significatives sont également retrouvées pour le milieu I notamment après 192H de maintien (fig. 16). En effet, pour le milieu I, l'indice passe de 75 à environ 40 après 192H. Des différences significatives sont également présente concernant les indices du milieu B, où la viabilité diminue au bout de 24h avant de retrouver un niveau identique au H0 après 48h.

#### 3.2.7. Effet d'un stress sur la viabilité des hémocytes

Concernant la viabilité des hémocytes en présence de particules de polyéthylène, aucune différence significative n'a été observée quel que soit le milieu étudié (fig. 17).

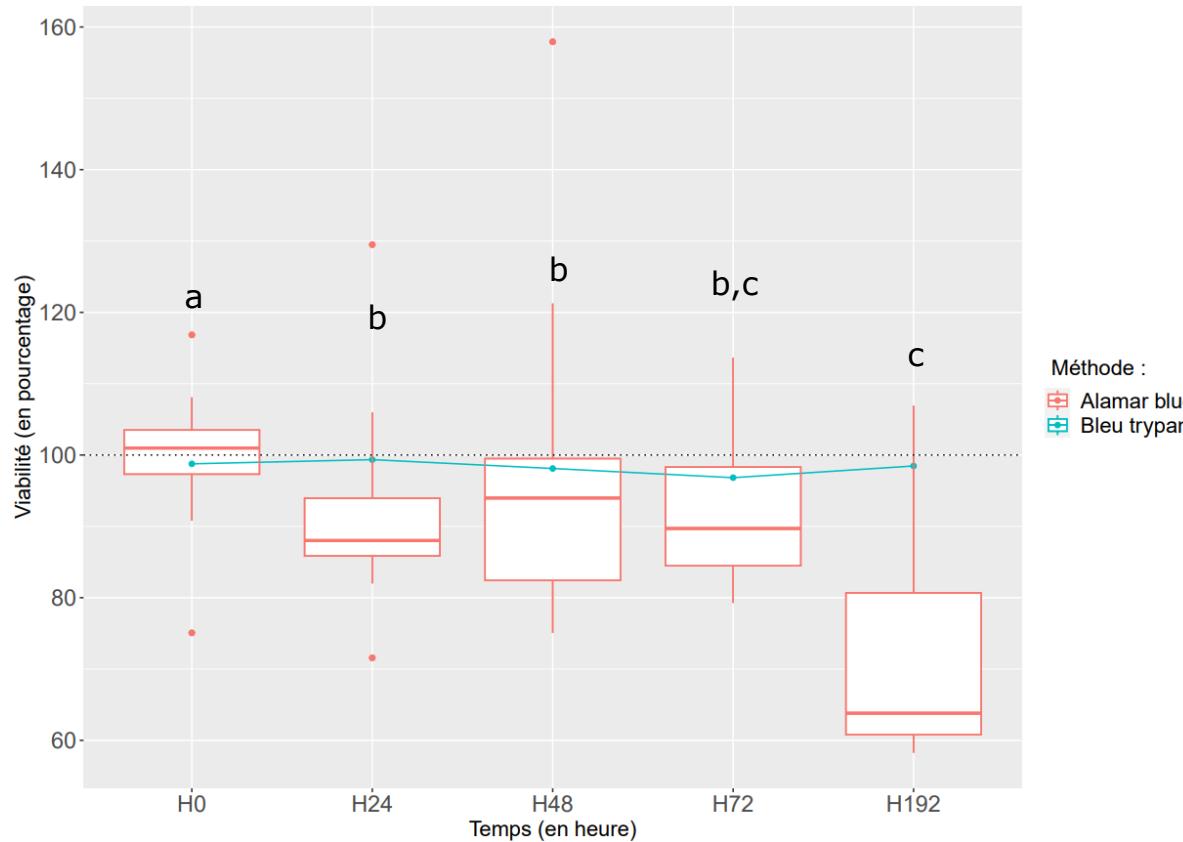
### 4. Discussion

#### 4.1. *Sabellaria alveolata*

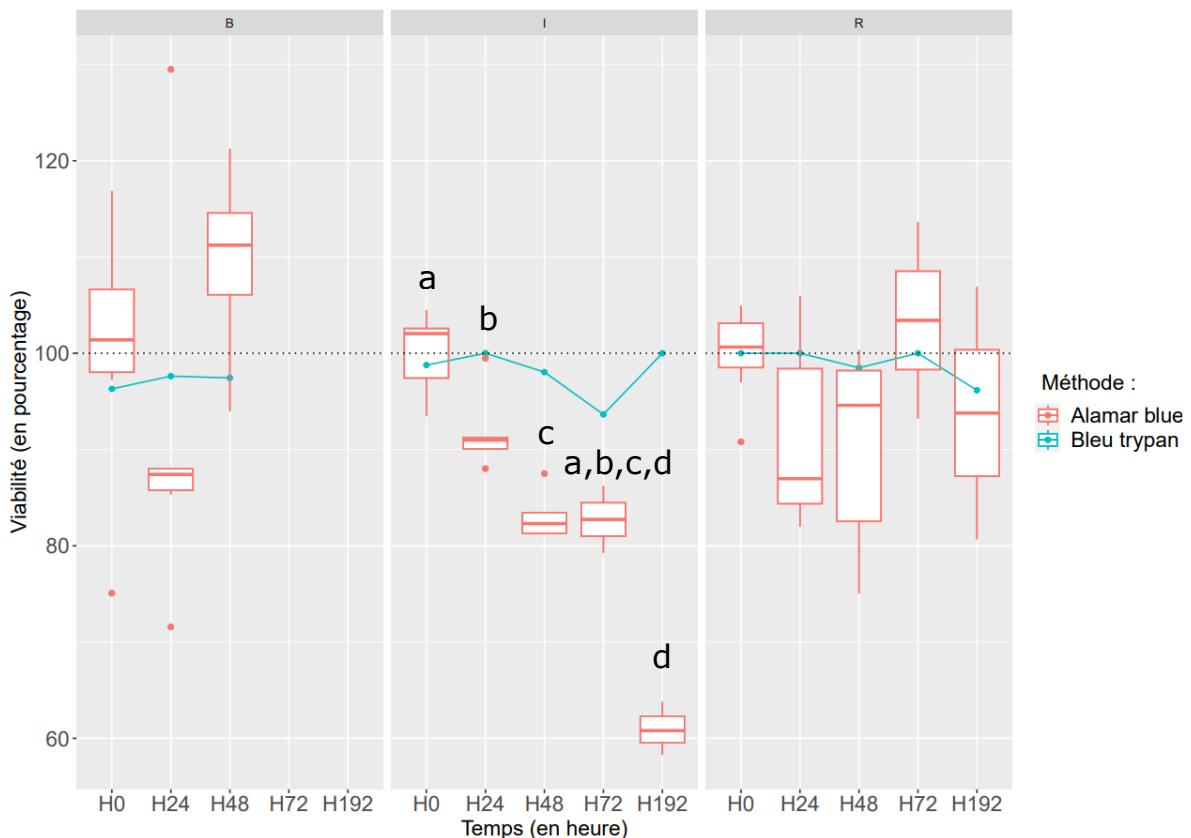
##### 4.1.1. Maintien en laboratoire

Relativement peu d'études traitent du maintien en laboratoire de *Sabellaria alveolata* pendant une longue période. Bien que quelques articles offrent certaines informations concernant les conditions de maintien de *S. alveolata* notamment l'article de Wilson en 1970 [30], aucun protocole n'est clairement détaillé. De ce fait, les conditions de maintien des organismes ont été choisies



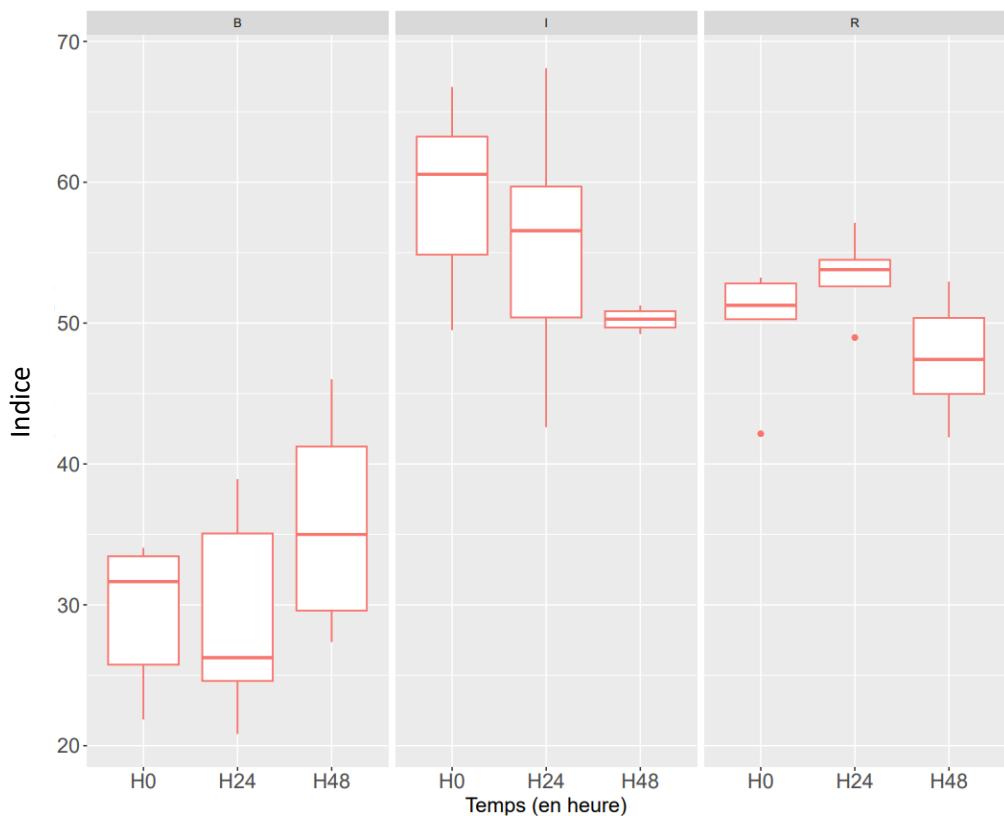
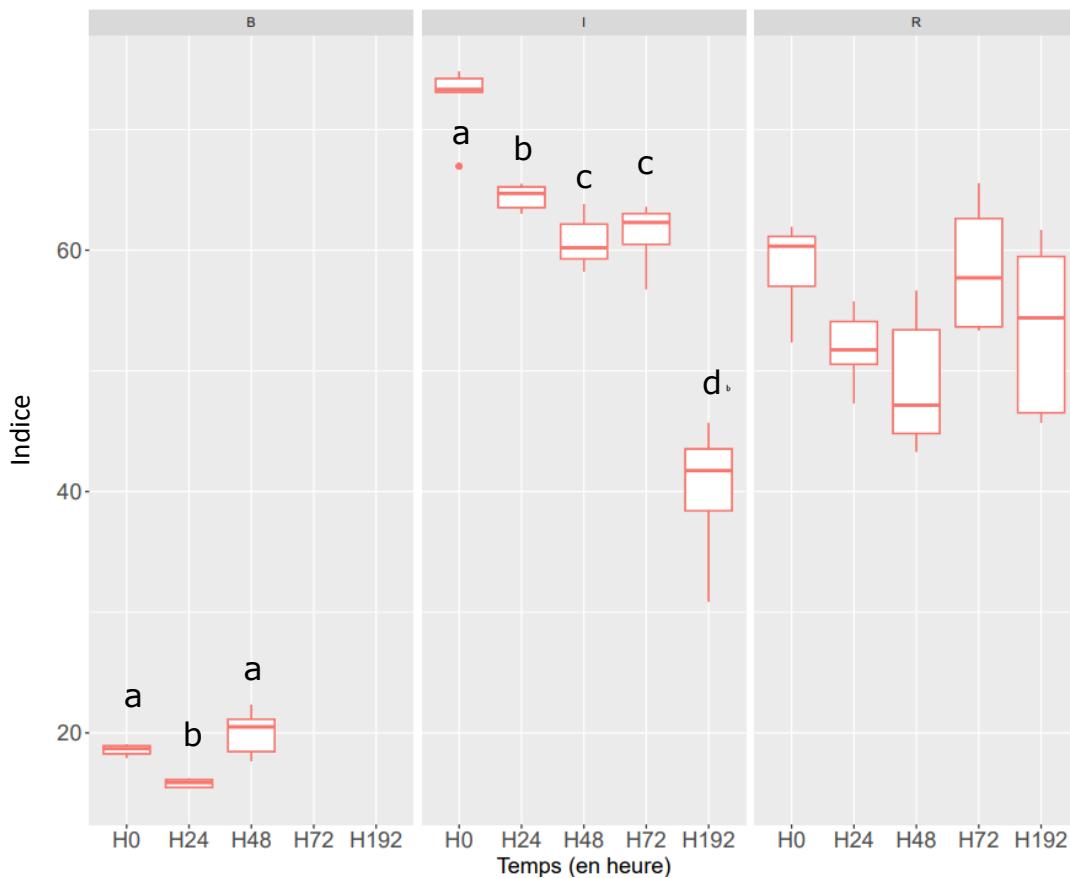


**Figure 14 :** Evolution de la viabilité, mesurées à l'aide de bleu trypan et d'Alamar blue, d'hématies de *Scrobicularia plana* au cours du temps ( $n = 5$  à 9). Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes pour les résultats obtenus avec l'Alamar blue ( $\alpha = 0,5$ ).



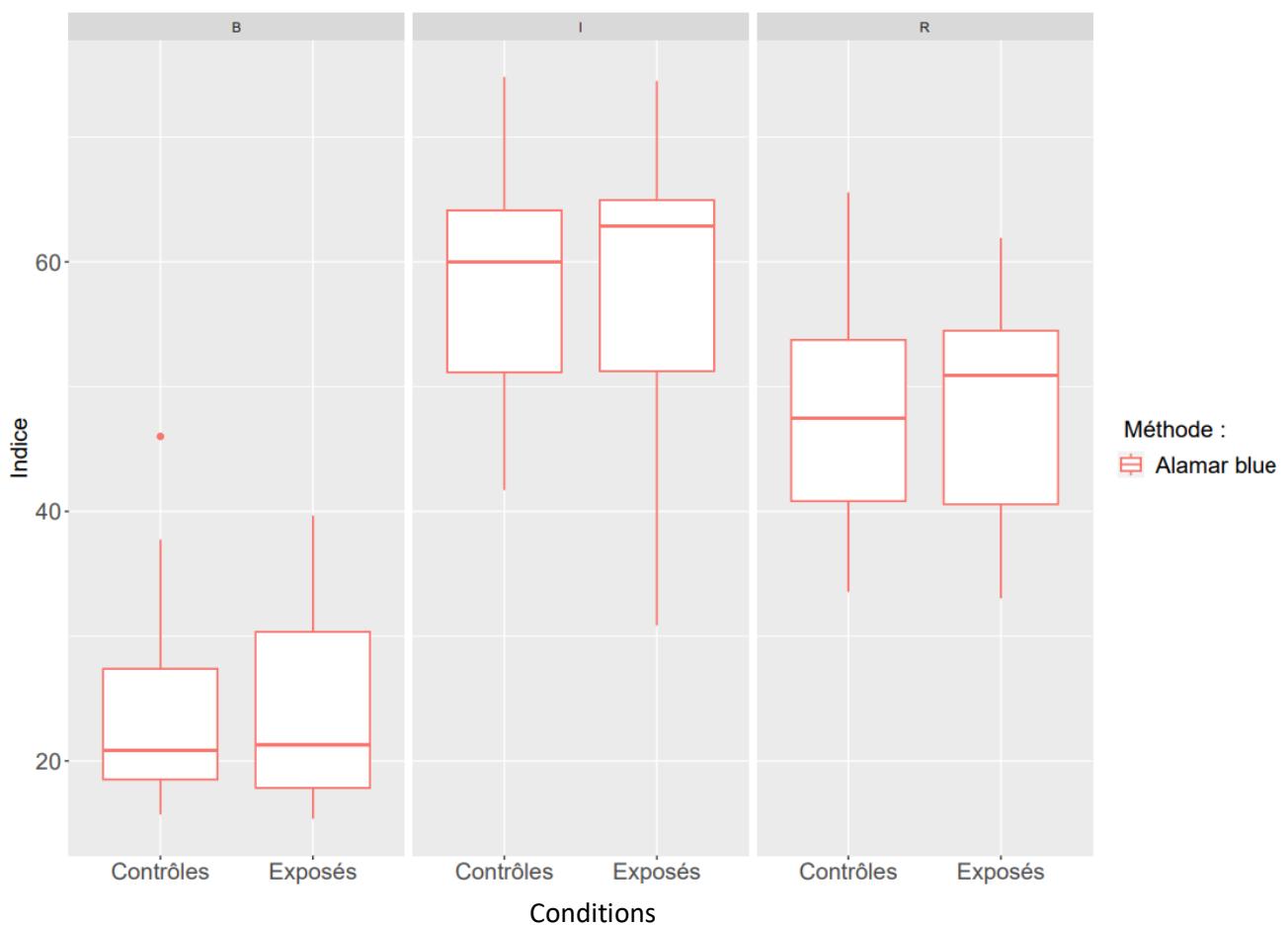
**Figure 15 :** Evolution de la viabilité, mesurées à l'aide de bleu trypan et d'Alamar blue, d'hématies de *Scrobicularia plana* au cours du temps en fonction du milieu ( $n = 5$  à 9). Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes pour les résultats obtenus avec l'Alamar blue ( $\alpha = 0,5$ ).





**Figure 16** : Evolution de la viabilité, représentée par l'indice calculé à partir des données obtenues avec l'Alamar blue, en fonction du temps et du milieu de culture ( $n = 5$  à 9). Les différences significatives sont représentées par des lettres différentes pour les résultats obtenus avec l'Alamar blue ( $\alpha = 0,5$ ).





**Figure 17 :** Différence entre les conditions contrôles et exposés à des microplastiques. Ces données regroupent l'ensemble des manipulations ( $n = 5$  à 9).

en se basant sur une étude réalisée par le laboratoire en 2022 [47] concernant la fécondation *in vitro* de *Sabellaria alveolata*. Il avait été conclu dans ce rapport que les organismes ne semblent pas être sensibles à des chaleurs excédant 20 °C qui, au contraire, semblaient améliorer la reproduction. Les organismes ont donc été placés dans les mêmes conditions au sein d'une pièce où la température n'est pas régulée. Peu de mortalité au sein des différents échantillons a été observée ce qui laisse entendre une bonne résistance de ces organismes aux variations de température. De plus aucune alimentation externe n'a été prodiguée, les composants de l'eau du site qui avait été prélevée au même

moment que les organismes ont suffi à maintenir les organismes en vie pendant plus d'un mois. Cet organisme semble bien supporter le maintien en laboratoire pendant une période d'environ un mois et demi.

#### 4.1.2. Fécondation *in vitro*

Concernant la fécondation *in vitro*, un rapide test avait été effectué peu de temps après le prélèvement des organismes. Ce test a permis de confirmer la maturité sexuelle des organismes et la présence des deux sexes dans les différents massifs, bien qu'il semblait y avoir une majorité de mâles. Ce test s'est montré concluant et a permis de réaliser les



photos de l'évolution des différents stades de développement. De nouveaux tests ont été réalisés une semaine et demie après le prélèvement, une difficulté pour trouver des individus mâles a été observée. De plus après extraction des gamètes mâles, une absence de leur mobilité a été observée. En effet, les spermatozoïdes semblaient pour la plupart immobiles ou très peu mobiles empêchant la fécondation. Les conditions de maintien en laboratoire ont, semble-t-il, induit une anomalie au niveau des individus mâles engendrant une asthénozoospermie.

La fécondation *in vitro* n'étant plus possible, de nouveaux organismes ont été prélevés et placés dans un environnement plus frais avec des températures dépassant rarement 20°C. Après de nouveaux tests de fécondation, les gamètes mâles des nouveaux individus étaient plus mobiles mais pas aussi mobiles que lors du premier test de fécondation *in vitro*. De plus, une température supérieure à 20°C induisait l'éclatement des ovules et donc l'échec de la fécondation. La température semble donc être un élément clef concernant la reproduction des organismes. En effet dans une précédente étude, un test de fécondation *in vitro* s'étant montré concluant avait été réalisé. Durant cette étude, toutes les manipulations se sont déroulées dans une salle climatisée allant de 12°C à 18°C, les auteurs ont supposé qu'une faible amplitude de température était bénéfique pour la santé de *Sabellaria alveolata* [30]. Cependant, une autre étude indique que des températures plus élevées favorisent la fécondation [62], il est donc nécessaire de poursuivre les expérimentations pour clarifier l'effet de la température aussi bien sur la survie des organismes adultes que sur la fécondation

## 4.2. *Scrobicularia plana*

### 4.2.1. Mise au point du protocole

Aucune étude n'a encore été réalisée concernant la mise au point d'une culture primaire d'hémocytes de *Scrobicularia plana*. A l'inverse, beaucoup d'études ont déjà travaillé sur d'autres organismes tels que *Mytilus edulis* ou *Ruditapes decussatus* [41, 43], il était donc nécessaire d'adapter le protocole pour cette espèce. En effet bien qu'il s'agisse du même type cellulaire, de fortes différences ont été observées notamment au niveau de leur adhérence. Les hémocytes sont connus pour avoir une forte adhérence qu'importe la surface [50] d'où l'utilisation de solution d'ALS et d'un protocole adapté [41]. Or, les hémocytes de *S. plana* possèdent une faible adhérence rendant impossible l'utilisation de protocole déjà établie pour réaliser une culture primaire d'hémocytes car ceux-ci effectuaient des changements de milieux. Ce changement de milieu induisait donc une perte trop importante d'hémocytes de *S. plana*.

Concernant la viabilité cellulaire, dans la plupart des cas celle-ci est déterminée par bleu trypan, par Alamar blue ou par test MTT [41, 42, 54]. Le test MTT a rapidement été mis en œuvre et ne s'est pas montré concluant. En effet, la quantité d'hémocytes prélevé sur *S. plana* est relativement faible empêchant l'ensemencement avec une forte concentration malgré la réalisation de centrifugation pour concentrer l'échantillon. La trop faible concentration de cellule empêche une bonne mesure de la viabilité par le test MTT.

Le test au bleu trypan a également été effectué. Bien que ce test permette effectivement de visualiser les cellules mortes (cela a été confirmé avec un control positif à l' $H_2O_2$ ), il semblerait que ce colorant rencontre des difficultés à pénétrer dans les hémocytes de *Scrobicularia plana* lorsque celle-ci ne sont



pas radicalement mortes. De plus, le bleu trypan est une méthode de viabilité largement utilisée mais peu précise. Cette imprécision est premièrement liée à l'incertitude lors du comptage notamment lorsqu'un grand nombre d'échantillons est analysé [45] et à une mauvaise coloration de certains types cellulaires ou dans certaines conditions. En effet, dans certains cas le bleu trypan peut colorer des cellules vivantes lorsqu'elles sont exposées pendant un certain temps au colorant où lorsqu'elles présentent des pores dans leur membrane [44, 46].

Le test d'Alamar blue a donc été choisi et adapté pour la culture d'hémocytes de cette espèce. Sachant que ce test de viabilité n'induit pas de mortalité [51], il peut être incubé pendant assez longtemps pour détecter des cellules viables même en faible concentration. Après le test de plusieurs temps d'incubation, une incubation de 4h et 24h a finalement été choisie pour une meilleure précision. De plus, ce test peut être utilisé même en présence de rouge de phénol dans le milieu évitant ainsi un changement de milieu [48]. Le test de viabilité a été testé en amont en présence d'un contrôles positif (50% d'éthanol) pour s'assurer du bon fonctionnement de celui-ci.

Un problème de contamination a également eu lieu lors de la réalisation de quelques ensemencements. Sachant que le prélèvement de l'hémolymphé n'est pas stérile, des organismes (bactéries, virus, protozoaire etc...) se retrouvent indubitablement dans les différents échantillons. La présence d'antibiotiques dans les différents milieux testés permet de remédier en grande partie à ce problème. Cependant, pour certains puits, la contamination faussait les résultats obtenus à l'aide de l'Alamar blue. En effet, l'Alamar blue permet de détecter la présence d'hémocytes mais également de tout organisme vivant se trouvant dans l'échantillon. La présence d'organismes étrangers pose d'autant plus de

problème que l'Alamar blue est incubé pendant longtemps, ce qui peut augmenter leur influence pour le résultat final. Pour corriger ce problème, il serait intéressant de réaliser à l'avenir une stérilisation des organismes avec de l'eau de javel par exemple comme cela a déjà été réalisé sur *Mytilus edulis* [41] ; en s'assurant que cela ne perturbe pas les hémocytes.

#### 4.2.2. Viabilité cellulaire

L'objectif de ces manipulations était de déterminer si les hémocytes de *Scrobicularia plana* pouvaient être maintenus pendant un certain temps, et ce malgré un stress supplémentaire engendré par la présence de microplastique ; tout en testant divers milieux de culture communément utilisés pour la culture primaire d'hémocytes d'autres espèces. Ceci permettait, *in fine*, d'utiliser la culture d'hémocytes de *Scrobicularia plana* dans le cadre d'étude écotoxicologiques.

##### 4.2.2.1. Effet du temps sur la viabilité des hémocytes

En prenant en compte l'ensemble des données obtenues qu'importe le milieu, une première diminution d'environ 10% de la viabilité est observée après 24h d'incubation. Une seconde diminution de la viabilité, cette fois-ci d'environ 40 %, est observée après 192h. Sachant que les indices, et par conséquent la viabilité, sont obtenus après 24h d'incubation en présence d'Alamar blue, cette diminution importante de viabilité est engendrée après 216h d'incubation, soit 9 jours. Les hémocytes peuvent donc être maintenus pendant un temps relativement long malgré une diminution importante de la viabilité observé après 9 jours. Pour plus de précision sur le comportement des hémocytes au cours du temps, il est nécessaire de s'intéresser aux différents milieux utilisés.



#### 4.2.2.2. Effet du milieu sur la viabilité des hémocytes

En regardant plus en détail la viabilité en fonction des milieux, les hémocytes ne réagissent pas de la même manière selon les milieux. En effet une diminution de la viabilité est observée pour le milieu I, composé principalement de HBSS, ce qui n'est pas observé pour le milieu R et B qui eux sont composés de L-15. Aucune culture primaire d'hémocytes de *Scrobicularia plana* n'ayant été mis au point, seule une comparaison avec des cultures d'autres organismes est possible. Ainsi, les hémocytes de *Ruditapes decussatus* peuvent être maintenu 3 jours dans l'HBSS et 7 jours dans du L-15 avant l'apparition d'une mortalité cellulaire [43] ; alors que ceux de *Mytilus galloprovincialis*, pendant de 20 jours dans du L-15 [53]. Le milieu L-15 semble donc maintenir les hémocytes dans de meilleures conditions que le HBSS ou encore l'eau de mer comme cela a été observé. Cependant, le milieu de culture préférentiel des hémocytes varie grandement d'une espèce à l'autre [65].

De plus, le milieu I ne permet pas une bonne analyse de la viabilité avec le bleu trypan qui ne suit pas la viabilité obtenue à l'aide de l'Alamar blue. Enfin, les résultats obtenus avec le milieu B semblent peu cohérents, liés à une variabilité intra condition importante. Il serait donc intéressant de répéter les manipulations afin d'avoir une réponse plus précise de la viabilité des hémocytes en fonction du temps et du milieu.

#### 4.2.2.3. Effet de l'exposition aux microplastiques sur la viabilité des hémocytes

L'exposition des hémocytes à des microplastiques avait pour objectif d'induire un stress supplémentaire pour déterminer si malgré celui-ci, les hémocytes parvenaient à être maintenus pendant un certain temps. D'après les résultats obtenus, ce stress ne

semble pas induire une diminution de la viabilité quels que soit le temps ou le milieu utilisés.

### 5. Conclusion

L'objectif de ces expériences était de caractériser la faisabilité de nouveaux modèles *in vitro* en écotoxicologie.

L'ensemble des expérimentations mène à conclure que les hémocytes de *Scrobicularia plana* peuvent être maintenu pendant au moins 9 jours dans du L-15 sans diminution de la viabilité. Lorsque ces résultats seront confirmés via la multiplication des manipulations pour obtenir des données plus importantes, les hémocytes de *Scrobicularia plana* pourront être utilisés dans le cadre d'études d'écotoxicité. De plus, les microplastiques de polyéthylènes n'induisent pas de mortalité supplémentaire chez les hémocytes de cette espèce quel que soit le temps testé, permettant ainsi l'utilisation de ce type cellulaire dans des missions de biosurveillance, soulignant l'intérêt de cette espèce en tant qu'espèce sentinelle. L'étude de biomarqueurs pourra également être réalisée à l'avenir sur ces hémocytes en adaptant de la même manière les différents protocoles pour s'adapter aux caractéristiques des cellules de cette espèce.

Concernant *Sabellaria alveolata*, les organismes peuvent être maintenus en laboratoire pendant un temps relativement long permettant à l'avenir la réalisation d'exposition *in vivo* en présence de divers polluants. Concernant la fécondation *in vitro*, l'extraction des gamètes et le protocole sont simples mais très sensibles à différent facteurs abiotiques. En effet, une température égale ou inférieure à 18°C avec une faible variation de cette température est indispensable pour une bonne fécondation et développement des organismes. De plus pour que la fécondation se produise, il est nécessaire d'utiliser un volume de milieu conséquent de plusieurs



millilitres. Des tests toxicologiques et écotoxicologiques de fécondation *in vitro* sont déjà réalisés sur des poissons zèbres notamment (OCDE 236). Cependant ces tests sont réalisés en plaque 96 puits pour permettre de tester un grand nombre de conditions différentes. Si la fécondation *in vitro* de *Sabellaria alveolata* ne peut être réalisée dans des petits volumes, cela nécessiterait de nouvelles expériences afin d'optimiser la méthodologie d'obtention des larves de *Sabellaria alveolata* avant de pouvoir les utiliser pour la réalisation de tests écotoxicologiques en routine.

## 6. Perspective

Durant cette étude, il a été démontré que les hémocytes de *Scrobicularia plana* sont capables d'être maintenus pendant quelques jours sans provoquer de mortalité importante. De plus l'ajout d'un stress additionnel, ici via l'exposition à des microplastiques, ne provoque pas de surplus de mortalité. De ce fait, il serait intéressant de mettre en place un protocole permettant l'analyse de biomarqueurs déjà utilisés sur les hémocytes tels que leur intégrité membranaire, le potentiel de la membrane mitochondriale, la phagocytose ou encore la fonctionnalité des transporteurs ABC [52, 63,

64] en présence de microplastiques pour identifier un potentiel effet de ce contaminant. Il serait également intéressant de réaliser la même manipulation en utilisant cette fois-ci des nanoplastiques. Sachant que ces plastiques peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules, à l'inverse des microplastiques [20, 21], cela pourrait induire une diminution de la viabilité.

Concernant *Sabellaria alveolata*, il est important de trouver une méthode de fécondation *in vitro* en utilisant de petits volumes de milieu sans quoi, il sera difficile d'utiliser ce modèle pour des tests d'écotoxicités en routine. Cependant, l'organisme en lui-même peut être maintenu en laboratoire sur une longue durée. Cette caractéristique rend possible l'utilisation de *Sabellaria alveolata* pour des expositions *in vivo* à de potentiels contaminants, afin de caractériser leurs effets sur ce modèle via l'étude de biomarqueurs tels que des biomarqueurs de stress oxydant ou immunitaires.

---

## 7. Remerciements

Dans un premier temps je tiens à remercier particulièrement mes maîtres de stage Antoine Le Guernic et Didier Georges pour m'avoir accompagné du premier jour de mon stage, jusqu'à la réalisation de mon rapport. Ils m'ont été d'une grande aide lors de ce stage, et m'ont permis de renforcer mon idée de poursuivre dans la recherche. Je remercie également toute l'équipe BIOSSE qui m'a aidé durant mes manipulations, particulièrement Clémentine Labbé sur le modèle de *Scrobicularia plana*. Je remercie également toutes les personnes qui ont été d'une grande aide pour la récupération des différents organismes ; merci à Antoine Le Guernic, Didier Georges, Clémentine Labbé, Lalie Supiot et Nicolas Le Leurch. Je remercie également Amélie Châtel pour m'avoir proposé les offres de stage de son équipe.



## 8. Bibliographie

1. Samanta, S. K. Et al., **(2002)**. "Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation". *TRENDS in Biotechnology*, 20(6), 243-248.
2. Pinto, J. C. **(2012)**. "Impactos ambientais causados pelos plásticos: Uma discussão abrangente sobre os mitos e os dados científicos-2a edição". Editora E-papers.
3. Bishop, G. et al., **(2020)**. "Recycling of European plastic is a pathway for plastic debris in the ocean". *Environment International*, 142, 105893.
4. Lampitt, R. S. et al., **(2023)**. "Stakeholder alliances are essential to reduce the scourge of plastic pollution". *nature communications*, 14(1), 2849.
5. Jambeck, J. R. et al., **(2015)**. "Plastic waste inputs from land into the ocean". *Science*, 347(6223), 768-771.
6. Andrady, A. L., **(2015)**. "Persistence of plastic litter in the oceans". *Marine anthropogenic litter*, 57-72.
7. Bell, K. Y. et al., **(2011)**. "Emerging pollutants". *Water Environment Research*, 83(10), 1906-1984.
8. Deblonde, T. et al., **(2011)**. "Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature". *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 442-448.
9. Avio, C. G. et al., **(2017)**. "Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat". *Marine environmental research*, 128, 2-11.
10. Chamas, A. et al., **(2020)**. "Degradation rates of plastics in the environment". *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494-3511.
11. George, M., & Fabre, P. **(2021)**. "Floating plastics in oceans: A matter of size". *Current opinion in green and sustainable chemistry*, 32, 100543.
12. Lusher, A. **(2015)**. "Microplastics in the marine environment: distribution, interactions and effects". *Marine anthropogenic litter*, 245-307.
13. Eerkes-Medrano, D. et al., **(2015)**. "Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs". *Water research*, 75, 63-82.
14. Taylor, M. L. et al., **(2016)**. "Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms". *Scientific reports*, 6(1), 33997.
15. Ismail, M. R. et al., **(2018)**. "Microplastics Ingestion by fish in the Biawak Island". *World Scientific News*, (106), 230-237.
16. Cherel, Y. et al., **(2017)**. "Feeding ecology, isotopic niche, and ingestion of fishery-related items of the wandering albatross *Diomedea exulans* at Kerguelen and Crozet Islands". *Marine Ecology Progress Series*, 565, 197-215.
17. Hoarau, L. et al., **(2014)**. "Ingestion and defecation of marine debris by loggerhead sea turtles, *Caretta*



- caretta*, from by-catches in the South-West Indian Ocean". *Marine Pollution Bulletin*, 84(1-2), 90-96.
- 18.** Kögel, T. et al., (2020). "Micro-and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors". *Science of the Total Environment*, 709, 136050.
- 19.** Pattiarchi, C. et al., (2022). "Plastics in the Indian Ocean—sources, transport, distribution, and impacts". *Ocean Science*, 18(1), 1-28.
- 20.** Bucci, K. et al., (2020). "What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review". *Ecological Applications*, 30(2), e02044.
- 21.** Yin, K. et al., (2021). "A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system". *Science of The Total Environment*, 774, 145758.
- 22.** Hahladakis, J. N. et al., (2018). "An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling". *Journal of hazardous materials*, 344, 179-199.
- 23.** Bolívar-Subirats, G. et al., (2021). "Occurrence, toxicity and risk assessment of plastic additives in Besos river, Spain". *Chemosphere*, 263, 128022.
- 24.** Ward, J. E. et al., (2019). "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". *Environmental science & technology*, 53(15), 8776-8784.
- 25.** Minguez, L. et al., (2011). "Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) parasites: potentially useful bioindicators of freshwater quality?". *Water research*, 45(2), 665-673.
- 26.** SANFILIPPO, R. et al., (2020). "Distribution of *Sabellaria alveolata* (Polychaeta *Sabellariidae*) in the Mediterranean Sea: update and new findings". *Zoosymposia*, 19, 198-208.
- 27.** Dubois, S. et al., (2002). "Biodiversity associated with *Sabellaria alveolata* (Polychaeta: Sabellariidae) reefs: effects of human disturbances". *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82(5), 817-826.
- 28.** Dubois, S. et al., (2003). "Efficiency of particle retention and clearance rate in the polychaete *Sabellaria alveolata* L". *Comptes Rendus Biologies*, 326(4), 413-421.
- 29.** Dubois, S. et al., (2007). "Distribution and retention of *Sabellaria alveolata* larvae (Polychaeta: *Sabellariidae*) in the bay of Mont-saint-Michel, France". *Marine Ecology Progress Series*, 346, 243-254.
- 30.** Wilson, D. P. (1970). "Additional observations on larval growth and settlement of *Sabellaria alveolata*". *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 50(1), 1-31.
- 31.** Métais, I. et al., (2023). "Continuum from microplastics to nanoplastics: effects of size and source on the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*". *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.
- 32.** Buffet, P. E. et al., (2014). "A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: the ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*". *Science of the Total Environment*, 470, 1151-1159.



- 33.** Châtel, A. et al., (2017). "Spermatozoa: A relevant biological target for genotoxicity assessment of contaminants in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*". *Marine Pollution Bulletin*, 116(1-2), 488-490.
- 34.** Ribeiro, F. et al., (2017). "Microplastics effects in *Scrobicularia plana*". *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 379-391.
- 35.** O'Donovan, S. et al., (2018). "Ecotoxicological effects of chemical contaminants adsorbed to microplastics in the clam *Scrobicularia plana*". *Frontiers in marine science*, 5, 143.
- 36.** Sauvé, S. et al., (2002). "Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn)". *Aquatic toxicology*, 58(3-4), 189-200.
- 37.** Mourton, C. et al., (1992). "Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: *Ascetospora*) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: *Bivalvia*): in vitro system establishment". *Journal of Invertebrate Pathology*, 59(3), 235-240.
- 38.** Le Guernic, A. et al., (2020). "Cellular and molecular complementary immune stress markers for the model species *Dreissena polymorpha*". *Fish & Shellfish Immunology*, 107, 452-462.
- 39.** FISIER, W. S. (1988). "Environmental influence on bivalve hemocyte function". In *Am Fish Soc Symp* (Vol. 18, pp. 225-237).
- 40.** Gustafson, L. L. et al., (2005). "Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (Mollusca: *Unionidae*)". *Diseases of aquatic organisms*, 65(2), 159-165.
- 41.** Barrick, A. et al., (2018). "Investigating the establishment of primary cultures of hemocytes from *Mytilus edulis*". *Cytotechnology*, 70, 1205-1220.
- 42.** Droguet M., (2006). "Etude des caractéristiques fonctionnelles des cardiomycocytes d'huître en culture". *Thèse de doctorat de l'université de Bretagne Occidentale*.
- 43.** Ladhar-Chaabouni, R. et al., (2021). "Establishment of primary cell culture of *Ruditapes decussatus* haemocytes for metal toxicity assessment". *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 57, 477-484.
- 44.** Avelar-Freitas, B. A. et al., (2014). "Trypan blue exclusion assay by flow cytometry". *Brazilian journal of medical and biological research*, 47, 307-315.
- 45.** Kim, J. S. et al., (2011). "Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods". *Journal of clinical laboratory analysis*, 25(2), 90-94.
- 46.** Mizerska-Dudka, M., & Andrejko, M. (2014). "Galleria mellonella hemocytes destruction after infection with *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of basic microbiology*, 54(3), 232-246.
- 47.** Rinfray A., (2022). "Sabellaria alveolata, hermelle, est-il un bon modèle biologique pour des expérimentation in vitro ? ". Licence Science et vie de la terre parcours métiers de l'environnement et du développement durable, Université Catholique de l'Ouest.
- 48.** Rampersad, S. N. (2012). "Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays". *Sensors*, 12(9), 12347-12360.



- 49.** Curd, A. et al., **(2020)**. "A broad-scale long-term dataset of *Sabellaria alveolata* distribution and abundance curated through the REEHAB". REEf HABitat Project.
- 50.** Chen, J. H., & Bayne, C. J. **(1995)**. "Bivalve mollusc hemocyte behaviors: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*)". *The Biological Bulletin*, 188(3), 255-266.
- 51.** Byth, H. A. et al., **(2001)**. "Assessment of a simple, non-toxic alamar blue cell survival assay to monitor tomato cell viability". *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 12(5), 340-346.
- 52.** Kladchenko, E. S. et al., **(2023)**. "Functional changes in hemocytes and antioxidant activity in gills of the ark clam *Anadara kagoshimensis* (Bivalvia: Arcidae) induced by salinity fluctuations". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 264, 110810.
- 53.** Cao, A. et al., **(2003)**. "Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: expression of IL-2R $\alpha$  subunit". *Aquaculture*, 216(1-4), 1-8.
- 54.** Latire, T. et al., **(2012)**. "Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride". *Aquatic toxicology*, 109, 213-221.
- 55.** Quinn, B. et al., **(2009)**. "Development of an in vitro culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)". *Cytotechnology*, 59, 121-134.
- 56.** Hartl, M. G. et al., **(2010)**. "Maintenance of bivalve hemocytes for the purpose of delayed DNA strand break assessment using the comet assay". *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(1), 64-68.
- 57.** Evariste, L. et al., **(2017)**. "Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*". *Ecotoxicology and environmental safety*, 137, 78-85.
- 58.** Le Foll, F. et al., **(2010)**. "Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging". *Fish & shellfish immunology*, 28(2), 372-386.
- 59.** Barjhoux, I. et al., **(2020)**. "A new protocol for the simultaneous flow cytometric analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes". *Fish & shellfish immunology*, 98, 224-235.
- 60.** Rioult, D. et al., **(2013)**. "Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro". *Cytotechnology*, 65, 749-758.
- 61.** Sokolnikova, Y. N. et al., **(2015)**. "Fluorescent in vitro phagocytosis assay differentiates hemocyte activity of the bivalve molluscs *Modiolus kuriensis* (Bernard, 1983) inhabiting impacted and non-impacted water areas". *Russian Journal of Marine Biology*, 41, 118-126.
- 62.** YVES, G. **(1982)**. "Recherches sur l'écologie des "récifs" d'Hermelles édifiés par l'Annélide Polychète *Sabellaria alveolata* (LINNE)". Thèse de Doctorat d'État, Sciences naturelles, Université de Nantes, 238p.
- 63.** Parisi, M. G. et al., **(2021)**. "Effects of organic mercury on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and morphology". *Journal of Comparative Physiology B*, 191, 143-158.



- 64.** Magni, S. et al., (2017). "Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*". *Science of the Total Environment*, 578, 452-459.
- 65.** Le Pabic, C. et al., (2013). "Haemocyte primary-culture from three mollusc species and its application in ecotoxicology". *Cytotechnology*, 65, 688.



## Annexe 1

| Modèle utilisé                   | Méthode d'extraction                                  | Méthode de dénombrement et viabilité  | Milieu de culture utilisé | Température d'incubation | Source |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------|
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | Muscle adducteur postérieur                           | Neubauer hemocytometre et bleu trypan | Milieu A                  | /                        | [53]   |
| <i>Crassostrea gigas</i>         | /   | Bleu trypan et MTT                    | Milieu B                  | /                        | [42]   |
| <i>Haliotis tuberculata</i>      | Au niveau de « l'abalone foot » avec une aiguille 25G | Cytomètre en flux et MTT              | Milieu C et D             | 17°C                     | [54]   |
| <i>Dreissena polymorpha</i>      | /   | Bleu trypan                           | Milieu E                  | /                        | [55]   |
| <i>Mytilus edulis</i>            | Muscle adducteur postérieur avec une aiguille 21G     | /                                     | Milieu F et G             | /                        | [56]   |
| <i>Dreissena polymorpha</i>      | Muscle adducteur postérieur avec une aiguille 29G     | Cytomètre en flux                     | Milieu H                  | 16°C                     | [57]   |
| <i>Ruditapes decussatus</i>      | Muscle adducteur postérieur                           | Cytomètre en flux                     | Milieu I, J, K et L       | Température ambiante     | [43]   |
| <i>Mytilus edulis</i>            | Muscle adducteur postérieur avec une aiguille 22G     | Cellule de Malassez                   | Milieu M                  | /                        | [58]   |
| <i>Dreissena polymorpha</i>      | /   | /                                     | Milieu N                  | 16°C                     | [59]   |
| <i>Mytilus edulis</i>            | Muscle adducteur postérieur avec une aiguille 22G     | MTT                                   | Milieu O                  | 14°C                     | [60]   |
| <i>Modiolus kurilensis</i>       | Muscle adducteur postérieur                           | /                                     | Milieu P                  | 17°C                     | [61]   |
| <i>Mytilus edulis</i>            | Muscle adducteur postérieur                           | Cellule de Malassez et bleu trypan    | Milieu R                  | 18°C                     | [41]   |



## Annexe 2

### Produits utilisés

| Produit                               | Référence      |
|---------------------------------------|----------------|
| Milieu L-15                           | SIGMA - L1518  |
| Milieu HBSS                           | SIGMA - H1641  |
| NaCl                                  | SIGMA - S3014  |
| KCl                                   | SIGMA - P4504  |
| CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O | SIGMA - 223506 |
| MgSO <sub>4</sub>                     | SIGMA - M7505  |
| MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O | SIGMA - M9272  |
| HEPES                                 | SIGMA - H7006  |
| L-glutamine                           | SIGMA - 49419  |
| Pénicilline G                         | SIGMA - P3032  |
| Gentamicine                           | SIGMA - G1264  |
| Streptomycine                         | SIGMA - S9137  |

### Composition milieu L-15 utilisé

| Produit   | Concentration en g/L |
|---|----------------------|
| CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O           | 0,185                |
| MgCl <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O           | 0,2                  |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 0,09767              |
| KCl   | 0,4                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,06                 |
| NaCl  | 8,0                  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 0,19                 |
| Ensemble d'AA et vitamines (Cf fiche technique) |                      |
| D-galactose                                     | 0,86                 |
| Rouge de phénol                                 | 0,011                |
| Acide pyruvique                                 | 0,55                 |
| L-glutamine                                     | Pas indiqué          |

### Composition du milieu HBSS 1X

| Produit                               | Concentration en g/L |
|---------------------------------------|----------------------|
| CaCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O | 0,185                |
| MgSO <sub>4</sub>                     | 0,09767              |
| KCl                                   | 0,4                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 0,06                 |
| NaCl                                  | 8,0                  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,04788              |
| D-glucose                             | 1,0                  |
| Rouge de phénol                       | 0,011                |
| NaHCO <sub>3</sub>                    | 0,35                 |



