

2023-2024

Mention Toxicologie Ecotoxicologie

Spécialité Toxicologie Humaine et Environnementale

Effets de l'ingestion de nanoplastiques par *Drosophila melanogaster* dans le cadre d'une exposition multigénérationnelle

-
Clémentine GOUPIL

Sous la direction de :

Chloé Richard | Doctorante

David Renault | Professeur

Stéphane Derocles | Maître de conférences

Mélanie Boël | Maître de conférences



UMR CNRS 6553 ECOBIO [(Ecosystèmes, biodiversité, évolution)], Université Rennes

Engagement de non-plagiat

Je, soussigné(e), ..Goupil.Clémentine.....

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.

Nom-Prénom :Goupil.Clémentine.....

Fait le 03/06/24 à Rennes



Effets de l'ingestion de nanoplastiques par *Drosophila melanogaster* dans le cadre d'une exposition multigénérationnelle

Résumé

La production mondiale de plastique ne cesse d'augmenter, menant à l'accumulation de petites particules de plastique dans l'environnement tels que les nanoplastiques (NP). Un fort intérêt a été porté aux NP en raison du potentiel toxique qu'ils pourraient exercer sur les différents écosystèmes. Les effets de cette pollution émergente sur les organismes terrestres, notamment les insectes, restent cependant méconnus. L'objectif est de déterminer les effets phénotypiques et physiologiques de l'ingestion des NP par un invertébré terrestre (*Drosophila melanogaster*) exposé continuellement aux NP sur dix générations. Les drosophiles ont été exposées à 3 concentrations de NP (1,05 µg, 105 µg et 525 µg/g de nourriture) et les effets phénotypiques et physiologiques ont été mesurés sur la dixième génération. Les traits phénotypiques étudiés sont: la viabilité, le temps de développement et la fécondité. Les traits physiologiques investigués sont: les activités d'enzymes antioxydantes (CAT et SOD) ainsi que la peroxydation lipidique par la production de MDA. L'exposition à une forte concentration de NP a un effet significatif sur la SOD avec une augmentation de son activité. Les autres traits physiologiques analysés demeurent inchangés. Les traits phénotypiques de la drosophile ont faiblement été impactés: un déclin de la viabilité chez les adultes est tout de même observé à la plus forte concentration d'exposition.

Mots-clés: nanoplastiques de polystyrène, *Drosophila melanogaster*, exposition multigénérationnelle, stress oxydatif, traits d'histoire de vie

Abstract

Global plastic production is constantly increasing, leading to the accumulation of small plastic particles in the environment, such as nanoplastics (NP). There has been a great deal of interest in NP because of the toxic potential they could exert on different ecosystems. However, the effects of this emerging pollution on terrestrial organisms, particularly insects, remain poorly understood and documented. The aim of this work is to determine the phenotypic and physiological effects of NP ingestion on a terrestrial invertebrate (*Drosophila melanogaster*) continuously exposed to NP over ten generations. Drosophila were exposed to 3 concentrations of NP (1.05 µg, 105 µg and 525 µg/g food) and the phenotypic and physiological effects were measured on the 10th generation. The impact of NP on phenotypic traits was characterized with the following measurements: viability, development time, and fecundity. The impact of NP on physiological traits was characterized by measuring: the activities of antioxidant enzymes (CAT and SOD) as well as the lipid peroxidation through MDA production. Exposure to a high NP concentration showed a significant effect on SOD, with an increase in its activity. The other physiological traits analyzed remained unchanged. Drosophila life-history traits were only slightly affected: a decline in viability was observed in adults at the highest exposure concentration.

Keywords: polystyrene nanoplastics, *Drosophila melanogaster*, multi-generational exposure, oxidative stress, life history traits

Abréviations

MP = microplastiques
NP = nanoplastiques
PS = polystyrène
ROS = reactive oxygen species
SOD = superoxyde dismutase
CAT = catalase
MDA = malondialdéhyde
H ₂ O ₂ = peroxyde d'hydrogène
NBT = nitrobleu de tétrazolium
BSA = albumine de sérum bovin

Introduction

Les premiers plastiques synthétiques sont apparus au début du 20ème siècle et ont été mondialement répandus après la seconde guerre mondiale (Geyer *et al.*, 2017). En 2015, environ 6300 millions de tonnes métriques de déchets plastiques avaient été produits dont seulement 9% recyclés (Geyer *et al.*, 2017). Le dépôt des matières plastiques dans les décharges, l'utilisation de plastiques en agriculture (plasticulture) (Huang *et al.*, 2020), le rejet dans les eaux usées, les eaux de ruissellement, les retombées atmosphériques, l'épandage de boues d'épurations fertilisantes contaminées par les plastiques (van den Berg *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2023; Kiran *et al.*, 2022) constituent des sources très importantes de transfert et de dissémination des plastiques dans l'environnement. La présence de déchets plastiques dans les milieux marins commence à être bien documentée, et a reçu beaucoup d'attention de la part du grand public et de la communauté scientifique. Plus récemment, des études ont documenté les quantités de plastique dans les sols agricoles, les effluents urbains, ou encore les rivières (Kieu-Le *et al.*, 2023; Nizzetto *et al.*, 2016).

Par différents processus biotiques et abiotiques, les plastiques sont fragmentés en plus petites particules, i.e., les microplastiques (MP) et les nanoplastiques (NP). Les NP correspondent aux particules de plastique avec

une taille allant de 1 à 1000 nm (Gigault *et al.*, 2018). Il existe deux catégories de NP, les primaires, présents originellement sous cette forme et les secondaires, générés par la dégradation de produits plastiques (Junaid *et al.*, 2023). Les NP secondaires sont générés lors de processus physico-chimiques par photo-oxydation ou par oxydation chimique ainsi que par des processus biotiques comme par dégradation bactérienne (Hale *et al.*, 2020). La dégradation des plastiques dans l'environnement reste cependant un processus encore mal compris qui pourtant régit le devenir et l'impact qu'ont les NP sur la faune et la flore (Zhang *et al.*, 2021). A ce jour, très peu d'études ont été menées sur les NP, soulignant un besoin urgent de caractériser leur toxicité et leur mécanisme d'action sur les organismes terrestres. De telles recherches sur des modèles terrestres sont d'autant plus importantes en raison d'une production et d'une consommation de plastique qui se déroulent majoritairement sur terre (Horton *et al.*, 2018). Les organismes terrestres présentent ainsi des risques majeurs d'exposition aux déchets plastiques, et la connaissance de l'effet de ces polluants sur des modèles tels que les insectes, acteurs importants de nombreux services écosystémiques, est cruciale (Chae *et al.*, 2018).

La concentration en NP dans les compartiments terrestres est difficile à déterminer (Renault *et al.*, 2024). La complexité de la matrice solide, la présence d'additifs et de co-contaminants compliquent l'extraction (Hurley *et al.*, 2018) et la détermination d'une concentration en NP dans les sols. Des concentrations d'exposition de l'ordre du µg/L ont été proposées comme étant pertinentes en tant que concentrations environnementales (Al-Sid-Cheikh *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). L'exposition des organismes terrestres aux NP se fait principalement par ingestion (Cox *et al.*, 2019). Une fois dans l'organisme, les plastiques s'accumulent au niveau de l'intestin et du jabot (Tu *et al.*, 2023)

et rejoignent l'hémolymphe de la drosophile (Alaraby *et al.*, 2022) favorisant la distribution à une grande partie des organes dont les gonades (Tu *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2017). Cette accumulation des NP par ingestion présente un danger pour la santé des invertébrés terrestres (Bhagat *et al.*, 2021).

La toxicité générée par les NP dépend étroitement de leurs propriétés: taille, forme, concentration, type de polymère (Junaid *et al.*, 2023). La taille des NP facilite leur ingestion et diffusion dans l'organisme en parallèle du rôle possible de vecteur pour des co-contaminants, e.g. rôle de cheval de Troie. La forme des particules plastique impacte fortement la toxicité induite au vivant: les fragments et/ou fibres d'une morphologie complexe sont généralement plus toxiques que les sphères (Junaid *et al.*, 2023). Les NP peuvent servir de vecteurs pour d'autres contaminants et microorganismes par leur grande surface d'échange et leur hydrophobicité (Bhagat *et al.*, 2021); ils peuvent adsorber d'autres contaminants à leur surface tels que les pesticides ou les métaux lourds, ce qui pourrait augmenter leur toxicité (Jiang *et al.*, 2020a). La concentration en NP à laquelle les organismes sont exposés conditionne dans la majorité des cas le degré d'accumulation des NP dans les différents tissus (Junaid *et al.*, 2023) et ainsi la toxicité engendrée. Il existe une multitude de polymères de plastique possédant chacun leurs propres groupes fonctionnels, caractéristiques physico-chimiques avec par conséquent un impact différent sur l'organisme (Sridharan *et al.*, 2022). Les polymères de plastique les plus utilisés en Europe sont le polypropylène (PP), polyéthylène (PE), polyvinyl chloride (PVC), polyuréthane (PU), polyéthylène terephthalate (PET) et polystyrène (PS) (Paul *et al.*, 2020). Le polystyrène (PS) a été utilisé dans cette étude: il est largement employé dans la production de gobelets, assiettes, récipients et boîtes à œufs jetables (Khan *et al.*, 2023). Le PS est un polymère aromatique obtenu par polymérisation de monomères de styrène (Kik *et al.*, 2020). Ce polymère est largement

disponible, accessible, peu coûteux (Junaid *et al.*, 2023) et fréquemment utilisé dans les études sur les NP facilitant les comparaisons de résultats (Matthews *et al.*, 2021; Tu *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2017).

L'étude des NP sur plusieurs générations permet de mettre en évidence une potentielle accumulation des dommages au fil des générations qui pourrait refléter la réalité de l'exposition environnementale. L'exposition sur une seule génération ne permet pas d'appréhender l'impact des NP sur la population de drosophile (Tu *et al.*, 2023). Il est donc urgent d'effectuer des expositions multigénérationnelles dans le but d'identifier les impacts sur le long terme. Afin de tester les effets multigénérationnels d'une exposition à des NP sur les insectes, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) constitue un modèle expérimental d'intérêt en raison de sa facilité d'élevage standardisé, de fortes capacités de reproduction, de son court temps de développement, et de son utilisation comme modèle d'études toxicologiques. Le cycle complet de développement (Annexe 1) de la drosophile prend 10 à 12 jours à température ambiante et est divisé en différents stades incluant l'œuf, la larve, la pupe et l'adulte (Ong *et al.*, 2015). Ces avantages font de la drosophile un bon modèle expérimental dans le cadre d'une exposition aux NP. Très peu d'études documentent l'ingestion de NP chez les insectes à l'exception du ver de terre *Caenorhabditis elegans* qui est une très bonne référence de toxicité. De nombreuses études ont déjà caractérisé l'impact des NP sur *Caenorhabditis elegans* (Kim *et al.*, 2019; Lei *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020), le développement d'un modèle d'étude supplémentaire permet de compléter les données relatives aux invertébrés terrestres.

Quelques études rapportent les effets de l'exposition des drosophiles aux NP sur la locomotion (Alaraby *et al.*, 2022; Matthews *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2020). Un effet reprotoxique a également été mis en

évidence avec une diminution du nombre d'œufs, du taux d'éclosion des œufs et une augmentation des taux d'apoptose/nécrose des ovocytes (Tu *et al.*, 2023). Dans cette étude, l'objectif est de compléter les récentes observations de reprotoxicité induite par les NP sur ce modèle biologique sur cinq générations (Tu *et al.*, 2023), en prolongeant l'exposition sur dix générations. Les précédents travaux indiquent qu'une exposition aux NP altère certains paramètres phénotypiques, avec notamment un retard du temps de développement des drosophiles (Pappus *et al.*, 2018; Tu *et al.*, 2023). L'impact des NP sur d'autres traits demeure incertain comme c'est le cas pour la viabilité oeuf-adulte. Une étude démontre une absence d'effet de l'exposition (Alaraby *et al.*, 2022) alors qu'un déclin de la viabilité oeuf-pupa a été observé dans une autre étude (Pappus *et al.*, 2018). En termes de réponse physiologique, le stress oxydatif, qui correspond à un déséquilibre entre la production et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Lushchak, 2011), peut survenir suite à l'exposition à un contaminant environnemental. Une surproduction de ROS peut présenter un danger pour l'organisme, leurs électrons non appariés sont très réactifs ce qui favorise leur implication dans des réactions chimiques non désirées (Lushchak, 2011). Le développement d'un stress oxydatif a été observé avec une augmentation de la production de ROS, qui est corrélée avec l'augmentation de la concentration en NP (Alaraby *et al.*, 2022). Les réponses antioxydantes documentées suite à une exposition aux MP varient en fonction des études: dans certains cas, on observe une augmentation des activités d'enzymes anti oxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) (Yu *et al.*, 2022) alors qu'une diminution (Jiang *et al.*, 2020b) ou aucun effet (De Felice *et al.*, 2021) est observé dans d'autres études. En déterminant l'effet des NP sur dix générations, on pourra percevoir quelles réponses phénotypiques et physiologiques sont développées à l'échelle individuelle. Une exposition continue aux

NP sur plusieurs générations se rapproche des conditions d'expositions des organismes dans l'environnement afin d'appréhender l'impact des NP sur la dynamique de population des drosophiles.

L'étude a pour objectif de déterminer l'impact de quatre concentrations de NP (0, 1,05, 105 et 525 µg/g de nourriture) sur des traits phénotypiques: viabilité, temps de développement, fécondité et sur des traits physiologiques: catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA). L'ingestion de NP engendre des dommages au niveau intestinal (Matthews *et al.*, 2021) ce qui pourrait diminuer la prise alimentaire des larves et ainsi entraîner un déclin de la viabilité des pupes et des adultes. Pour une même quantité de nourriture ingérée, celle contenant les NP n'apporte pas la même quantité d'énergie que la nourriture sans NP, les NP n'étant d'aucun apport nutritif. Nous émettons l'hypothèse que l'ingestion de NP durant la phase larvaire pourrait augmenter le temps de développement des drosophiles. En modifiant la balance énergétique, l'ingestion de nourriture contaminée en NP pourrait également altérer les fonctions de reproduction des organismes. L'accumulation des NP et l'apparition de lésions apoptotiques dans les ovaires ont été démontrés (Tu *et al.*, 2023) renforçant la possible atteinte sur la reproduction. Nous émettons l'hypothèse que l'ingestion de NP pourrait engendrer une diminution du nombre d'œufs pondus par les femelles drosophiles. L'exposition de l'organisme à des particules exogènes comme les NP génère une toxicité directe et/ou indirecte par leur détoxification. Cette toxicité s'accompagne dans la plupart des cas d'un déséquilibre dans le métabolisme oxydatif avec la production de ROS (Pérez-Albaladejo *et al.*, 2020). Nous émettons l'hypothèse que l'ingestion de NP pourrait engendrer un déséquilibre oxydatif avec une augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes et des dommages oxydatifs.

Matériel & méthodes

1. Conditions d'élevage

L'élevage de drosophiles a été mis en place à partir d'individus sauvages collectés en septembre 2015 en Bretagne (Henry *et al.*, 2020). La population de drosophiles a été exposée de manière continue aux NP sur plusieurs générations dans des flacons en plastique contenant le milieu nutritif et 70 individus par contenant. Le transfert des individus dans un nouveau flacon est effectué tous les deux jours afin de maintenir le milieu nutritif dans un état correct. Des pontes sont réalisées trois jours après les dernières émergences pour pouvoir préserver la population au cours du temps et passer d'une génération à une autre. La durée du développement est d'une dizaine de jours (Annexe 1). Les drosophiles sont maintenues dans des incubateurs à 25°C avec une humidité de 60% et générant des cycles jour/nuit de 12h.

Les drosophiles sont exposées à différentes concentrations de NP par ingestion de nourriture contaminée du stade larvaire au stade adulte. Les NP utilisés pour la préparation de la nourriture sont de trois tailles, 20 nm, 80 nm et 200 nm (respectivement 3020A, 3080A, et 3200A, Nanospheres, ThermoFisher Scientific) et sont sous forme de suspensions aqueuses. Les solutions commerciales contenant chacune des tailles de NP sont concentrées à 1% de solides de densité 1.05 g/cm³. Un mélange des trois tailles est réalisé afin d'obtenir un unique mélange de NP qui est par la suite dilué dans le but d'exposer les drosophiles à trois concentrations, 1,05 µg, 105 µg et 525 µg de NP par g de nourriture. Deux solutions de NP sont utilisées pour réaliser les trois concentrations de nourriture, une à 10,5 mg/mL et l'autre à 0,105 mg/mL. Pour réaliser 100 g de nourriture, 100 mL d'eau, 1,5 g d'agar, 8 g de levure et 5 g de sucre sont chauffés jusqu'à ébullition. Lorsque la température de la nourriture est inférieure à 60°C, 1 mL de nipagine à 10% et 1,6 mL

d'acide propionique sont ajoutés afin d'éviter toute contamination. A partir de cette nourriture, quatre conditions d'exposition sont préparées à 0 µg/g de nourriture, 1,05 µg/g, 105 µg/g et 525 µg/g. La préparation de la nourriture contaminée est faite sous sorbonne avec le port de gants et d'une blouse de manière à manipuler les NP sans risques pour la santé. Les NP sont ajoutés quand la température de la nourriture est comprise entre 40 et 50°C, un agitateur magnétique est utilisé afin d'homogénéiser la solution de NP avec la nourriture. Pour atteindre une concentration de 1,05 µg/L, 1 mL de la solution à 0,105 mg/mL est ajouté dans 100 grammes de nourriture, pour atteindre 105 µg/L, 1 mL de la solution à 10,5 mg/mL est ajouté et pour atteindre 525 µg/L, 5 mL de la solution à 10,5 mg/mL sont ajoutés. La nourriture est par la suite placée dans des vials avec 3 mL pour le maintien de la population et 5 mL pour les pontes.

2. Expérimentation (Fig. 1)

La génération étudiée au cours de ce stage est la génération F10; les expérimentations physiologiques et phénotypiques sont toutefois réalisées sur les générations F0, F5 et F10. L'étude des traits phénotypiques pour les générations F0 et F5 a été réalisée au préalable suite aux émergences de chacune des deux générations. L'étude des traits physiologiques des trois générations a cependant été faite au même moment; le broyage des individus des générations F0, F5 et F10 a été mené après stockage de ces derniers à -80°C. Les différentes expérimentations réalisées nécessitent des individus femelles et/ou mâles dans des quantités différentes impliquant une étape de sexage au cours de laquelle les individus sont répartis dans des microtubes 1,5 mL et dans des flacons avant les manipulations. Les femelles sont reconnaissables grâce à leur abdomen bombé alors que les mâles sont plus minces et ont l'extrémité de leur abdomen noircie.

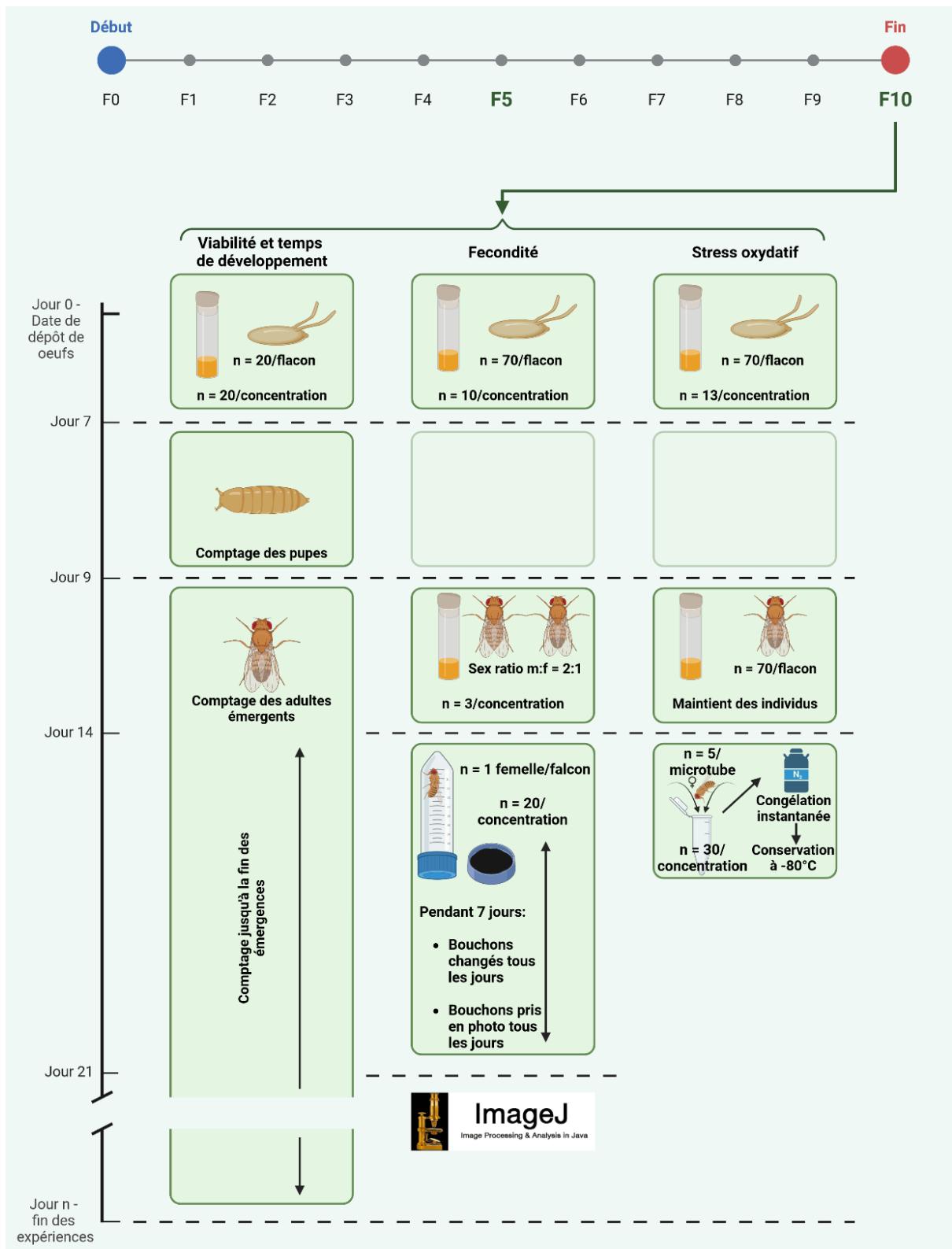


Fig. 1 Schéma des expérimentations phénotypiques et physiologiques réalisées sur *D.melanogaster* exposé à quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture (0, 1,05, 105, 525 µg NP/g de nourriture). Créeée avec [BioRender.com](https://biorender.com).

2.1 Étude des traits phénotypiques

Afin de caractériser l'impact de l'ingestion des NP sur les drosophiles, quatre traits phénotypiques sont étudiés: la viabilité des pupes et des adultes, le temps de développement et la fécondité. Après l'émergence de la génération F9, les individus matures sexuellement pendant 4 jours sur chacune des conditions d'exposition. Deux cent individus pour chaque condition sont prélevés et placés dans des cages de pontes contenant des boîtes de Pétri avec de l'agar de raisin pour simplifier la récolte des œufs.

2.1.1 Viabilité

La viabilité est étudiée grâce à des flacons au sein desquels 20 œufs ont été déposés pour chaque condition d'exposition: 0 µg/g, 1,05 µg/g, 105 µg/g et 525 µg/g. Nous avons compté le nombre de pupes et d'adultes qui émergeaient à partir des 20 œufs déposés. Les œufs sont récoltés sous loupe binoculaire et placés par 20 dans des vials de nourriture contaminée. Vingt flacons sont utilisés pour chaque condition. Le comptage du nombre de pupes est réalisé 7 jours après le dépôt des œufs puis celui des adultes du 9^{ème} au 15^{ème} jour après le dépôt des œufs.

2.1.2 Temps de développement

Le temps de développement est calculé à partir du moment de dépôt des œufs jusqu'à l'émergence des adultes et est étudié pour les mêmes individus que ceux utilisés pour les mesures de viabilité. Les flacons sont surveillés à intervalles de temps réguliers allant d'1h à 1h30 à partir du 9^{ème} jour après le dépôt des œufs afin de rapporter l'heure et la date auxquelles émergent les adultes.

2.1.3 Fécondité

Afin d'obtenir les individus pour mesurer leur fécondité, des œufs sont placés dans des flacons avec un total de 10 flacons par condition. Les adultes qui émergent de ces flacons ont été

utilisés pour la manipulation de fécondité et ont été transférés dans d'autres flacons de nourriture correspondant à chacune des conditions d'exposition. Après maturation sexuelle pendant 4 jours, la mesure de la fécondité est lancée. Vingt falcons sont utilisés par concentration de NP, 1 femelle y est placée et la ponte d'œufs est surveillée au moyen de nourriture colorée au charbon placée dans le bouchon des falcons. La nourriture utilisée est la même que celle préparée pour la population de drosophiles à la différence que la levure utilisée est de la levure extraite, plus fine afin d'obtenir une nourriture plus homogène. De plus, pour 250 mL de nourriture, 3 cuillères de charbon sont ajoutées au mélange. La mesure de la fécondité consiste en un suivi des pontes sur 7 jours: chaque jour le nombre d'œufs pondus est compté et les bouchons des falcons sont changés afin de poursuivre le comptage jour après jour. Le comptage des œufs dans les bouchons est réalisé à l'aide du logiciel ImageJ grâce à l'option "multi-point".

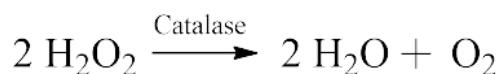
2.2 Étude des traits physiologiques (Annexe 2)

La caractérisation des effets de l'ingestion des NP sur la physiologie des drosophiles a été étudiée en mesurant indirectement le stress oxydatif avec les capacités antioxydantes des femelles. Pour se faire, le dosage de l'activité de deux enzymes a été réalisé: la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). En complément, nous avons dosé le malondialdéhyde (MDA), qui est un produit lors du processus de peroxydation lipidique. La quantité de protéines présentes dans chacun des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford. Après l'émergence de la génération F10, les individus sont sexés et les femelles sont conservées par cinq dans des microtubes 1,5 mL congelés à -80°C. Pour procéder au broyage des mouches, des microtubes 2 mL sont préparés avec 15 billes de silice Lysing Matrix D Bulk et 200 µL de tampon d'extraction. Le tampon d'extraction est constitué de 90 mL de tampon NaP à 0,1 M, de 10 mL de glycérol à 20% et de 0,022 g de 1,4-dithioérythritol. Ce

tampon d'extraction permet de réaliser l'intégralité des dosages à l'exception du dosage du MDA où le tampon potassium phosphate à 0,1 M seul est utilisé afin d'éviter toute interaction du glycérol avec le kit de dosage du MDA. Les mouches sont par la suite pesées afin d'ajuster le volume du tampon d'extraction dans le but d'obtenir une dilution au 1:50 (w/v). Après avoir déterminé le volume, les mouches sont broyées au beadbeater pendant 1 min 30 sec à 30 Hz puis centrifugées pendant 20 min à 14000 rpm et à 4°C. Le surnageant des microtubes est récupéré et séparé dans des microtubes 1,5 mL correspondant aux différentes manipulations. Ces microtubes 1,5 mL sont conservés à -80°C en l'attente des expérimentations. Pour chaque dosage, deux types de réplicats sont utilisés: les réplicats biologiques correspondant à des échantillons d'une même condition d'exposition et les réplicats techniques obtenus à partir du même échantillon lors de la manipulation.

2.2.1 Catalase

La mesure de l'activité de la CAT est réalisée en regardant la disparition de son substrat, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).



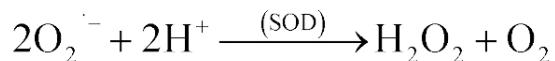
Pour chaque concentration, nous disposions de huit réplicats biologiques et avons réalisé trois réplicats techniques pour chacun d'entre eux. La disparition d' H_2O_2 est mesurée par absorbance à 240 nm sur une durée de 3 minutes avec une mesure toutes les 10 secondes sur une microplaquette UV. Un blanc est effectué pour tous les échantillons, il contient 290 μL de tampon de mesure qui est du NaP à 0,05 M et 10 μL d'échantillon dilué au 1/4 dans du tampon NaP à 0,1 mM. Les puits contenant le substrat sont constitués de 185 μL de tampon de mesure, de 10 μL d'échantillon dilué et de 105 μL d' H_2O_2 à 30%. Pour l'analyse des résultats, les valeurs d'absorbance sont corrigées par

soustraction de la valeur du blanc associé. L'activité de la catalase en mol/min/mg est calculé avec la formule suivante: Activité = ($|pente| * \text{volume de réaction} / (\epsilon * \text{longueur du trajet} * \text{quantité protéique})$)

Avec la pente de la cinétique en Abs/min; le volume de réaction = 300 μL ; le coefficient d'extinction molaire, $\epsilon = 39,4 \text{ L}/\text{mmol}/\text{cm}$; la longueur du trajet parcouru par le rayon = 0,845 cm et la quantité de protéine en mg est déterminée par le Bradford. Pour chaque réplicat biologique, la moyenne des activités des trois réplicats techniques est ensuite calculée.

2.2.2 Superoxyde dismutase

La mesure de l'activité de la SOD est réalisée en regardant l'inhibition de la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT).



Pour chaque concentration, les mesures ont été réalisées pour huit réplicats biologiques, et deux réplicats techniques ont été faits pour chacun d'entre eux. La présence de NBT dans l'échantillon est mesurée par absorbance à 560 nm avec la formation d'un produit bleu, le formazan bleu suite à la réduction du NBT. Deux types de blancs sont réalisés, un blanc max sans SOD où tout le NBT sera réduit et un blanc min sans NBT où aucune réaction ne se déroulera. Le blanc max est constitué de 170 μL d'eau ultrapure, 40 μL de tampon NaP à 500 mM, 30 μL de méthionine à 130 mM, 30 μL de NBT à 750 μM et 30 μL de riboflavine à 20 μM . Le blanc min est constitué de 200 μL d'eau ultrapure, 40 μL de tampon NaP à 500 mM, 30 μL de méthionine à 130 mM et 30 μL de riboflavine à 20 μM . Les puits contenant les échantillons sont constitués de 170 μL d'eau ultrapure, 30 μL de tampon NaP à 500 mM, 30 μL de méthionine à 130 mM, 30 μL de NBT à 750 μM , 10 μL d'extrait et 30 μL de riboflavine

à 20 µM. Les absorbances sont mesurées avant (pré-lecture) et après (lecture) l'ajout de riboflavine. Après l'ajout de riboflavine, les microplaques sont exposées pendant 12 minutes à la lumière dans un phytotron pour initier la réduction du NBT. Pour l'analyse des résultats, les valeurs d'absorbance sont corrigées par soustraction de la valeur de pré-lecture associée.

Calcul du % d'inhibition = $(\text{Abs}560_{\text{max}} - \text{Abs}560_{\text{extrait}}) * 100 / (\text{Abs}560_{\text{max}} - \text{Abs}560_{\text{min}})$

Une unité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber la réduction photochimique du NBT de 50%. Calcul des unités d'activité de SOD: U SOD = % d'inhibition / 50 / quantité protéique

Pour chaque réplicat biologique, la moyenne des activités des deux réplicats techniques est ensuite calculée.

2.2.3 Peroxydation lipidique, MDA

Le dosage du MDA est réalisé à l'aide d'un kit, le TBARS Assay kit Cayman 700870 qui mesure les adduits de MDA-TBA formés par absorbance à 535 nm. Pour chaque concentration, les mesures ont été menées pour huit réplicats biologiques, et deux réplicats techniques ont été réalisés pour chacun d'entre eux. Une gamme colorimétrique standard est réalisée à partir d'une solution de MDA à 125 µM afin d'obtenir des concentrations en MDA allant de 0 à 50 µM. On ajoute dans chacun des microtubes 2 mL, 100 µL d'échantillon ou de standard, 100 µL d'acide trichloroacétique à 10%, et 800 µL de réactif de couleur. Le réactif de couleur est constitué de 106 mg de réactif d'acide thiobarbiturique (TBA), 10 mL d'acide acétique dilué au ¼ et 10 mL d'hydroxyde de sodium à 3,5 M dilué au ¼. Les microtubes 2 mL sont ensuite chauffés pendant 1 heure à 100 °C puis placés dans un bain de glace pendant 10 minutes et centrifugés à 1600*g à 4°C pendant 20 minutes. Un volume de 200 µL de surnageant est prélevé et placé dans les puits de la microplaque afin de procéder à la lecture de l'absorbance à 535 nm. Pour l'analyse des résultats, les valeurs d'absorbance sont

corrigées par soustraction de la valeur de l'absorbance du puits ne contenant pas de MDA.

La concentration en MDA est déterminé par la formule suivante:

$$\text{MDA } (\mu\text{M}) = (\text{Absorbance} - \text{ordonnée à l'origine})/\text{pente}$$

La pente et l'ordonnée à l'origine sont obtenues en traçant la courbe de la gamme standard représentant l'absorbance à 535 nm en fonction de la concentration de MDA (µM). Pour chaque réplicat biologique, la moyenne des concentrations des deux réplicats techniques est par la suite faite. Les concentrations déterminées sont par la suite divisées par la quantité protéique de chaque échantillon.

2.2.4 Bradford

Afin de déterminer la quantité protéique de chaque échantillon, le réactif de Bradford est utilisé. Les échantillons sont dilués au ¼ et deux réplicats techniques sont réalisés pour chacun d'entre eux. Une gamme standard est préparée à partir d'albumine de sérum bovin (BSA). On ajoute dans les puits 10 µL de standard ou d'échantillon et 250 µL de réactif de Bradford. La microplaque est agitée et 15 minutes d'incubation sont nécessaires avant de faire une lecture d'absorbance à 595 nm. Une courbe standard de l'absorbance à 595 nm en fonction de la quantité de BSA est réalisée afin de pouvoir rapporter l'absorbance des échantillons aux quantités de protéines présentent. Pour chaque réplicat biologique, la moyenne des absorbances des deux réplicats techniques est par la suite faite.

3. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été conduite à l'aide du logiciel R studio, version 4.2.2 (R Core Team, 2022). Pour chacun des modèles linéaires réalisés, les conditions d'applications ont été vérifiées. L'effet de la concentration en NP sur la viabilité des pupes et des adultes est testé par un modèle linéaire généralisé avec une distribution binomiale.

L'effet de la concentration en NP sur le nombre d'œufs cumulés au bout de sept jours est quant à lui étudié à l'aide d'un modèle linéaire généralisé avec une distribution binomiale négative. L'effet de la concentration en NP sur le temps de développement des drosophiles est testé par un modèle linéaire généralisé avec une distribution Gamma. L'effet de la concentration en NP sur l'activité de la CAT et de la SOD est testé par un modèle linéaire. L'effet de la concentration en NP sur la concentration en MDA est également testé par un modèle linéaire. L'analyse des modèles est par la suite réalisée par un test Anova de type II. En cas de significativité, les différences entre conditions d'exposition sont testées deux à deux grâce à la fonction emmeans qui permet de comparer leurs moyennes marginales avec une correction de Tukey.

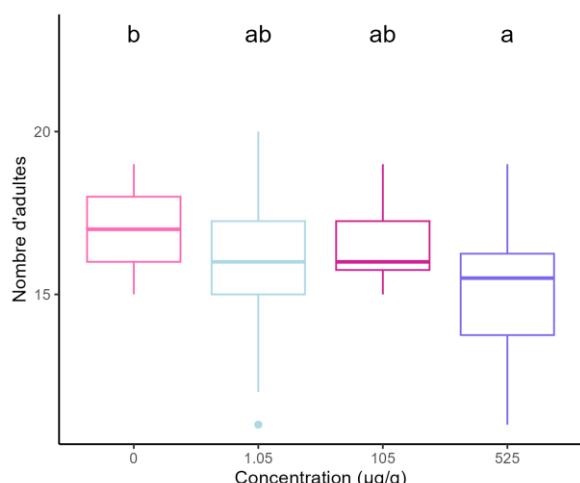
Résultats

Viabilité

Le nombre d'adultes diminue de manière significative pour la condition d'exposition expérimentale avec la plus forte contamination en nanoplastiques ($525 \mu\text{g NP/g}$ de nourriture) par rapport à la condition témoin (glm; $F = 3,31$; $\text{ddl} = 3$; $P = 0,02474$; Fig. 2A). Pour le témoin, le nombre d'adultes moyen est de $17,06 (+/- 1,211)$. Pour les expositions aux NP de $1,05 \mu\text{g/g}$, $105 \mu\text{g/g}$ et $525 \mu\text{g/g}$, les nombres moyens d'adultes sont respectivement de $16 (+/- 2,616)$, $16,55 (+/- 1,394)$ et $15,15 (+/- 2,346)$. Pour la concentration de $1,05 \mu\text{g/g}$, la

différence du nombre d'adultes moyen avec le témoin n'est pas significative (emmeans; $P = 0,2256$). Pour une exposition à $105 \mu\text{g/g}$ de NP, la différence du nombre d'adultes moyen avec le témoin n'est également pas significative (emmeans; $P = 0,7794$). Le nombre de pupes ne présente pas de variations significatives entre les différentes modalités expérimentales (glm; $F = 0,0485$; $\text{ddl} = 3$; $P = 0,9857$; Fig. 2B). Pour le témoin, le nombre de pupes moyen est de $17,28 (+/- 1,018)$. Pour les expositions aux NP de $1,05 \mu\text{g/g}$, $105 \mu\text{g/g}$ et $525 \mu\text{g/g}$, les nombres moyens de pupes sont respectivement de $17,25 (+/- 2,023)$, $17,1 (+/- 1,334)$ et $17,2 (+/- 1,642)$.

A



B

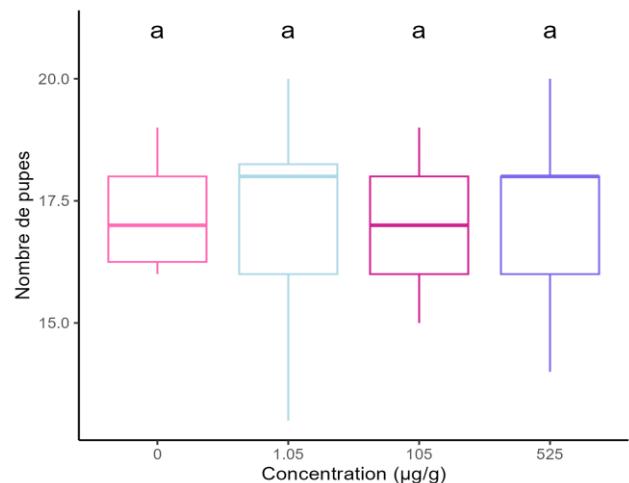


Fig. 2 Nombre d'adultes (A) et nombre de pupes (B) pour les quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture des drosophiles ($0, 1,05, 105, 525 \mu\text{g NP/g}$ de nourriture, $n = 20$ pour toutes les conditions). Méthode des moyennes marginales (fonction emmeans). Des lettres identiques indiquent une différence non significative ($p > 0,05$).

Temps de développement

Le nombre d'émergence d'adultes cumulés en fonction du temps n'est pas significativement différent pour les trois conditions d'exposition par rapport au témoin (glm; $F = 1,9724$; $\text{ddl} = 3$; $P = 0,1163$; Fig. 3).

Fécondité

Le nombre moyen d'œufs cumulés en fonction du temps n'est pas significativement différent au bout de sept jours pour les trois conditions d'exposition par rapport au témoin (glm; $F = 0,2247$; $\text{ddl} = 3$; $P = 0,879$; Fig. 4).

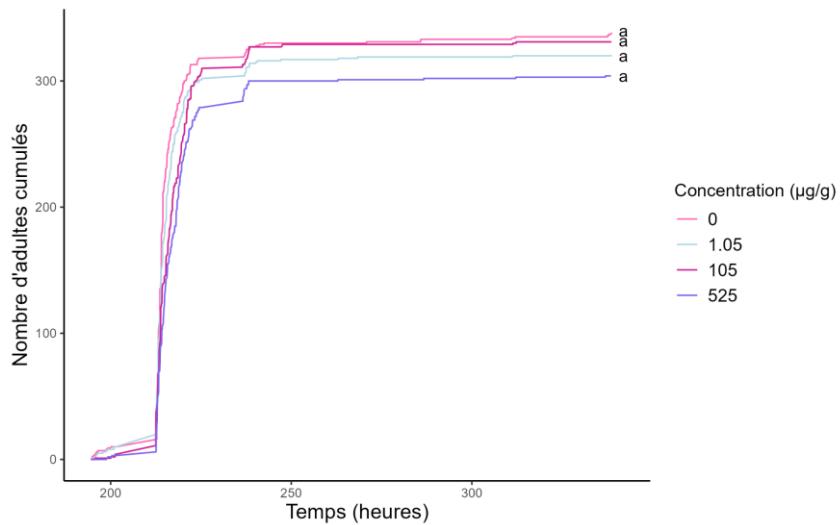


Fig. 3 Nombre d'adultes cumulés en fonction du temps en heures pour les quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture des drosophiles ($0, 1,05, 105, 525 \mu\text{g NP/g}$ de nourriture, $n = 20$ pour toutes les conditions). Méthode des moyennes marginales (fonction emmeans). Des lettres identiques indiquent une différence non significative ($p > 0,05$).

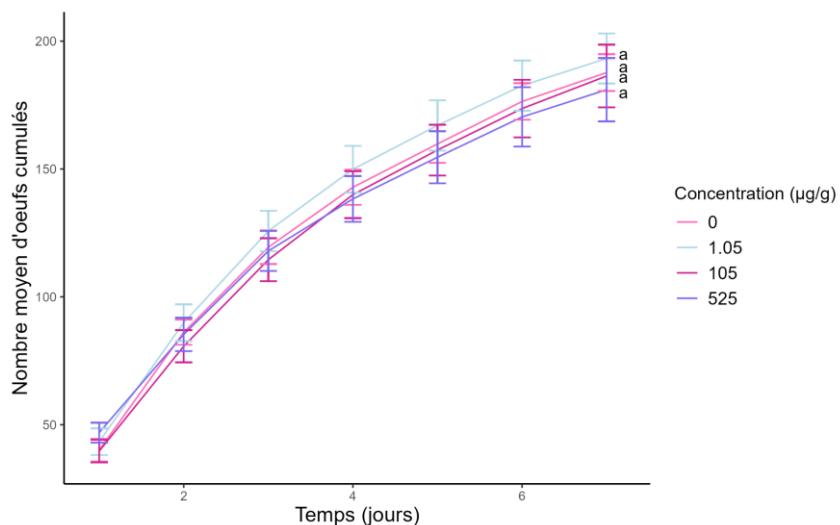


Fig. 4 Nombre moyen d'œufs cumulés en fonction du temps en jours pour les quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture des drosophiles ($0, 1,05, 105, 525 \mu\text{g NP/g}$ de nourriture, $n = 20$ pour toutes les conditions). Méthode des moyennes marginales (fonction emmeans). Des lettres identiques indiquent une différence non significative ($p > 0,05$).

Catalase

L'activité de la CAT ne change pas de manière significative avec les différentes concentrations d'expositions aux NP (lm; $F = 2,0942$; $\text{ddl} = 3$; $P = 0,1236$; Fig. 5). Pour le témoin, la moyenne de l'activité est de $0,1897$ ($+/-.0,0369$) nmol/min/mg. Pour les expositions aux NP de $1,05 \mu\text{g/g}$, $105 \mu\text{g/g}$ et $525 \mu\text{g/g}$, les moyennes

sont respectivement de $0,1818$ ($+/-.0,0384$) nmol/min/mg, $0,2228$ ($+/-.0,0313$) nmol/min/mg et $0,1965$ ($+/-.0,0318$) nmol/min/mg.

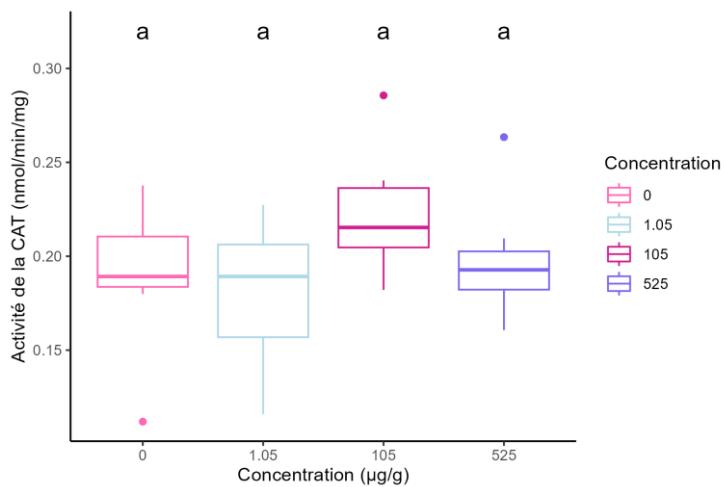


Fig. 5 Activité de la catalase en nmol/min/mg pour les quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture des drosophiles (0, 1,05, 105, 525 µg NP/g de nourriture, n = 8 pour toutes les conditions). Méthode des moyennes marginales (fonction emmeans). Des lettres identiques indiquent une différence non significative ($p > 0,05$).

Superoxyde dismutase

L’activité de la SOD augmente de manière significative pour la concentration de 525 µg/g par rapport à la condition témoin (lm; $F = 5,231$; $ddl = 3$; $P = 0,005406$; Fig. 6). La différence d’activité de la SOD entre les expositions à 0 µg/g et 1,05 µg/g de NP n’est pas significative (emmeans; $P = 0,9140$). La différence d’activité de la SOD entre les expositions à 0 µg/g et 105

µg/g de NP n’est pas significative (emmeans; $P = 0,8763$). Pour le témoin, la moyenne de l’activité est de 103,50 (+/- 13,28) unités. Pour les expositions aux NP de 1,05 µg/g, 105 µg/g et 525 µg/g, les moyennes sont respectivement de 98,44 (+/- 12,36) unités, 109,31 (+/- 11,41) unités et 127,21 (+/- 22,42) unités.

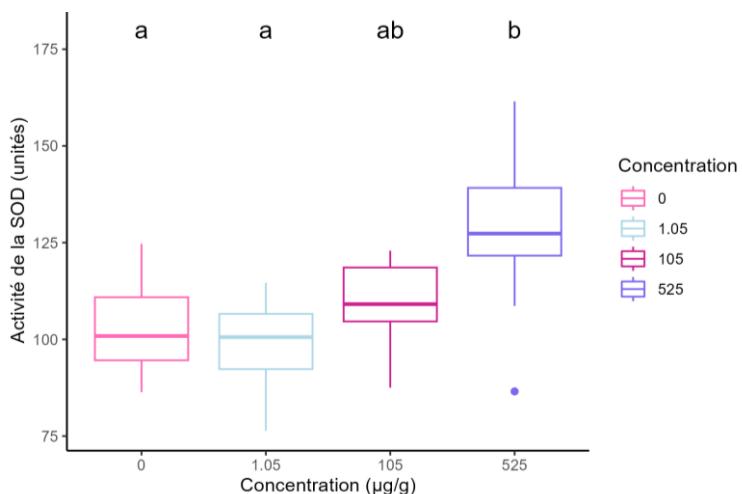


Fig. 6 Activité de la superoxyde dismutase en unités pour les quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture des drosophiles (0, 1,05, 105, 525 µg NP/g de nourriture, n = 8 pour toutes les conditions). Méthode des moyennes marginales (fonction emmeans). Des lettres identiques indiquent une différence non significative ($p > 0,05$).

Malondialdéhyde

La concentration en MDA ne change pas de manière significative avec les différentes concentrations d'expositions aux NP (lm; $F = 0,7077$; $ddl = 3$; $P = 0,5555$; Fig. 7). Pour le témoin, la moyenne de la concentration en

MDA est de $228,72 (+/- 136,45) \mu\text{M}/\text{mg}$. Pour les expositions aux NP de $1,05 \mu\text{g}/\text{g}$, $105 \mu\text{g}/\text{g}$ et $525 \mu\text{g}/\text{g}$, les moyennes sont respectivement de $162,39 (+/- 75,36) \mu\text{M}/\text{mg}$, $205,94 (+/- 94,55) \mu\text{M}/\text{mg}$ et $178,11 (+/- 77,12) \mu\text{M}/\text{mg}$.

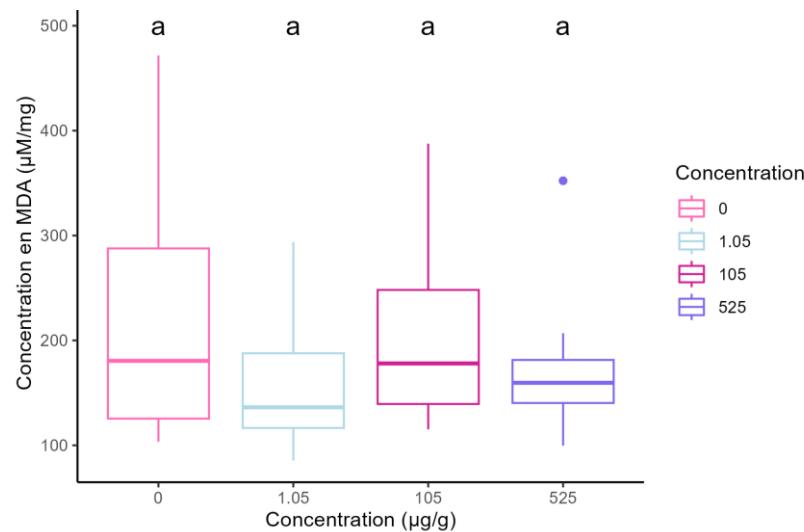


Fig. 7 Concentration du malondialdéhyde en $\mu\text{M}/\text{mg}$ pour les quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture des drosophiles ($0, 1,05, 105, 525 \mu\text{g NP/g}$ de nourriture, $n = 8$ pour toutes les conditions). Méthode des moyennes marginales (fonction emmeans). Des lettres identiques indiquent une différence non significative ($p > 0,05$).

Discussion/Conclusion

Ce travail avait pour objectif d'étudier les conséquences phénotypiques et physiologiques d'une exposition continue sur plusieurs générations de drosophiles *D. melanogaster* aux NP par ingestion de nourriture contaminée. Dans une première partie des expériences, un effet des NP a été mis en évidence sur certains traits phénotypiques, avec un déclin de la viabilité des drosophiles adultes. Aucun effet n'a été observé sur la viabilité des pupes, le temps de développement et la fécondité. Dans une seconde partie, l'analyse des traits physiologiques a démontré une augmentation de l'activité de la SOD chez les drosophiles exposées à de la nourriture contaminée en NP. Aucun effet n'a été observé sur l'activité de la CAT et sur la concentration en MDA. Les résultats obtenus pourraient être expliqués par la nature des NP utilisés, qui sont caractérisés par: une surface lisse non altérée, une mono dispersion en termes de taille et une absence de co-contaminants et d'additifs. Des études futures doivent être réalisées avec des NP issus de l'environnement qui pourraient par leur nature se révéler plus toxiques.

Viabilité

L'étude de la viabilité de l'œuf à la pupe et de l'œuf à l'adulte permet de mettre en évidence les stades de développement de *D. Melanogaster* potentiellement affectés par l'ingestion de nourriture contaminée par des NP. Les résultats obtenus montrent une absence d'effets des NP sur la viabilité œuf-pupe. Un déclin de la viabilité œuf-adulte est observé à la plus forte concentration de NP. Cette différence d'impact pourrait être induite par le déficit d'accumulation de nourriture et donc d'énergie des larves. En effet, à la concentration de NP la plus élevée, l'ingestion d'une quantité (masse) identique de nourriture comparativement aux témoins ne permettra pas une production énergétique équivalente, les NP n'étant d'aucun apport nutritif. Au stade pupe, les réserves accumulées au cours du

développement ne sont peut-être pas suffisantes, empêchant l'individu de finir son développement et donc d'émerger. L'effet des MP sur les demandes et réserves énergétiques a été documenté chez la moule coréenne *Mytilus coruscus* (Shang *et al.*, 2021) démontrant une augmentation de la demande énergétique cellulaire ainsi qu'une diminution des réserves énergétiques cellulaires pour les moules exposées aux MP. Ces résultats sont semblables à ceux observés chez la drosophile suite à une exposition aux MP avec une diminution de la teneur en triglycérides (Tang *et al.*, 2023). Les particules de plastique pourraient perturber le métabolisme des lipides et par conséquent le métabolisme énergétique (Tang *et al.*, 2023). L'exposition aux NP par absorption semble également jouer un rôle central sur la nature des effets qui peuvent ensuite être observés sur les organismes. Lors d'une ingestion, le passage des NP par l'intestin peut avoir de nombreux impacts, avec une désorganisation tissulaire, des dommages aux parois intestinales, moins de cellules entéroendocrines et en plus petits nombres (Matthews *et al.*, 2021). Des résultats similaires sont observés chez l'annélide *Enchytraeus crypticus* (Zhu *et al.*, 2018) avec en plus une dysbiose du microbiote intestinal. De tels dommages sur le système digestif pourraient fortement impacter l'assimilation des nutriments. Les NP pourraient perturber le métabolisme énergétique aux échelles cellulaires et tissulaires et affecter les réserves énergétiques de la drosophile, conduisant à une absence d'émergence des adultes. Afin de confirmer cette hypothèse, les réserves en lipides, glycogène et protéines pourraient être analysées en utilisant leur enthalpie de combustion pour identifier les raisons du déclin de l'émergence des adultes.

Temps de développement

L'exposition aux NP n'a pas affecté le temps de développement des drosophiles. Les NP à forte concentration semblent donc seulement affecter la viabilité œuf-adulte sans pour autant retarder leur développement. Ces

résultats sont en accord avec la littérature disponible sur *D. Melanogaster* (Jimenez-Guri *et al.*, 2021). Des résultats opposés ont toutefois été rapportés, comme chez la mouche arlequin *Chironomus riparius*, pour laquelle un retard de développement de l'adulte a été observé (Stanković *et al.*, 2020). Chez cette même espèce, un retard d'émergence de la pupe a été observé pour les femelles (Silva *et al.*, 2019). Un retard de développement de quelques jours a également été observé sur la génération F5 de *D. melanogaster* (Tu *et al.*, 2023). La variabilité des effets observés sur le temps de développement pourrait être due aux conditions d'exposition, en particulier la nature des polymères de plastique, leur taille, forme et concentrations qui diffèrent entre les études. Il serait intéressant de travailler sur un autre indicateur de développement. La longueur du tibia de la drosophile a récemment été identifié comme potentiel indicateur de la taille des individus (Farfán-Pira *et al.*, 2023) ce qui pourrait refléter leur développement.

Fécondité

Aucun effet de l'ingestion des NP n'a été observé sur le nombre d'œufs pondus par les drosophiles. La production d'œufs est un paramètre sensible affecté par les variations énergétiques (Zhong *et al.*, 2022). L'absence d'effet pourrait être dû à une variation des réserves énergétiques trop faible pour pouvoir affecter la production d'œufs. D'autres paramètres devraient être étudiés pour pouvoir caractériser la reprotoxicité éventuelle des NP. Les NP peuvent s'accumuler dans les gonades du nématode (Zhao *et al.*, 2017) et de la drosophile (Tu *et al.*, 2023). Il serait intéressant d'étudier le devenir des NP dans l'organisme par fluorescence afin de voir leur potentiel impact sur les gonades et cellules germinales. En cas d'accumulation des NP dans les cellules germinales, leur transmission à la descendance devrait être étudiée dans le cadre d'une exposition trans-générationnelle.

Stress oxydatif

L'ingestion de NP a entraîné une augmentation de l'activité de la SOD, alors que cette exposition a été sans effet sur l'activité de la CAT et la concentration en MDA. Peu d'études ne renseignent l'impact des NP sur le stress oxydatif chez les insectes terrestres, cependant ce trait physiologique a été analysé chez certains invertébrés terrestres. Les études sur le stress oxydatif chez le ver de terre *Eisenia fetida* et l'escargot géant *Achatina reticulata* (Yu *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2020b; De Felice *et al.*, 2021) rapportent des résultats contrastés quant aux défenses anti-oxydantes et dommages cellulaires mis en évidence suite à une exposition à des fragments de plastique. En cas de déséquilibre oxydatif, deux types de réponses peuvent être observées: une augmentation de l'activité des enzymes permettant de contrer la production de ROS ou une diminution de leur activité résultant d'une inactivation des enzymes par les ROS (Irato *et al.*, 2021). L'activité des enzymes antioxydantes dépend également de la durée de l'exposition et de la concentration du polluant environnemental (Lushchak, 2011). La SOD et la CAT sont considérées comme la première ligne de défense contre les ROS (Prokić *et al.*, 2019). Les résultats obtenus démontrent que seule l'activité de la SOD a été augmentée, sans perturbation de l'activité de la CAT. L'anion superoxyde serait donc transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la SOD et l' H_2O_2 serait ensuite transformé en produits non-toxiques par la CAT. Cette dernière réaction serait réalisée par une quantité d'enzyme limitée, l'activité de la CAT étant la même chez les drosophiles exposées et témoins. Nous pouvons donc imaginer une rémanence d' H_2O_2 dans les hémocytes de la drosophile. La perturbation de l'équilibre oxydatif peut par conséquent endommager les constituants cellulaires (Lushchak, 2011). La concentration en MDA n'a pas été impacté démontrant une absence de peroxydation lipidique. D'autres dommages liés au stress oxydatif pourraient être investigués comme l'inhibition de

l'acétylcholinestérase, un marqueur de neurotoxicité ou les cassures chromosomiques permettant de révéler le potentiel génotoxique des NP.

De manière générale, il serait intéressant de travailler sur l'expression des gènes par étude transcriptomique pour mettre en évidence l'activation de voies de signalisations intracellulaires impliquées dans le métabolisme, le développement ou la défense anti oxydante. Les premiers effets des polluants interviennent aux échelles moléculaires et cellulaires avant d'être graduellement reflétés à des niveaux de réponses supérieurs (Liu *et al.*, 2019).

L'exposition des drosophiles à des NP environnementaux avec une forme plus complexe et non sphérique permettrait de se rapprocher des plastiques trouvés dans les milieux naturels. La forme impact la biodisponibilité des plastiques et leur taux d'ingestion (Botterell *et al.*, 2020). Certaines espèces comme la larve de homard européenne *Homarus gammarus* et le copépode *Acartia tonsa* sélectionnent préférentiellement la forme de plastique ingérée (Botterell *et al.*, 2020). Ce paramètre pourrait fortement altérer le devenir des NP dans l'organisme et leur impact sur les traits phénotypiques et physiologiques. D'autres facteurs à prendre en compte pour une exposition la plus représentative des conditions environnementales sont la présence d'additifs dans les plastiques et de co-contaminants dans les milieux naturels. La formulation des plastiques inclut la présence d'additifs comme le bisphénol A et les esters de phtalates (Darbre *et al.*, 2020) qui sont connus comme étant des perturbateurs endocriniens notamment chez la noctuelle méditerranéenne *Spodoptera littoralis* (Rivas *et al.*, 2023). Ces additifs

associés aux NP pourraient altérer les fonctions de reproduction avec une diminution de la fertilité et un changement dans le sex ratio chez *D. melanogaster* (Chen *et al.*, 2019; Jimenez-Guri *et al.*, 2021) et ainsi impacter le succès reproducteur de la population. Les plastiques adsorbent et interagissent avec d'autres contaminants dans le sol tels que les antibiotiques, les métaux lourds, les polluants organiques (Yang *et al.*, 2022) et les pesticides (Beriot *et al.*, 2020; Peña *et al.*, 2023). L'adsorption de contaminants à la surface des NP combinée à l'utilisation d'additifs expose les organismes à un cocktail de substances chimiques (Wang *et al.*, 2020). Peu d'attention est portée aux effets combinés des NP avec d'autres polluants, la complexité des interactions rend les impacts difficiles à prédire (Yang *et al.*, 2022). Il a été démontré que les plastiques étaient présents à différents niveaux trophiques mettant en évidence leur transfert au sein de la chaîne alimentaire (Anbumani *et al.*, 2018). La bioamplification de MP a été observée avec une augmentation de leur concentration du sol aux vers de terre et des vers de terre aux poules (Huerta Lwanga E *et al.*, 2017). L'atteinte des hauts maillons de la chaîne trophique des écosystèmes terrestres pourrait fortement impacter leur fonctionnement. Des altérations à l'échelle individuelle peuvent impacter la dynamique de population ainsi que la structure et le fonctionnement des communautés (Caquet *et al.*, 2021). Plus de recherches sont nécessaires à différents niveaux d'organisation, de l'échelle infra-individuelle à écosystémique, pour mieux comprendre les effets des NP sur la biodiversité (Renault *et al.*, 2024).

Remerciements

Je tiens à remercier mon encadrante de stage Chloé Richard qui m'a donné la possibilité de participer aux travaux de sa thèse. Sa gentillesse et ses bons conseils m'ont permis d'avoir une première expérience dans le monde de la recherche très appréciable et enrichissante.

Merci également à David Renault, Stéphane Derocles et Mélanie Boël pour leur précieuse aide tout au long du stage et particulièrement lors de la rédaction de mon rapport. Nos échanges ont conforté mon choix de poursuite d'étude en recherche dans le domaine de l'écotoxicologie.

Je remercie Théo Laguilliez, mon binôme de stage qui m'a beaucoup appris tant dans l'expérimentation que dans l'analyse statistique et sans qui ce stage n'aurait pas été aussi agréable.

Enfin, je remercie la direction de l'UMR Ecobio, Joan van Baaren, Julien Pétillon, Anniet Laverman et Mariette Nivard, pour leur accueil.

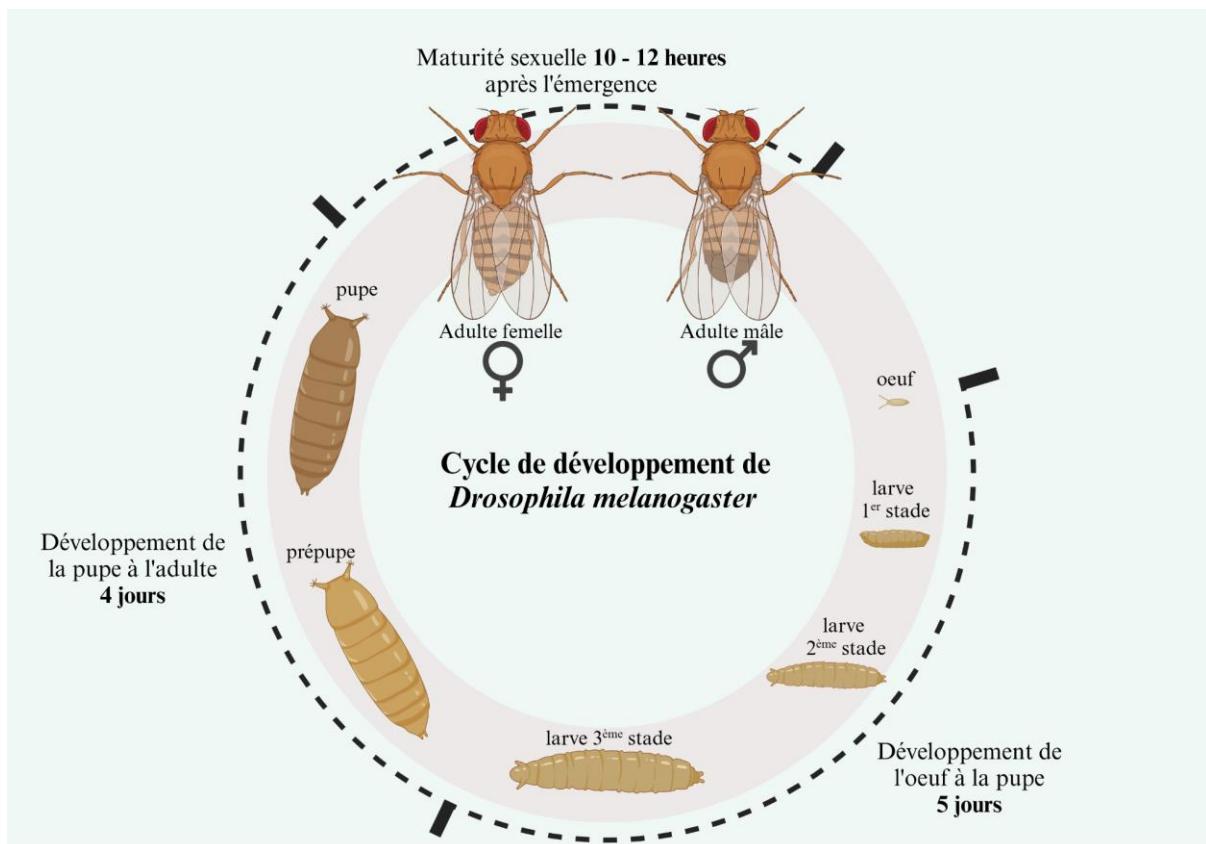
Références bibliographiques

- Geyer, Roland**, et al. "Production, use, and fate of all plastics ever made." *Science advances* 3.7 (2017): e1700782.
- Huang, Yi**, et al. "Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment." *Environmental Pollution* 260 (2020): 114096.
- van den Berg, Pim**, et al. "Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils." *Environmental Pollution* 261 (2020): 114198.
- Khan, Muhammad Amjad**, et al. "Abundance, spatial distribution, and characteristics of microplastics in agricultural soils and their relationship with contributing factors." *Journal of Environmental Management* 328 (2023): 117006.
- Kiran, Boda Ravi**, et al. "Micro/nano-plastics occurrence, identification, risk analysis and mitigation: challenges and perspectives." *Reviews in environmental science and bio/technology* 21.1 (2022): 169-203.
- Kieu-Le, Thuy-Chung**, et al. "Baseline concentration of microplastics in surface water and sediment of the northern branches of the Mekong River Delta, Vietnam." *Marine Pollution Bulletin* 187 (2023): 114605.
- Nizzetto, Luca**, et al. "Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin?." (2016): 10777-10779.
- Gigault, Julien**, et al. "Current opinion: what is a nanoplastic?." *Environmental pollution* 235 (2018): 1030-1034.
- Junaid, Muhammad**, et al. "Ecotoxicological impacts associated with the interplay between micro (nano) plastics and pesticides in aquatic and terrestrial environments." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2023): 117133.
- Hale, Robert C.**, et al. "A global perspective on microplastics." *Journal of Geophysical Research: Oceans* 125.1 (2020): e2018JC014719.
- Zhang, Kai**, et al. "Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review." *Environmental Pollution* 274 (2021): 116554.
- Horton, Dixon**, et al. "Microplastics: An introduction to environmental transport processes." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water* 5.2 (2018): e1268.
- Chae and An**. "Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review." *Environmental pollution* 240 (2018): 387-395.
- Renault, David**, et al. "The Plasticene era: Current uncertainties in estimates of the hazards posed by tiny plastic particles on soils and terrestrial invertebrates." *Science of the Total Environment* (2024): 172252
- Hurley, Rachel R.**, et al. "Validation of a method for extracting microplastics from complex, organic-rich, environmental matrices." *Environmental science & technology* 52.13 (2018): 7409-7417.
- Al-Sid-Cheikh, Maya**, et al. "Uptake, whole-body distribution, and depuration of nanoplastics by the scallop *Pecten maximus* at environmentally realistic concentrations." *Environmental science & technology* 52.24 (2018): 14480-14486.
- Liu, Zhiqian**, et al. "Effects of nanoplastics at predicted environmental concentration on *Daphnia pulex* after exposure through multiple generations." *Environmental pollution* 256 (2020): 113506.
- Cox, Kieran D.**, et al. "Human consumption of microplastics." *Environmental science & technology* 53.12 (2019): 7068-7074.
- Tu, Qinghui**, et al. "Reproductive toxicity of polystyrene nanoplastics in *Drosophila melanogaster* under multi-generational exposure." *Chemosphere* 330 (2023): 138724.
- Alaraby, Mohamed**, et al. "Hazard assessment of ingested polystyrene nanoplastics in *Drosophila* larvae." *Environmental Science: Nano* 9.5 (2022): 1845-1857.

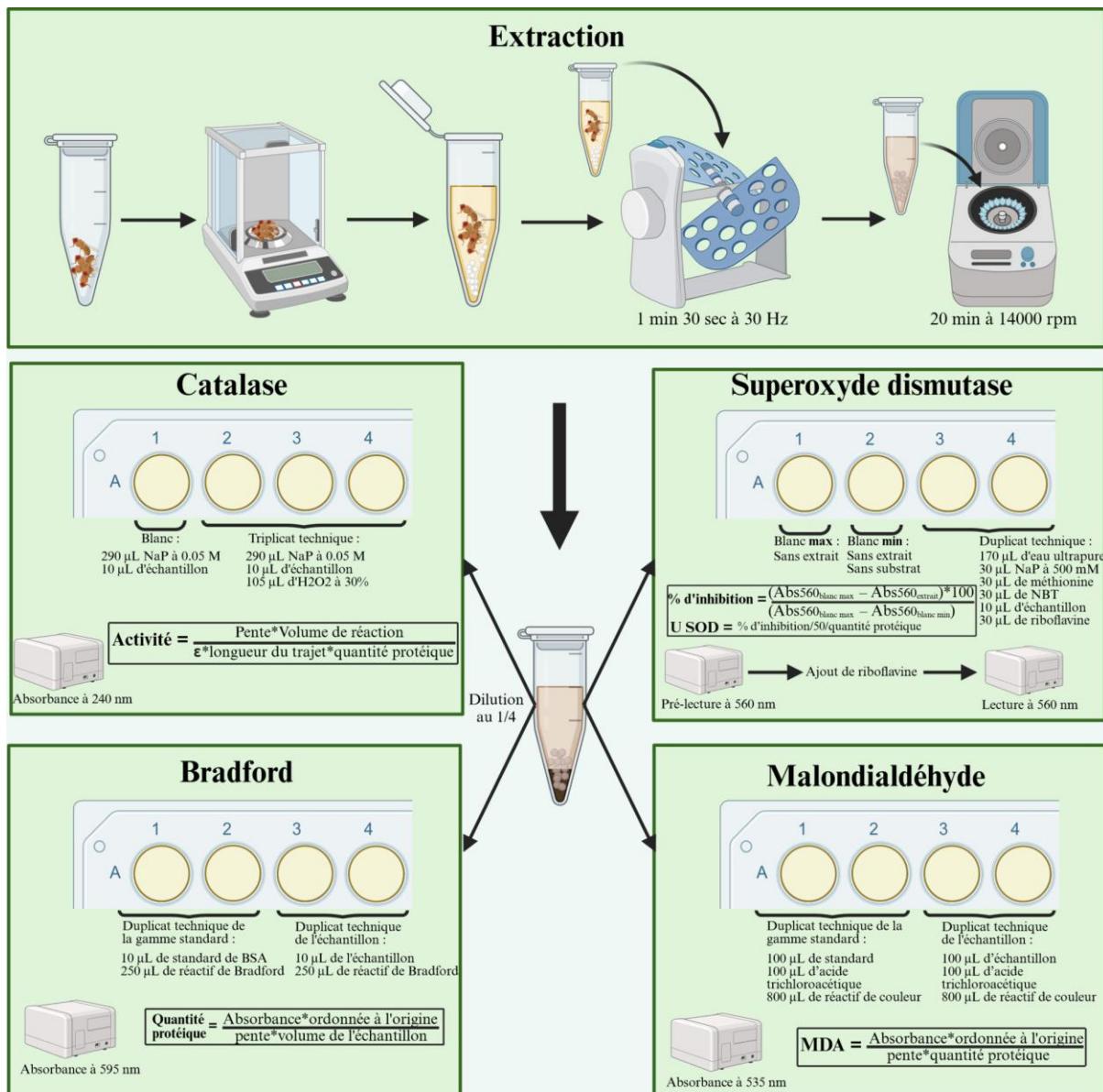
- Zhao, Li**, et al. "Transgenerational toxicity of nanopolystyrene particles in the range of $\mu\text{g L}^{-1}$ in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Environmental Science: Nano* 4.12 (2017): 2356-2366.
- Bhagat, Jacky**, et al. "Worming into a robust model to unravel the micro/nanoplastics toxicity in soil: A review on *Caenorhabditis elegans*." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 138 (2021): 116235.
- Jiang, Baorong**, et al. "Health impacts of environmental contamination of micro-and nanoplastics: a review." *Environmental health and preventive medicine* 25 (2020a): 1-15.
- Sridharan, Srinidhi**, et al. "The polymers and their additives in particulate plastics: what makes them hazardous to the fauna?." *Science of the Total Environment* 824 (2022): 153828.
- Paul, Maxi B.**, et al. "Micro-and nanoplastics—current state of knowledge with the focus on oral uptake and toxicity." *Nanoscale Advances* 2.10 (2020): 4350-4367.
- Kik, Kinga**, et al. "Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms." *Environmental Pollution* 262 (2020): 114297.
- Matthews, Sara**, et al. "Polystyrene micro-and nanoplastics affect locomotion and daily activity of *Drosophila melanogaster*." *Environmental Science: Nano* 8.1 (2021): 110-121.
- Ong, Cynthia**, et al. "Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity." *Nanotoxicology* 9.3 (2015): 396-403.
- Kim, Hyung Min**, et al. "Uptake of nanopolystyrene particles induces distinct metabolic profiles and toxic effects in *Caenorhabditis elegans*." *Environmental pollution* 246 (2019): 578-586.
- Lei, Lili**, et al. "Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative damage and other adverse effects in *Caenorhabditis elegans*." *Environmental Science: Nano* 5.8 (2018): 2009-2020.
- Li, Dan**, et al. "Assessment of nanopolystyrene toxicity under fungal infection condition in *Caenorhabditis elegans*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 197 (2020): 110625.
- Tang, Hao**, et al. "Polypropylene microplastics affect the physiology in *Drosophila* model." *Bulletin of Entomological Research* 113.3 (2023): 355-360.
- Zhang, Yan**, et al. "Exposure to microplastics cause gut damage, locomotor dysfunction, epigenetic silencing, and aggravate cadmium (Cd) toxicity in *Drosophila*." *Science of the Total Environment* 744 (2020): 140979.
- Pappus, S. Aurosman**, et al. "A drosophila model to decipher the toxicity of nanoparticles taken through oral routes." *Cellular and molecular toxicology of nanoparticles* (2018): 311-322.
- Lushchak, Volodymyr I.** "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals." *Aquatic toxicology* 101.1 (2011): 13-30.
- Yu, Hong**, et al. "Effects of conventional versus biodegradable microplastic exposure on oxidative stress and gut microorganisms in earthworms: a comparison with two different soils." *Chemosphere* 307 (2022): 135940.
- Jiang, Xiaofeng**, et al. "Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*)."*Environmental Pollution* 259 (2020b): 113896.
- De Felice, Beatrice**, et al. "Dietary exposure to polyethylene terephthalate microplastics (PET-MPs) induces faster growth but not oxidative stress in the giant snail *Achatina reticulata*." *Chemosphere* 270 (2021): 129430.
- Irato, Paola**, et al. "Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function." *Antioxidants* 10.4 (2021): 579.
- Pérez-Albaladejo, Elisabet**, et al. "Plastics and plastic additives as inducers of oxidative stress." *Current Opinion in Toxicology* 20 (2020): 69-76.
- Henry, Youn**, et al. "Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of *Drosophila melanogaster* in interaction with gut microbiota." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 241 (2020): 110626.

- Shang, Yueyong**, et al. "The effect of microplastics on the bioenergetics of the mussel *Mytilus coruscus* assessed by cellular energy allocation approach." *Frontiers in Marine Science* 8 (2021): 754789.
- Zhu, Bo-Kai**, et al. "Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*." *Environmental Pollution* 239 (2018): 408-415.
- Jimenez-Guri, Eva**, et al. "Transgenerational effects on development following microplastic exposure in *Drosophila melanogaster*." *PeerJ* 9 (2021): e11369.
- Stanković, Jelena**, et al. "Exposure to a microplastic mixture is altering the life traits and is causing deformities in the non-biting midge *Chironomus riparius* Meigen (1804)." *Environmental Pollution* 262 (2020): 114248.
- Silva, Carlos JM**, et al. "Ingestion of small-sized and irregularly shaped polyethylene microplastics affect *Chironomus riparius* life-history traits." *Science of the Total Environment* 672 (2019): 862-868.
- Farfán-Pira, Keity J.**, et al. "A cis-regulatory sequence of the selector gene vestigial drives the evolution of wing scaling in *Drosophila* species." *Journal of Experimental Biology* 226.10 (2023): jeb244692.
- Zhong, Lichao**, et al. "Intake of polyamide microplastics affects the behavior and metabolism of *Drosophila*." *Chemosphere* 308 (2022): 136485.
- Prokić, Marko D.**, et al. "Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives." *TrAC Trends in analytical chemistry* 111 (2019): 37-46.
- Liu, Chunguang**, et al. "Widespread distribution of PET and PC microplastics in dust in urban China and their estimated human exposure." *Environment international* 128 (2019): 116-124.
- Botterell, Zara LR**, et al. "Bioavailability of microplastics to marine zooplankton: effect of shape and infochemicals." *Environmental Science & Technology* 54.19 (2020): 12024-12033.
- Dambre, Philippa D.** "Chemical components of plastics as endocrine disruptors: Overview and commentary." *Birth defects research* 112.17 (2020): 1300-1307.
- Rivas, Johanna**, et al. "Effects of phthalate and bisphenol plasticizers on the activity of glycolytic enzymes of the moth *Spodoptera littoralis*." *Journal of Insect Physiology* 149 (2023): 104533.
- Chen, Mei-Ying**, et al. "Transgenerational impact of DEHP on body weight of *Drosophila*." *Chemosphere* 221 (2019): 493-499.
- Yang, Huirong**, et al. "Interactions of microplastics and main pollutants and environmental behavior in soils." *Science of the Total Environment* 821 (2022): 153511.
- Beriot, Nicolas**, et al. "Interactions between agricultural mulching plastic debris and pesticides." *EGU General Assembly Conference Abstracts* (2020) : p. 4614.
- Peña, Aránzazu**, et al. "Interactions of microplastics with pesticides in soils and their ecotoxicological implications." *Agronomy* 13.3 (2023): 701.
- Wang, Wenfeng**, et al. "Environmental fate and impacts of microplastics in soil ecosystems: Progress and perspective." *Science of the total environment* 708 (2020): 134841.
- Anbumani, Sadasivam**, et al. "Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (2018): 14373-14396.
- Huerta Lwanga, Esperanza**, et al. "Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain." *Scientific reports* 7.1 (2017): 14071.
- Caquet, Thierry**, et al. "Consequences of individual-level alterations on population dynamics and community structure and function." *Use of biomarkers for environmental quality assessment*. CRC Press, (2021): 269-302.
- Va, Deepa Parvathi**, et al. "Wonder animal model for genetic studies-*Drosophila melanogaster*-its life cycle and breeding methods-a review." *Sri Ramachandra Journal of Medicine* 2.2 (2009): 33-38.

Annexes



Annexe 1: Cycle de développement de *Drosophila melanogaster* (Va et al., 2009). Créeée avec [BioRender.com](https://biorender.com).



Annexe 2: Schéma du protocole mis en place pour étudier les traits physiologiques de *D.melanogaster* exposé à quatre concentrations de nanoplastiques intégrées dans la nourriture (0, 1,05, 105, 525 µg NP/g de nourriture). Créeée avec [BioRender.com](https://www.biorender.com).