

Porcellana Platycheles (Porcellanidae, Decapoda) : sensibilité aux microplastiques et intérêt écotoxicologique

Clément Baracchini, Tutoré par Dr. Vincent Leignel

Rapport de première année du Master mention Toxicologie Ecotoxicologie,

spécialité Toxicologie Humaine et Environnementale de l'université d'Angers

Laboratoire d'accueil : BiOSSE - Le Mans Université, avenue Olivier Messiaen, 72000 Le Mans

L'évaluation de la pollution aux microplastiques (MPs) est une préoccupation sociétale importante. De nombreuses études ont montré une forte accumulation de ces polluants dans tous les biotopes et au sein des organismes vivants. Beaucoup de travaux se sont focalisés sur l'estimation des teneurs en MPs mais peu sur leurs effets sur le vivant en milieu marin. Au cours de mon stage, nous avons évalué les effets d'un cocktail de MPs récoltés dans l'environnement sur les réponses enzymatiques antioxydantes (Catalase, GPx, SOD), sur un marqueur de neurotoxicité (AChE) et sur la teneur en glycogène (marqueur de réserves énergétiques) de l'espèce *Porcellana platycheles* (crustacé marin suspensivore). Les contaminations ont été menées à deux concentrations environnementales (10 µg/L et 100 µg/L) pendant 5 et 10 jours. En parallèle, une caractérisation des MPs utilisés a permis de connaître la diversité et leur charge en additifs (alkylphénols, HAP, métaux, phtalates). Les MPs se sont révélés avoir notamment une forte teneur en Dibutyl-phthalate (DBP). Nos travaux ont montré, à 10 µg/L MPs, une augmentation significative des 3 marqueurs Catalase, GPx et SOD à J5 puis une forte réduction à J10. De plus, une inhibition significative des réponses antioxydantes à 100 µg/L et de l'activité des acétylcholinestérases (AChE) ont été observées. Cette inhibition enzymatique "en cloche" pourrait être due aux MPs mais également à la forte présence du DBP, reconnu comme perturbateur endocrinien. En parallèle, la réduction de l'activité des AChE montre un effet neurotoxique de nos polluants. Enfin, une baisse du taux de glycogène a été mise en évidence au cours des expériences indiquant un investissement énergétique dans le maintien de l'homéostasie lors des conditions de stress.

Mots clefs : P.platycheles; Microplastiques; Réponses antioxydantes; Neurotoxicité ; Glycogène

Assessment of microplastic (MPs) pollution is an important societal concern. Numerous studies have shown a strong accumulation of these pollutants in all biotopes and within living organisms. Many studies have focused on estimating MPs levels but few on their effects on living organisms in the marine environment. During my internship, we evaluated the effects of a cocktail of MPs harvested from the environment on antioxidant enzymatic responses (Catalase, GPx, SOD), on a neurotoxicity marker (AChE) and on glycogen content (a marker of energy reserves) of the crustacean *Porcellana platycheles* (suspension-eating crustacean). The contaminations were carried out at two environmental concentrations (10 µg/L, and 100 µg/L) for 5 and 10 days. In parallel, the MPs are characterized to know the diversity and their load of additives (alkylphenols, PAHs, metals, phthalates). The MPs were found to have a high Dibutyl-phthalate (DBP) content. Our work showed, at 10 µg/L MPs, a significant increase in the Catalase, GPx and SOD on D5 then a strong reduction on D10. In addition, significant inhibition of antioxidant responses at 100 µg/L and acetylcholinesterase (AChE) activity were observed. This "bell-shaped" enzymatic inhibition could also be due to the MPs and the strong presence of DBP, recognized as an endocrine disruptor. In parallel, the reduction in the activity of AChE shows a neurotoxic effect of our pollutants. Finally, a decrease in the glycogen level was demonstrated during the experiments indicating an energy investment in the maintenance of homeostasis during stress conditions.

Keywords : P.platycheles ; Microplastics; Antioxydant responses; Neurotoxicity; Glycogen

Abréviations

-MPs : Microplastiques
 -PE : Polyéthylène (basse et haute densité)
 -PP : Polypropylène
 -PVC : Chlorure de polyvinyle
 -PS : Polystyrène
 -PVC : Polychlorure de vinyle
 -FOMI : fibres organiques artificielles
 -PET : Polyéthylène téréphtalate
 -PEHD : Polyéthylène Haute Densité
 -AchE : AcetylCholineEsterase
 -ASCh : AcetylThioCholine
 -J5 : période d'exposition de 5 jours
 -J10 : période d'exposition de 10 jours
 -ETM : Eléments traces métalliques
 -HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
 -PAE : Phthalic acid esters
 -PE: Perturbateur endocrinien
 -SOD : Superoxyde dismutase
 -CAT : Catalase
 -GPx : glutathion peroxidase
 -MDA : Malondialdéhyde
 -TCA : Trichloroacetic acid
 -TBARS :Thiobarbituric Acid
 Reactive Substances
 -DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane
 -NBT : Bleu nitré-tétrazolium chlorure
 -EPI : Equipement de protection individuelle
 -NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

1. Introduction

1.1 Généralités sur les microplastiques

Les plastiques sont des matériaux polyvalents légers, solides, peu coûteux, durables et résistants à la corrosion. De plus, ils présentent des valeurs d'isolation thermique et électrique élevées [1]. Ces matières plastiques sont généralement obtenues à partir du charbon, du gaz naturel et du pétrole [2].

Ils peuvent être synthétisés à partir de polymérisation de Polyéthylène (PE) à basse et à haute densité, Polypropylène (PP), Chlorure de polyvinyle (PVC), Polystyrène (PS), et de Polyéthylène téréphtalate (PET) [3].

La production moyenne annuelle de plastiques en Europe est estimée à 375 millions de tonnes. Entre 1950 et 2015, un total de 6,3 milliards de tonnes de déchets plastiques primaires et secondaires (recyclés) a été généré, dont environ 9 % ont été recyclés et

12 % incinérés ; les 79 % restants étant soit stockés dans des décharges, soit rejetés directement dans l'environnement naturel [4]. Par exemple, Au niveau mondial, on estime pour l'année 2010 que les pays côtiers ont rejeté entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de plastique dans les océans [5]. L'absence de gestion des déchets a conduit à l'accumulation de plus de 170 milliards de particules plastiques flottantes dans le milieu marin [6]. L'océan Atlantique Nord présente une abondance relativement modeste de microplastiques par rapport aux autres océans, avec une moyenne de 25 particules m⁻³ [7].

Une fois libérés dans l'environnement, les plastiques se décomposent en débris de plus petites tailles sous l'effet de facteurs physiques tels que les radiations solaires, les courants atmosphériques et aquatiques ; mais également sous les actions des organismes vivants [8] ; [9]. Les débris plastiques peuvent donc être divisés selon leur taille en macroplastique (supérieure à 5 mm), microplastique (inférieure à 5 mm), voire nanoplastique (inférieure à 1 µm)[10].

Ces petites particules emportées par les vents et les vagues peuvent se déposer sur de larges distances [1] ; [3]. Les microplastiques sont incorporés aux sédiments, aux particules en suspension et au plancton dans la colonne d'eau et sont donc facilement biodisponibles pour la faune aquatique[11].

Les voies d'internalisation des particules de plastique sont principalement la respiration via les branchies, ou l'alimentation avec des produits alimentaires et le sédiment contaminés. Les microplastiques sont devenus ainsi un type de polluant ubiquiste dans les écosystèmes marins [12].

En France, une étude concernant la baie de Brest (Atlantique Nord-Est) a indiqué que la composition des microplastiques dans l'eau de surface est de 53% de fragments, 25% de fibres, 11 % de mousses, 8% de feuilles minces et 3% de granulés. Par ailleurs, les échantillons de sédiment contenaient 71% de fragments, 21% de fibres et 8% de feuilles minces. La contamination en MPs dans les eaux de surface et les sédiments était dominée par des fragments de Polyéthylène (PE), de 53% à 67%, suivis par des microparticules de Polypropylène (PP), de 16-30% et de Polystyrène (PS), de 16 à 17% [13]. De plus, les granules de plastique absorbent les polluants organiques et les transportent au sein de l'environnement marin (agissant comme un "réservoir") [14]. Ils peuvent donc être considérés comme des vecteurs de pollution en s'associant à des composés tels que les métaux, les phtalates et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. De plus,

lors de leur production les plastiques sont mis en contact avec des substances plastifiantes ou additives [15]. Un exemple d'additifs est les phtalates qui sont reconnus comme des perturbateurs endocriniens [16] ; [1].

1.2 Ampleur du risque des microplastiques sur les vertébrés

Si les macroplastiques, ne représentent pas de danger pour le fonctionnement cellulaire, puisque leur taille empêche leur pénétration dans la cellule, ils peuvent induire des problèmes respiratoires par étranglement et des obstructions digestives [17]. De plus, l'ingestion de plastiques peut faciliter le relargage des polluants associés (métaux...) qui eux pourront être internalisés. À partir de la taille micrométrique, les plastiques peuvent véhiculer dans les fluides corporels (sang, hémolymphe...) et libérer aussi leurs additifs [18].

De multiples études ont révélé les effets des MPs et/ou des additifs sur la santé des oiseaux, poissons et mammifères ; [19] ; [20] Ces études mettent en évidence par exemple une modulation des réponses antioxydantes et immunitaires et une diminution des réserves énergétiques.

1.3 Ampleur du risque des microplastiques sur les invertébrés

La bioaccumulation des MPs chez divers organismes marins assurant différentes niches écologiques a été amplement évaluée. Par exemple, pour le modèle des bivalves (organisme filtreur) il a été observé chez *Mytilus edulis* des microplastiques (PEHD de 80 µm, piégés directement à partir de la colonne d'eau) dans les branchies et dans les intestins. Cela suggère que les particules ont été ingérées via les mouvements ciliaires et ensuite transférées vers cet organe [21]. Chez les invertébrés suspensivores tel que les holothuroïdes des fragments de nylon et de PVC (0,25 - 15 mm) a également été prouvée [22].

De nombreuses études chez les crustacés mettent en évidence une accumulation de microplastiques dans les branchies (Par exemple, [23], l'hépatopancréas (Par exemple, [24]) et le tractus gastro-intestinal (Par exemple, [25]). Des études expérimentales ont également mis en évidence les effets toxiques des microplastiques par une augmentation du stress oxydatif [26]. Toutefois, les travaux publiés sur les effets des microplastiques sur les organismes marins mettent en avant des particules achetées dans le commerce, majoritairement de type microsphère de Polystyrène; excepté pour l'étude publiée en 2023

par Metais et al portant sur des MPs environnementaux sur le bivalve *Scrobicularia plana* [27]. Il est important de rappeler que les particules microplastiques sont des supports passifs [Lohman], ce qui signifie que tout contaminant dont la fugacité est plus élevée dans l'environnement que dans le plastique s'adsorbera sur le microplastique jusqu'à ce que l'équilibre chimique soit atteint [28]. Ces produits peuvent à leur tour induire des effets sur les organismes marins.

1.4 Le Modèle : *Porcellana Platycheles*

La famille des *Porcellanidae*, incluant 50 espèces, est représentée en Atlantique Nord-Est et en mer Méditerranée par quatre espèces appartenant à deux genres (*Pisidia* et *Porcellana*) : *Pisidia longimana*, *Pisidia longicornis*, *Pisidia bluteli* et *Porcellana platycheles*. En Atlantique, on ne rencontre que *P.platycheles* et *Pisidia longicornis* [29].

L'aire de distribution de *P.platycheles*, s'étend plus précisément le long de la côte Atlantique, du Sud de la Norvège au Sud du Portugal, et le long des côtes de la mer Méditerranée [30]. On trouve cette espèce principalement sur des substrats intertidaux rocheux (estran). Dans cette zone, elle est limitée aux rivages avec des rochers et des blocs, d'un diamètre de 20 à 30 cm ou moins. *P.platycheles* est généralement inactif, surtout le jour où il s'accroche à la face inférieure d'un rocher. Dans cette position, il reste assez immobile. La seule activité est le battement alternatif de ses 3ème maxillipèdes (pièces buccales) en forme d'éventail. Ainsi, l'animal s'alimente en récupérant dans ses soies des 3ème maxillipèdes les particules (régime suspensivore) [31].

La taille minimale des adultes est de 5,61 mm de longueur de carapace [31]. Chez les femelles, les deux chélicèdes (membre portant les pinces) sont de même taille, alors qu'il y a un dimorphisme chez les mâles [31].

Porcellana platycheles semble posséder l'ensemble des critères recommandés pour qu'elle soit reconnue comme sentinelle en écotoxicologie. Tout d'abord, le critère de taille est respecté car les individus possèdent généralement des corps de plusieurs centimètres de diamètre, et peuvent ainsi être étudiés individuellement. En plus de sa densité importante sur l'estran, elle est la seule du genre *Porcellana* en Atlantique donc la confusion avec une autre espèce est impossible[29]. Par ailleurs, cette espèce est facilement reconnaissable morphologiquement par la présence de longues soies sur ces chélicèdes (1ère

paire de membres). D'autre part, sa répartition est étendue ce qui permet une représentativité de ce modèle pour refléter les contaminations sur une large aire géographique (Sud Norvège-Sud Portugal et en Méditerranée) [30].

Il reste à évaluer sa sensibilité à accumuler les polluants et sa capacité à répondre physiologiquement à leur présence.

1.5 Problématique et objectifs

L'étude des effets des microplastiques sur les invertébrés marins a été fortement développée sur les bivalves (organismes filtreurs) mais très peu investie pour des animaux assurant d'autres fonctions écologiques (prédateur, suspensivore, détritivore...). De plus, nous rappelons que les publications relatent principalement des expériences menées avec des MPs commerciaux, majoritairement des microbilles de polystyrène.

La problématique de mon stage a donc porté sur l'évaluation des effets de MPs issus de macroplastiques environnementaux et fragmentés en laboratoire sur le crustacé suspensivore *Porcellana platycheles*. Nos expériences ont été menées en utilisant des concentrations environnementales de MPs (10 µg/L, 100 µg/L) pendant des contaminations subchroniques (5 jours et 10 jours). Les réponses du crustacé aux MPs ont été estimées par les niveaux de réponses antioxydantes (catalase, GPx, SOD), du marqueur de neurotoxicité (AChE) et du taux de réserves énergétiques de type glycogène. Un autre enjeu a été d'évaluer si *P. platycheles* réagissait aux polluants MPs et survivait en conditions de laboratoire pour déterminer si elle représentait bien une espèce sentinelle à valoriser à l'avenir en écotoxicologie marine. En complément de ce travail, une caractérisation des additifs aux MPs utilisés a été menée par des collègues de notre laboratoire BIOSSE pour identifier la diversité et les teneurs en métaux, alkyphénols, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et phtalates. Il est important de déterminer la présence de ces additifs car ces derniers, s'ils sont fréquents, pourraient induire un stress chez notre espèce pendant les expériences.

2. Matériels et Méthodes

2.1 Méthode de recherche bibliographique

La méthode de recherche bibliographique (littérature grise) repose sur l'utilisation du moteur internet de recherche Pubmed via l'utilisation de mots-clés. Le site de réseautage Researchgate a également été utilisé. L'utilisation de sites de web scraping (Sci Hub, Library Genesis) a parfois été inévitable. Les publications ont été compilées sur le logiciel de gestion de références Zotero. Cela a permis la gestion des données bibliographiques. Par la suite, le rapport a été rédigé avec le langage informatique du logiciel L^AT_EX, lié à Zotero.

2.2 Méthode statistique

Les données brutes ont été compilées dans le logiciel LibreOffice (Calc), exportées en format ".csv". Ensuite, elles ont été importées dans l'environnement de développement R studio pour la visualisation de données (version 2022.02.0+443) appartenant au langage de programmation open-source R (version R 4.1.3 GUI 1.77 High Sierra build). Les variables analysées ont été les biomarqueurs antioxydants (catalase, GPx, SOD), le taux de glycogène et de neurotoxicité (AChE), les concentrations (10g/L et 100g/L) ainsi que les durées d'exposition (5 et 10 jours). Nous étudions donc plusieurs groupes indépendants avec des effectifs de 5 individus ou plus. Le test de normalité de Shapiro-Wilk a été réalisé. Ensuite, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été employé pour savoir si les groupes étaient significativement différents les uns des autres ou non grâce à des p-values. La p-value globale du test de Kruskal-Wallis est une mesure statistique globale qui évalue l'hypothèse nulle selon laquelle il n'y a pas de différence significative entre les groupes examinés. La visualisation de données s'effectue sous la forme de boxplots pour CAT (catalase), GPx, SOD et MDA et sous la forme de lineplot pour la AChE. Des barres de significativité, des groupes, des légendes, des couleurs et des ajouts manuels sur R studio ont pu être utilisés pour faciliter la lecture. Des boxplot ont été utilisés car ils possèdent l'avantage graphique d'être clairs et concis pour caractériser les distributions et la dispersion des données des groupes (médiane, premier quartile, troisième quartile, "outliers"). L'activité enzymatique de l'AChE de chacun des lots a été représentée par des courbes pour montrer visuellement la cinétique enzymatique, en complément d'un tableau de résultats statistiques.

2.3 Échantillonnage des porcelanes et acclimatation

L'échantillonnage a été effectué sur la plage de Donville-les-bains en Normandie en France (Latitude : 48.849071106084075, Longitude : -1.5857311728890016). Le prélèvement a été effectué au hasard à différents niveaux de l'estran. Les porcelanes (environ 400 individus) ont ensuite été placées en laboratoire dans un aquarium ayant une très large base (40L d'eau artificielle Instant Ocean, 34g/L, éclairage : 15L/9N : éclairage de 6h à 21h) pendant les 7 jours correspondants à une phase d'acclimatation. Ces conditions appliquées correspondent aux valeurs des paramètres naturels de la période printanière.

2.4 Détermination des doses et de la durée d'exposition

Les concentrations utilisées sont représentatives de celles retrouvées en Atlantique Nord-Est. En effet, les publications faisant référence à des contaminations en Atlantique [32].

utilisent des concentrations similaires aux nôtres. La concentration de 10 $\mu\text{g/L}$ est représentative du scénario moyen (niveaux de MPs dans les estuaires) et la concentration de 100 $\mu\text{g/L}$ est représentative du scénario élevé (concentrations retrouvées dans les gyres océaniques) [33]; [19].

2.5 Design expérimental

Une fois les 7 jours d'acclimatation terminés, nous avons réparti les porcelanes en 30 individus par bouteille (500 mL d'eau artificielle, 34 g/L, éclairage : 15L/9N : éclairage de 6h à 21h, $18 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 7,2-7,4). Aucune nourriture n'a été fournie aux crustacés pendant les périodes d'exposition de 5 et 10 jours afin d'éviter une éventuelle entrée de microplastiques via l'alimentation. Au total, 10 lots (soit 10 bouteilles) ont été constitués : un lot contrôle "5 jours", un lot contrôle "10 jours", 2 lots de 10 $\mu\text{g/L}$ "5 jours", 2 lots de 100 $\mu\text{g/L}$ "5 jours", 2 lots de 10 $\mu\text{g/L}$ "10 jours", et enfin 2 lots de 100 $\mu\text{g/L}$ "10 jours" (Figure 1).

Avoir 2 bouteilles différentes pour une même dose et une même durée d'exposition a permis de s'affranchir d'un biais lié au contenant (bouteille). Ainsi, lors des différentes analyses, les individus provenaient de deux bouteilles différentes. Le matériel en contact avec l'eau était en verre (bouteille et pipette Pasteur) pour éviter toute contamination supplémentaire en plastiques. Les bouchons des bouteilles possèdent deux trous. Le

premier laisse passer une pipette Pasteur en verre pour le flux entrant d'oxygène, tandis que le second permet le flux sortant d'air. Les bouteilles ont été reliées par groupe de deux ou trois à un bulleur lui-même relié à une multiprise. Un changement d'eau des bouteilles a été effectué tous les deux jours pour éviter la prolifération algale.

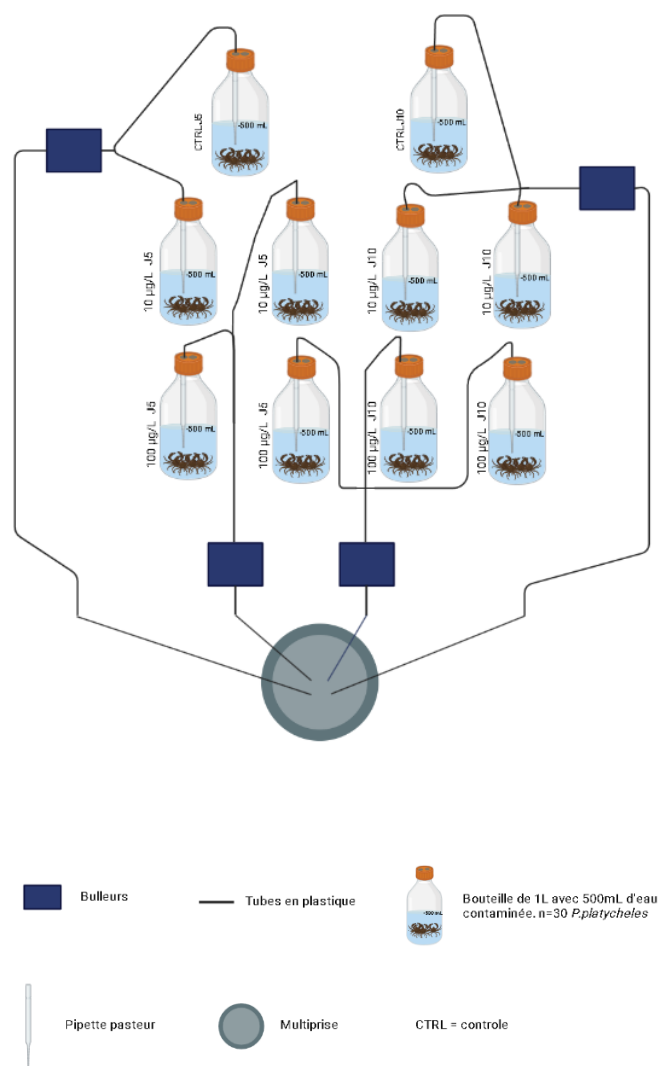


Figure 1: Schéma du design expérimental créé durant la phase de contamination. Les animaux sont placés dans des bouteilles d'1L. Pour chaque temps (J5 et J10, les concentrations de contamination sont de 10 $\mu\text{g/L}$ et 100 $\mu\text{g/L}$.

2.6 Morphométrie

Afin de s'assurer que les lots de crustacés étaient homogènes en taille (donc en âge) pour les différentes conditions étudiées, les individus ont été mesurés en déterminant la largeur (L) et la hauteur (h) de leur céphalothorax (Figure 2). ces mesures ont permis d'estimer le volume de chaque individu à l'aide d'un calcul. Pour ce faire, nous avons considéré que le céphalothorax des porcellanes pouvait être simplifié à un cylindre. La formule employée est alors la suivante :

$$V = \pi \times r^2 \times h$$

Où V= volume; r = rayon; h = hauteur

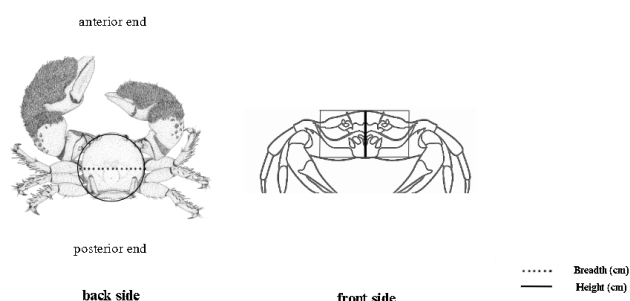


Figure 2: Schéma relatif aux mesures morphométriques réalisées sur *P. platycheles*. Les deux mesures correspondent à la hauteur et à la largeur du céphalothorax.

2.7 Microplastiques utilisés

Les microplastiques utilisés dans notre étude sont issus de macroplastiques collectés au niveau de l'estuaire de la Seine qui ont par la suite subi un processus de "vieillessement" artificiel en laboratoire de manière à imiter les dégradations physiques que subissent les plastiques dans les océans. Des analyses de dosage des xénobiotiques (alkylphénols, HAP, métaux, phtalates) fixés sur les MPs ont été réalisées en parallèle de l'étude. Les quantités de chaque groupe d'éléments microplastique et d'additifs seront interprétées dans ce mémoire et mises en lien avec notre travail.

2.8 Extraction des protéines

Les tissus mous des individus (1/2 individu voire individu complet si plus petit) ont été broyés à l'aide d'azote liquide dans des mortiers. L'utilisation de protections individuelles (EPI) a été nécessaire (lunette, gant, blouse). Les échantillons ainsi obtenus

ont été placés dans 2 mL de tampon TBS pH 7.4 (solution TBS), permettant d'imiter les conditions physiologiques (Tris-Buffered Saline pH 7.4 ; Tris-Cl 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, HCl 1M), au sein d'éppendorf de 15mL.

0.1 2.9 Estimation des concentrations de protéines extraites

Les broyats ont été centrifugés à 9000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant, contenant le cytosol, a été alors récupéré et conservé à -20 °C. Le dosage des protéines a été alors réalisé selon la méthode de Lowry et al. (1951) dans des tubes en plastique. La concentration en protéine de chaque échantillon (correspondant à chaque individu) a été nécessaire pour calculer par la suite les activités enzymatiques. En effet, la concentration en protéines est un paramètre inclus dans chaque équation. C'est une variable qui a pour rôle d'égaliser et donc d'harmoniser le jeu de données. Des différences de concentration en protéines pourraient effectivement s'expliquer par des masses différentes pour un même volume, et biaiser les analyses si nous n'effectuons pas de normalisation.

2.10 Dosage de la SOD

Le dosage de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) a été effectué par la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Cette approche spectrophotométrique a permis une mesure de l'activité de la SOD d'une manière indirecte, en utilisant le complexe riboflavine/méthionine, producteur des anions superoxydes, et la NBT. L'oxydation du NBT par l'anion superoxyde O_2^- a été mesurée à 560 nm. La SOD issue des extraits entre en compétition pour l'utilisation de l' O_2^- et donc limite l'oxydation de la NBT. Dans un milieu aérobique, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. L'absorbance est mesurée à 560 nm et l'activité de SOD est calculée selon la formule :

$$Activité_{SOD} = \frac{\left(\frac{DO_T - DO_{ech}}{DO_T} \right) * 100 * 20}{[Protéines]} * Fd$$

50

Avec DO_{ech} : la densité optique de l'échantillon, DO_T : la densité optique du total (T), Fd : facteur de dilution des échantillons

2.11 Dosage de la catalase

Le dosage in vitro de la catalase (CAT) a été mis au point par Aebi et al. (1984) et perfectionné par de Nicholls et al. (2012). Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tetramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en dioxygène. L'activité SOD est calculée selon la formule :

$$\text{Activité CAT} = \frac{\Delta DO * d}{\epsilon * l * X * 0.02}$$

ADO : variation de la densité optique par minutes c'est-à-dire pour : $(AI - AF) \times 4/3 = \Delta DO$; AI (Absorbance initiale) : 15 secondes; AF (Absorbance finale) : 1 minute; d : dilution de l'échantillon au début ; ϵ : Coefficient d'extinction 0.043 mM⁻¹ cm⁻¹ = 0,043 μ mol cm⁻¹ml⁻¹; l : Largeur de la cuve (longueur du trajet optique) en cm

2.12 Dosage de la Glutathion peroxydase

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée selon la méthode de Flohe et Gunzler (1984), en utilisant H₂O₂ comme substrat car l'enzyme GPx transforme le H₂O₂ en H₂O en utilisant le GSH. Cette activité est exprimée en moles de GSH oxydé/min/mg de protéines. L'activité est calculée par la diminution du taux de GSH par rapport à la réaction non enzymatique (blanc):

$$\text{Activité}_{GPx} = \frac{0.04 * (DO_E - DO_B) * 5}{DO_B * 10 * X}$$

Avec : DOE la densité optique de l'échantillon, DOB la densité optique du blanc, X la quantité de protéines dans l'échantillon, 0.04 la quantité initiale de GSH, 5 pour convertir l'activité en mL et 10 le temps de la réaction en minute

2.13 Dosage du taux de peroxydation lipidique

Le dosage du taux de peroxydation lipidique a été mis au point par Niehaus et Samuelsson (1968) puis Esterbauer (1993). La peroxydation lipidique est évaluée par le dosage des aldéhydes (dont le MDA) réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Le dialdéhyde malonique ou MDA est le marqueur le plus utilisé pour la peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Le MDA libre n'est pas ou peu mesurable

car il disparaît rapidement par formation d'adduits. La méthode de mesure repose donc sur une libération en milieu acide du MDA fixe. Lors d'un traitement à chaud, les aldéhydes réagissent avec le TBA (acide thiobarbiturique) pour former un produit de condensation chromogène consistant en 2 molécules de TBA est une molécule de MDA. L'absorption intense de cet adduit (mesure à 532 nm) rend cette mesure très sensible. La concentration de MDA est calculée selon la formule suivante :

$$C = DO \cdot 10^6 / (E \times L \times X \times Fd)$$

C : concentration de MDA en nmoles par milligramme de protéines; Do : densité optique lue à 532 nm; E : coefficient d'extinction molaire du MDA ; (E = 1,56 10⁵ M⁻¹.cm⁻¹); L : longueur du trajet optique = 0.779 cm; X : concentration du cytosol en protéines (mg/ml); Fd : facteur de dilution : Fd = (Ve x Vs) / (Vf x VF) avec : Ve : volume de prise de l'échantillon (375 μ L); Vs : volume prélevé du surnageant (400 μ L); VF : volume final à l'incubation. Après la centrifugation on récupère 400 μ L du surnageant et l'on ajoute 80 μ L HCl et 320 μ L Tris-TBA. Le Fd est donc de 0.2083.

2.14 L'activité Acétylcholinestérasique

L'Acétylcholinestérase (AChE) est le principal biomarqueur de neurotoxicité [34]. L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur cholinergique excitateur présent chez les vertébrés et de nombreux invertébrés, qui régule principalement la transmission neuromusculaire. L'ACh est synthétisée par l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) à partir de l'acétyl coenzyme A et de la choline dans les terminaisons nerveuses. Chez les invertébrés, la transmission neuromusculaire est à la fois glutamatergique et cholinergique. Le système stomatogastrique des crustacés est principalement cholinergique et contrôle la motricité viscérale [35]

L'activité cholinestérase a été déterminée grâce à la méthode d'Ellman et al. (1961). Pour chaque essai, il a fallu déterminer le volume correspondant à une masse protéique de 0,6 mg et adapter le volume de tampon phosphate à ajouter. Les DO des différents essais ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Ultrospec 2100 Pro UV-Visible à la fin des 5 minutes, puis 50L d'AcetylThioCholine 45 mM ont été ajoutées. Les DO ont été prises à 1 minute, 2 minutes, 3 minutes et 4 minutes.

2.15 Dosage du glycogène

Le glycogène est un biomarqueur physiologique représentatif des principales fractions de réserves d'énergie biochimique (Rodrigues, 2013). Le dosage du glycogène a été réalisé selon la méthode d'analyse des sucres totaux et glycogène (Dubois et al. 1956).

Cette méthode consiste en la cristallisation du glycogène par de l'éthanol absolu. Une gamme étalon spécifique au glycogène a du être réalisée. Celle-ci correspond simplement à une dilution en cascade de 0 a 500 g/ml dans le TCA a 15 % a partir de glucose concentre a 100 mg/dl et une série de lecture à 490 nm.

3. Résultats

3.1 Observations

Le mode d'alimentation suspensivore a été observé chez P. platycheles durant les phases d'acclimatation et de contamination. Les animaux capturent les particules de matière organique grâce à leurs pièces buccales. Nos observations ont également associé P. platycheles à une espèce grégaire. Les individus sur le terrain et dans nos dispositifs expérimentaux possédaient une forte tendance à la cohésion.

3.2 Homogénéité des lots consacrés aux analyses de réponses antioxydantes

Comme les p-values globales obtenues pour les différents lots de porcellanes utilisés lors des contaminations pour la mesure des marqueurs ont été toutes supérieures à 0,05 (0,24 pour SOD; 0,69 pour CAT; 0,45 pour GPx; 0,81 pour MDA), nous pouvons affirmer que les lots des individus étaient homogènes pour l'ensemble des travaux entrepris (Figure 3).

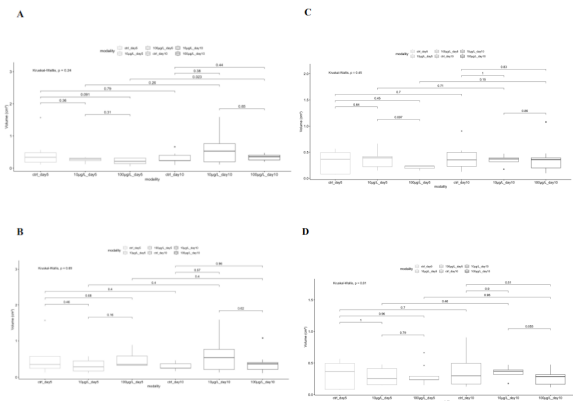


Figure 3: *Fig.3 Volume en cm³ du céphalothorax des individus utilisés pour les 4 biomarqueurs de stress oxydatif (A) SOD, (B) catalase, (C) GP, (D) MDA, peroxydation lipidique.*

3.3 Concentration en protéines

La variance est illustrée par la zone grise. Le $R^2=0,996$. Le R^2 permet d'évaluer la qualité du modèle de régression. Celui-ci varie entre 0 et 1 ; où 1 indique que le modèle explique la variance de la variable. Notre modèle relatif à l'estimation de la concentration en protéine est donc très fiable.

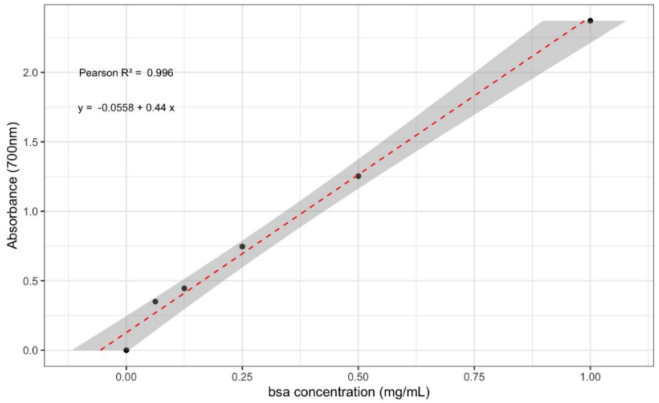


Figure 4: *Courbe de calibration obtenue par dilution en cascade de BSA (bovine serum albumin). L'axe y correspond à la concentration en BSA (mg/mL soit g/L) et l'axe x correspond à l'absorbance mesurée à 700 nm. L'équation de la droite est $y=0,0558+0,44x$. La variance est illustrée par la zone grise. Le $R^2=0,996$.*

3.4 L'activité de la SOD

Aucune activité de la SOD significative n'est observée à J5 (Figure 5A) puisque toutes les p-values sont supérieures à 0,05. En revanche, une inhibition de la SOD est notée à 100 µg/L (Figure 5B) avec une p-value de 0,0053. Lorsque l'on étudie l'évolution des réponses au cours le temps (Figure 5 C) on s'aperçoit d'une réduction de l'activité de la SOD. En effet, toutes les p-values affichées sont nettement supérieures au seuil de significativité (0,05), ce qui indique qu'un effet temps-dépendant de la réponse SOD se produit durant la contamination car des baisses d'activité sont observées (Figure 5C).

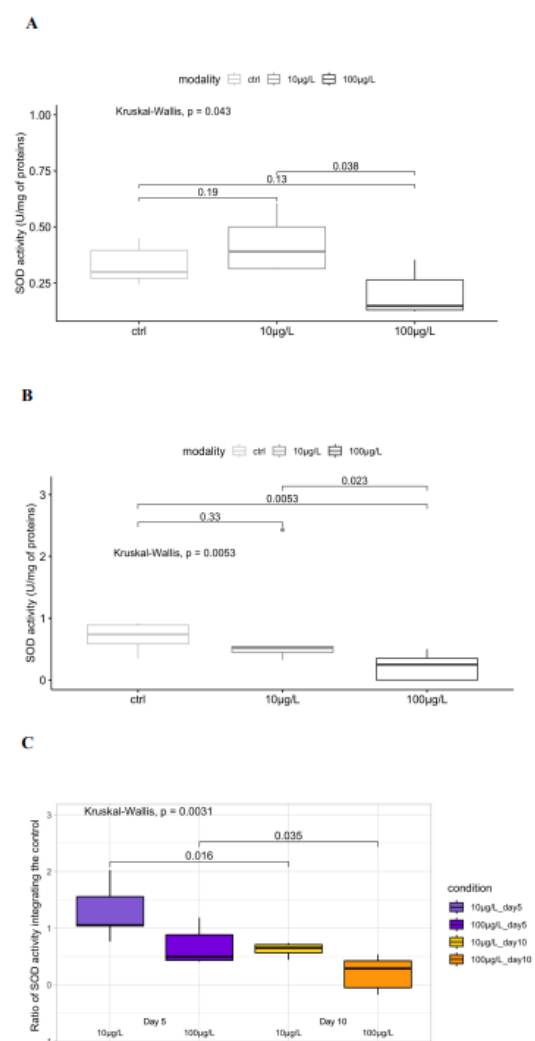


Figure 5: Visualisation de données relatives à l'activité enzymatique de la SOD (A) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 5 (B) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 10 (C) Evolution des réponses en fonction des périodes d'exposition (J5 et J10) (D) Comparaison des réponses entre 10µg/L et 100µg/L pour chaque période d'exposition (J5 et J10) séparément. Les graphiques C et D ont été créés à partir de ratio d'activité en divisant chaque activité par la médiane des activités lui correspondant.

3.5 L'activité de la catalase

Pour la catalase, les réponses quantifiées après 5 jours montrent une augmentation de l'activité catalytique significative ($0,035 < 0,05$) pour la concentration à 10 µg/L (Figure 6A). Après le dixième jour, aucune réponse relative à la catalase n'est notée (0.73, 0.73, 0.2). En revanche, l'évolution des réponses en fonction du temps est en accord avec les autres biomarqueurs puisqu'une réduction est significativement observée (Figure 6 C) où les p-values affichent des significativités (0.0079 et 0.036).

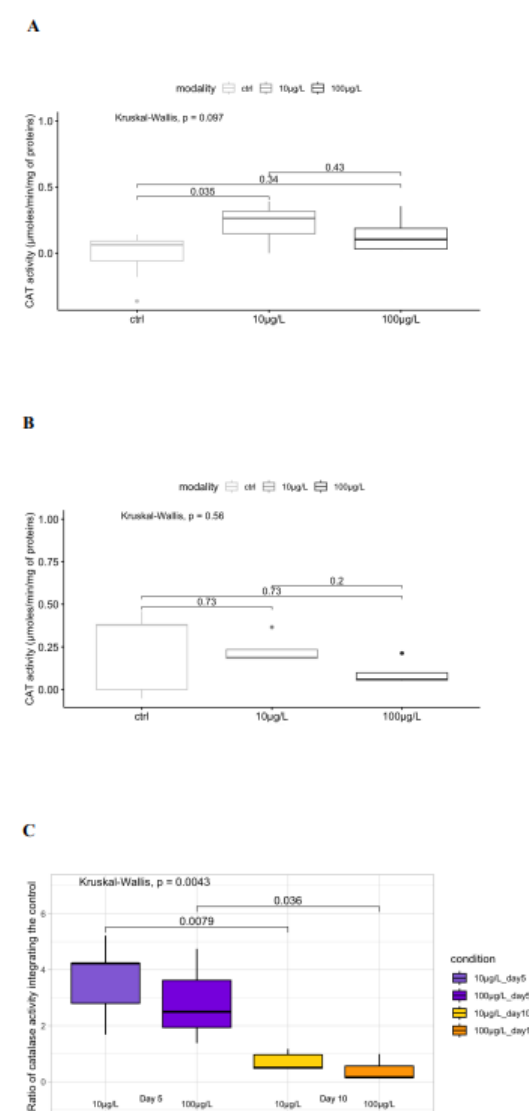


Figure 6: Visualisation de données relatives à l'activité enzymatique de la catalase (A) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 5 (B) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 10 (C) Evolution des réponses en fonction des périodes d'exposition (entre J5 et J10) Le graphique C a été créé à partir de ratio d'activité en divisant chaque activité par la médiane des activités lui correspondant.

3.6 L'activité de la GPx

La Gpx possède le même profil de réponse que la catalase et reste en accord avec l'ensemble des résultats relatifs aux réponses antioxydantes de l'étude. Les réponses quantifiées après 5 jours montrent un effet monotone pour la concentration à 10µg/L (Figure 7A) avec une augmentation de l'activité de la GPx significative ($0,011 < 0,05$). Ensuite, l'évolution des réponses en fonction du temps affichent très clairement une inhibition (Figure 6C) où les p-values montrent là aussi d'évidentes significativités ($0,0061$ et $0,032$).

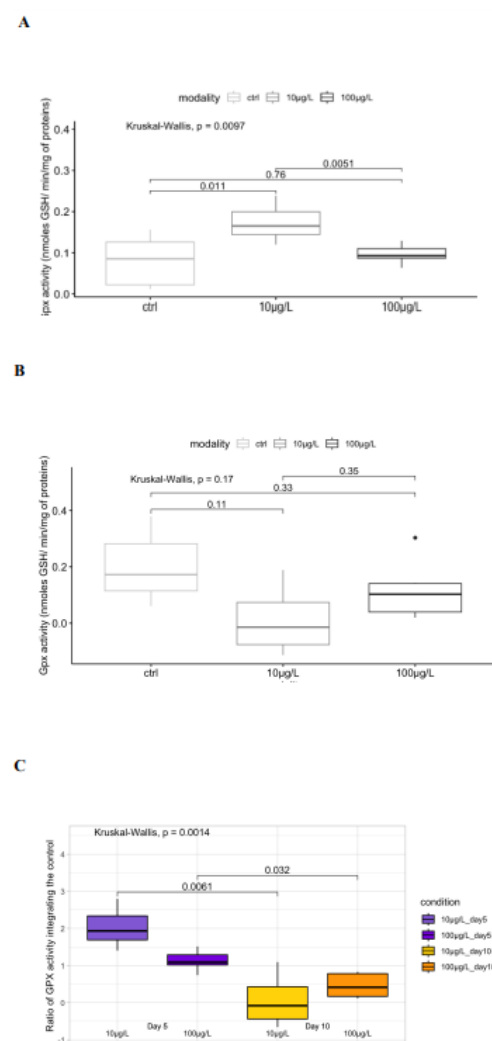


Figure 7: Visualisation de données relatives à l'activité enzymatique de la GPX (A) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 5 (B) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 10 (C) Evolution des réponses en fonction des périodes d'exposition (entre J5 et J10). Le graphique C a été créé à partir de ratio d'activité en divisant chaque activité par la médiane des activités lui correspondant.

3.7 Mesure de la peroxydation lipidique (MDA)

La peroxydation lipidique n'a pas été affectée par les deux concentrations de microplastiques (10µg/L et 100µg/L), après 5 et 10 jours car aucune valeur n'est significative (0,34, 0,66) par rapport au lot contrôle (Figure 8).

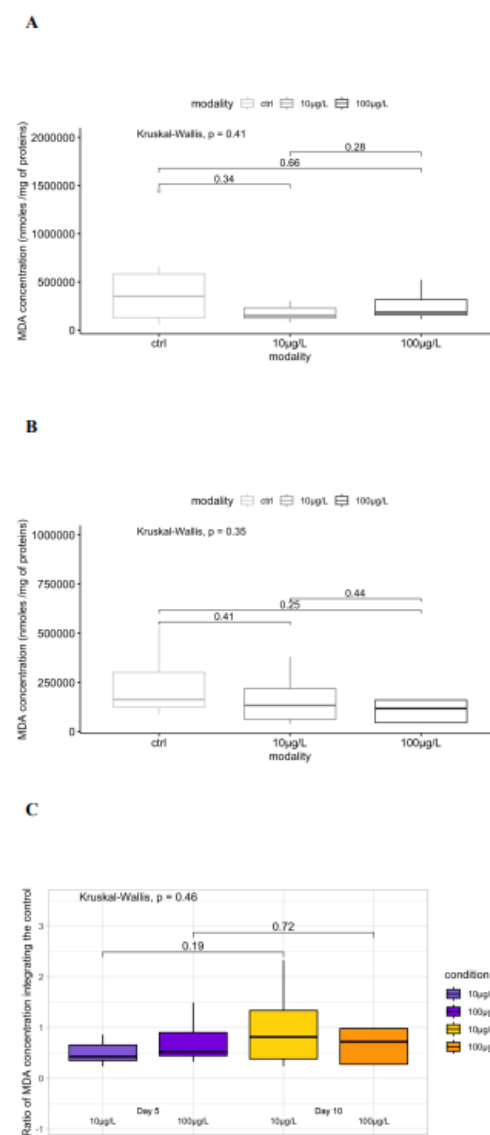


Figure 8: Visualisation de données relatives aux concentrations en MDA, correspondant au degré de peroxydation lipidique (A) Comparaison des concentrations au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 5 (B) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 10 (C) Evolution des réponses en fonction des périodes d'exposition (entre J5 et J10)

3.8 Mesure du marqueur AchE de Neurotoxicité

Suite aux dosages d’AchE dans les tissus de *P. platycheles*, nous avons noté une inhibition de l’acétylcholinestérase qui est un marqueur de neurotoxicité [34] (Figure 9) aux deux concentrations (10µg/L et 100µg/L). Cette inhibition est confirmée par le biais de t-test entre le lot contrôle et les lots exposés à 10µg/L et 100µg/L (Tableau 1).

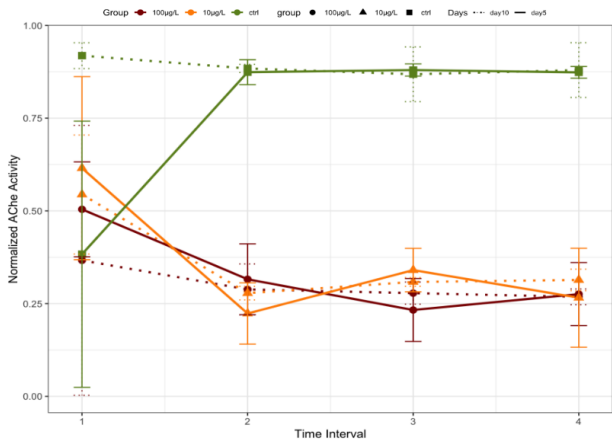


Figure 9: Activité acétylcholinestérasique de chacun des lots (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) après les deux périodes d’exposition (5 et 10 jours)

Table 1: Mean activity measurements for each group.

Group	Mean Activity	Standard Deviation	p-value
10µg/L	0.5257	1.4369	0.0061
100µg/L	0.6838	1.3987	0.0031
Ctrl	-1.4839	5.0301	

3.9 Evaluation du taux de glycogène (marqueur de réserves énergétiques)

Le R^2 permet d’évaluer la qualité du modèle de régression. Celui-ci varie entre 0 et 1 où 1 indique que le modèle explique la variance de la variable. Notre modèle relatif au dosage du glycogène est donc très fiable. Les contaminations aux microplastiques provoquent la décroissance des concentrations de glycogène, qui diminue fortement à 5 jours de contamination, à 10µg/L et 100µg/L (figure 11A) avec des p-values supérieures à 0.05 (0.036 pour 10µg/L et 0.036 pour 100µg/L). Il n’y a pas de différence entre les deux concentrations (p-value de 0,056), il ne s’agit donc probablement pas d’un effet dose-dépendant. A J10, le même résultat est observé, le glycogène décroît fortement à 10µg/L (p-value de 0,036) et 100µg/L (p-value de 0,017). De plus, il y a donc confirmation de l’effet non-dose dépendant car aucune différence ne figure entre les deux concentrations (p-value de 0,88) (figure 11B). Le temps n’influe pas sur les résultats car aucune p-value (0.69, 0.93) n’est significative (figure 11C).

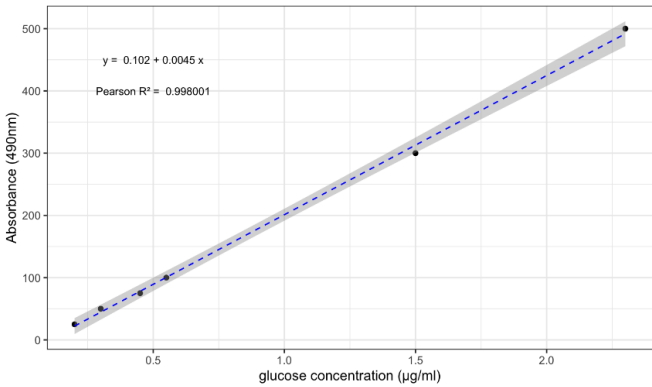


Figure 10: Courbe de calibration obtenue par dilution en cascade de glucose. L’axe y correspond à la concentration en en glucose (µg/mL) et l’axe x correspond à l’absorbance mesurée à 490 nm. L’équation de la droite est $y=0,102+0,0045x$. La variance est illustrée par la zone grise. Le $R^2=0,998$

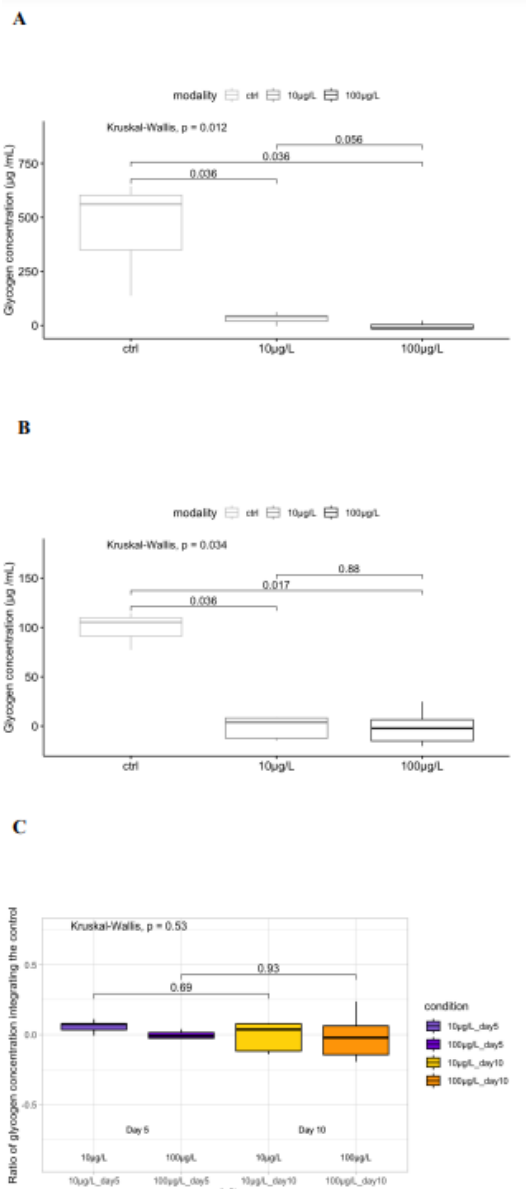


Figure 11: Visualisation de données relatives aux concentrations en glycogène. (A) Comparaison des concentrations au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 5 (B) Comparaison des activités au sein de chaque lot (contrôle, 10µg/L et 100µg/L) le jour 10 (C) Evolution des réponses en fonction des périodes d'exposition (entre J5 et J10).

3.10 Détermination des additifs liés aux MPs utilisés

L'analyse de détermination des additifs liés aux MPs a consisté en un dosage, donné en µg/g de chacun des composants. Les MPs environnements utilisés consistaient en un mélange de PE, PP, PVC et PET. Les additifs ont été dosés dans l'ensemble des microplastiques du mélange. Ce mélange de MPs utilisé lors de notre étude a révélé un très fort taux de zinc, qui participe grandement à la fraction en additifs relative aux ETMs (qui est de 74%). Le mélange intègre également de nombreux esters d'acide phthalique (PAE) qui sont une classe de produits chimiques lipophiles largement utilisés comme plastifiants pour améliorer l'extensibilité mécanique et la flexibilité de divers produits [36]. Parmi ces PAEs (3% du mélange), le DBP (dibutyl phthalate) présentait une concentration très largement supérieure aux autres additifs (126.µg/g) (Tableau. 2).

Table 2: Tableau recueillant la composition massique du mélange de microplastiques de l'étude et la teneur des 5 éléments traces métalliques, des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques, des 8 alkylphénols et des 11 phthalates exprimés en µg.g-1 microplastiques.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (µg.g ⁻¹)	Naphthalene	<LOQ	-	-	6.924
	Acenaphthylene	0.178	-	-	-
	Acenaphthene	0.066	-	-	-
	Fluorene	0.255	-	-	-
	Phenanthrene	0.059	-	-	-
	Anthracene	0.537	-	-	-
	Fluoranthene	0.471	-	-	-
	Pyrene	0.835	-	-	-
	Benzo[a]anthracene	0.041	-	-	-
	Chrysene	0.053	-	-	-
	Benzo[b]fluoranthene	0.358	-	-	-
	Benzo[k]fluoranthene	0.090	-	-	-
	Benzo[a]pyrene	0.356	-	-	-
	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.695	-	-	-
	Dibenzo[a,h]anthracene	0.233	-	-	-
	Benzo[g,h,i]perylene	2.097	-	-	-
Alkylphenols (µg.g ⁻¹)	Bisphenol A	0.013	-	-	2.988
	4-Nonylphenol	2.349	-	-	-
	Nonylphenol monoethoxylate	0.451	-	-	-
	Nonylphenol diethoxylate	0.093	-	-	-
	Nonylphenol carboxylic acid	<LOD	-	-	-
	Octylphenol	0.012	-	-	-
	Octylphenol monoethoxylate	0.062	-	-	-
Phthalic Acid Esters (µg.g ⁻¹)	Dimethyl phthalate	2.508	-	-	211.362
	Diethyl phthalate	7.527	-	-	-
	Dibutyl phthalate	13.657	-	-	-
	Dibutyl phthalate	126.612	-	-	-
	Bis(2-methoxyethyl) phthalate	5.706	-	-	-
	Bis(4-methyl-2-pentyl) phthalate	0.633	-	-	-
	Bis(2-ethoxyethyl) phthalate	2.080	-	-	-
	Di-n-pentyl phthalate	0.060	-	-	-
	Butylbenzyl phthalate	6.905	-	-	-
	Di-n-hexyl phthalate	5.698	-	-	-
	Bis(2-butoxyethyl) phthalate	2.365	-	-	-
	Dicyclohexyl phthalate	0.900	-	-	-
	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	34.766	-	-	-
	di-n-octyl-phthalate	0.694	-	-	-
	Diisononyl phthalate	1.251	-	-	-

Table 3: Composition and concentration of various components in the MP mixture.

MP Mixture	PE	PP	PVC	PET	Total (µg.g ⁻¹)
Mass Composition	40	40	10	10	-
Metallic Trace Elements (µg.g ⁻¹)	Cu	2.0	3.5	4.7	13.8
	Pb	4.9	9.0	786.0	19.5
	Zn	9.0	4169.8	432.3	52.6
	Cd	6.0	123.2	<LOQ	<LOQ
	Cr	<LOQ	77.9	23.1	359.5

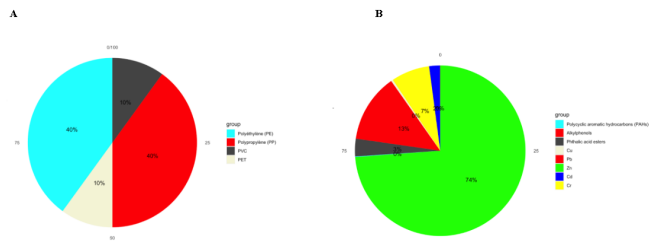


Figure 12: (A) Fractions de différents types de microplastiques appartenants au mélange utilisé dans l'étude (B) Fraction en additifs dans l'ensemble du mélange de microplastiques

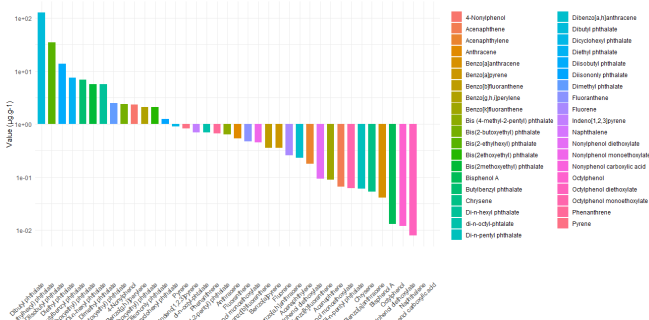


Figure 13: Composition en additifs retrouvés dans le mélange de microplastiques de l'étude. Le graphique est réalisé avec une transformation en échelle logarithmique pour une visualisation plus claire.

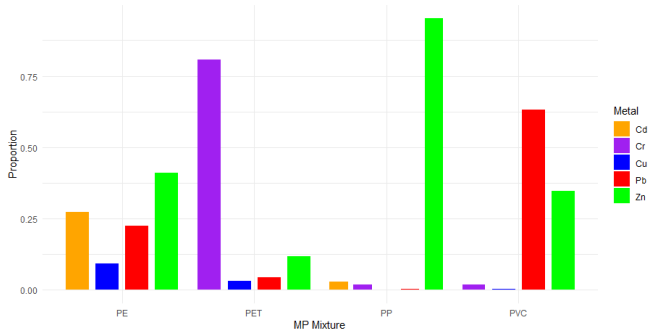


Figure 14: Proportion de métaux dosés dans chaque type de microplastique de notre mélange.

4. Discussion

4.1 La modulation des réponses antioxydantes

L'estimation des niveaux d'activité enzymatique antioxydante a révélé une activation significative de la catalase et la GPx, à J5 à 10µg/L puis une diminution à J10. Les taux d'enzymes antioxydantes ne sont pas significativement différents aux contrôles à 100 µg/L MPs. Ces résultats pourraient s'expliquer par un effondrement du système antioxydant lié aux pol-

luants (Trestrail et al., 2020). Cet aspect en « cloche » (U inversé) rappelle un mode de réponse induit par un perturbateur endocrinien [37]. Ce stress aux MPs (10µg/L, 100 µg/L MPs, J5 et J10) n'engendre pas de déstabilisation des lipides (MDA) chez Porcellana platycheles. Ceci n'est pas en accord avec les travaux de Yu (2017) indiquant lors de contaminations de polystyrène un effet similaire entre les enzymes antioxydantes (CAT, GPx, SOD) et la peroxydation lipidique (MDA) chez le crabe Eriocheir chinensis[26] . Sun et al. (2021) qui ont analysé les effets sur les MPs chez diverses espèces suggèrent cet « effondrement » se réaliserait à partir de 400 µg/L MPs. Toutefois la dose engendrant cet effet pourrait varier selon les modèles animal utilisés. Ceci indique donc que notre modèle de crustacé suspensivore est très sensible aux MPs puisque nous observons cette inhibition dès 100 µg/L [38]. Un fort effet dose-temps dépendant est significativement noté avec une diminution des réponses antioxydantes (CAT, GPx, SOD) selon les 2 concentrations (10 µg/L et 100 µg/L) et les 2 temps (J5, J10). Ceci vient renforcer notre sensation d'un effet inhibiteur lié aux MPs et/ou additifs.

4.2 Analyse du taux de glycogène

La comparaison des niveaux de glycogène entre les deux lots contrôle (J5, J10) selon les 2 concentrations, montre que les individus s'épuisent un peu mais cela ne peut expliquer les niveaux importants de perte drastique de glycogène lors des contaminations aux MPs (10 µg/L, 100 µg/L). Chez *Daphnia magna* et *D. pulex* (deux crustacés branchiopodes d'eau douce), l'épuisement des réserves de glycogène pourrait résulter de l'ingestion de microplastiques qui rempliraient l'intestin pouvant ainsi interférer avec la digestion et le maintien de l'intégrité du tissu digestif [39]. Il a été prouvé que cette situation peut conduire à la privation de ressources pour le métabolisme énergétique. Il a été effectivement montré que les plastiques peuvent affecter les réserves énergétiques chez le crustacé décapode *Macrobrachium nipponense*[39] où les teneurs en glycogène ont diminué de manière significative ($P < 0,05$). Selon cette même publication, l'expression des gènes liés au métabolisme 6-phosphate glucokinase (G-6-Pase), HK, PK, ACC, Acetyl-CoA-binding protein (ACBP), CPT-1, et fatty-acid-binding protein 10 (FABP 10) a augmenté puis diminué, tandis que l'expression du gène LDH a montré une tendance à la hausse. Les résultats de Li et al (2020) indiquent que les plastiques affectent la croissance, l'activité en-

zymatique et l'expression génétique du métabolisme énergétique chez *M. nipponense*[39].

4.3 Estimation d'un effet neurotoxique des MPs

Nous notons un très fort effet significatif de neurotoxicité, lors de la mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase aux deux concentrations (10 µg/L, 100 g/L) et deux temps (J5, J10). Une autre étude a montré une inhibition de l'AchE à 1 g/L et 10g/L de plastiques chez le crustacé branchiopode *Artemia franciscana* [40]. De plus, un travail portant sur le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (décapode) a confirmée cette inhibition de l'AchE sur un panel très large de concentrations (0 g/L, 40 g/L, 400 g/L, 4000 g/L and 4000 µg/L) sur 21 jours [26].

4.4 Dosage des composants du mélange de microplastiques (composition massique)

Les propriétés physiques des MPs telles que la taille des pores et la surface contribuent à leur capacité d'adsorption [41]. De plus, le type de polymère peut influencer les processus d'adsorption-désorption. Les polymères de type PE (haute et basse densité) et PP adsorbent mieux les PCB et les HAP que les polymères de type PET et PVC [15]. Les travaux de [42] montrent que l'équilibre d'adsorption du phénanthrène, de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), du DDT et des phtalates sur le PP, PE et le PVC est atteint au bout de 24 h sauf pour le couple PE – DDT où au moins 48h sont nécessaires. Le plus abondant des microplastiques dans la Manche (Atlantique Nord-Est - Bretagne) était le Polyéthylène (PE), avec $0,16 \pm 0,22$ MP m³ (67,4%) ; suivi du Polypropylène (PP), avec $0,04 \pm 0,05$ MP m³ (16,5%) ; et du Polystyrène (PS), avec $0,04 \pm 0,08$ MP m³ (16,1%) [13].

Il se pourrait donc que les effets observés de courbe en cloche des réponses antioxydantes (CAT, GPx) liée à une augmentation de MPs soit en fait à relier avec les effets de PE du DBP. Ceci serait également en accord avec l'inhibition de l'acétylcholinestérase [37]. Toutefois Metais et al. (2023) [27] montre un effet inhibiteur également en appliquant des microplastiques commerciaux sur le bivalve *Scrobicularia plana*. Il se pourrait donc que l'on soit face à un effet additif ou synergique des MPs et du DBP.

4.5 Evaluation de l'espèce *Porcellana platycheles* comme sentinelle en écotoxicologie

L'espèce *Porcellana platycheles* s'est avérée sensible aux contaminations de MPs+additifs montrant une modulation de ces réponses antioxydantes, de l'acétylcholinestérase et du taux de glycogène. De même, nous avons observé une très faible mortalité pendant les 10 jours d'expérience ; pourtant les animaux n'étaient pas nourris afin de minimiser les risques de contaminations aux MPs qui auraient pu provenir de la nourriture contaminée. De plus, les crustacés, même de petite taille, fournissent suffisamment de tissus pour pouvoir analyser divers biomarqueurs (6 : AchE, CAT, Gpx, MDA, SOD, glycogène). Comme indiqué précédemment cette espèce a une large répartition (Atlantique et Méditerranée) et pourrait donc représenter un modèle intéressant pour refléter les pollutions dans ces zones géographiques. Des travaux antérieurs menés au laboratoire BIOSSE avait utilisé *P. platycheles* pour étudier les effets de composés pharmaceutiques (aspirine, paracétamol) montrant une sensibilité à ces produits (Leignel, com. Personnelle). Nous recommandons donc à l'avenir de développer des approches d'écotoxicologie utilisant cette sentinelle pour évaluer son potentiel à indiquer la qualité de son environnement, par exemple lors de contaminations métalliques ou aux HAPs.

5. Remerciements

J'aimerais vivement remercier mon maître de stage, le Dr Vincent Leignel pour sa disponibilité, sa gentillesse et pour les opportunités qu'il me confie.

Merci à Mathilde Madre et à Lucie Messenger pour leur participation à certaines manipulations. Notre entraide aussi a participé à enrichir nos résultats.

Merci à Marwa Hrizi pour son sourire, sa bonne humeur et son aide. J'espère que l'occasion de travailler ensemble se présentera.

Merci à mon ami Philippe Stocker pour ses précieux enseignements sur l'optimisation du temps, la manipulation efficace des données et la présentation de résultats. Bien que ton profil soit atypique, je suis convaincu que tu réussiras.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur disponibilité, leur expertise et leur professionnalisme.

References

1. Thompson, R. C., Moore, C. J., Vom Saal, F. S. & Swan, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 2153–2166. ISSN: 0962-8436, 1471-2970. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2009.0053> (2023) (July 27, 2009).
2. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. & Ahmed, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **26**, 246–265. ISSN: 0734-9750. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008000141> (2008).
3. Andrady, A. L. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* **62**, 1596–1605. ISSN: 0025326X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X11003055> (2023) (Aug. 2011).
4. Rhodes, C. J. Plastic Pollution and Potential Solutions. *Science Progress* **101**, 207–260. ISSN: 0036-8504, 2047-7163. <http://journals.sagepub.com/doi/10.3184/003685018X15294876706211> (2023) (Sept. 2018).
5. Jambeck, J. R. *et al.* Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* **347**, 768–771. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1260352> (2023) (Feb. 13, 2015).
6. Eriksen, M. *et al.* A growing plastic smog, now estimated to be over 170 trillion plastic particles afloat in the world's oceans—Urgent solutions required. *PLOS ONE* **18** (ed Hewitt, J.) e0281596. ISSN: 1932-6203. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0281596> (2023) (Mar. 8, 2023).
7. Tanhua, T., Gutekunst, S. B. & Biastoch, A. A near-synoptic survey of ocean microplastic concentration along an around-the-world sailing race. *PLOS ONE* **15** (ed Thuesen, E. V.) e0243203. ISSN: 1932-6203. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0243203> (2023) (Dec. 8, 2020).
8. Corcoran, P. L., Biesinger, M. C. & Grifi, M. Plastics and beaches: A degrading relationship. *Marine Pollution Bulletin* **58**, 80–84. ISSN: 0025326X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X0800430X> (2023) (Jan. 2009).
9. Gewert, B., Plassmann, M. M. & MacLeod, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* **17**, 1513–1521. ISSN: 2050-7887, 2050-7895. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5EM00207A> (2023) (2015).
10. Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. & Galloway, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* **62**, 2588–2597. ISSN: 0025-326X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X11005133> (2011).
11. Wright, S. L., Thompson, R. C. & Galloway, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution* **178**, 483–492. ISSN: 0269-7491. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113001140> (2013).
12. Yin, J., Li, J.-Y., Craig, N. J. & Su, L. Microplastic pollution in wild populations of decapod crustaceans: A review. *Chemosphere* **291**, 132985. ISSN: 00456535. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653521034573> (2023) (Mar. 2022).
13. Frère, L. *et al.* Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: A case study of the Bay of Brest (Brittany, France). *Environmental Pollution* **225**, 211–222. ISSN: 02697491. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749117309831> (2023) (June 2017).
14. Mato, Y. *et al.* Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environmental Science & Technology* **35**, 318–324. ISSN: 0013-936X, 1520-5851. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es0010498> (2023) (Jan. 1, 2001).
15. Teuten, E. L. *et al.* Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 2027–2045. ISSN: 0962-8436, 1471-2970. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0284> (2023) (July 27, 2009).
16. Andrady, A. L. & Neal, M. A. Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**, 1977–1984. ISSN: 0962-8436, 1471-2970. <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0284> (2023) (July 27, 2009).

- org/doi/10.1098/rstb.2008.0304 (2023) (July 27, 2009).
17. Ivar do Sul, J. A. & Costa, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental Pollution* **185**, 352–364. ISSN: 02697491. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749113005642> (2023) (Feb. 2014).
 18. Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E. M., Van Den Heuvel-Greve, M. J. & Koelmans, A. A. Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.) *Environmental Science & Technology* **47**, 593–600. ISSN: 0013-936X, 1520-5851. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es302763x> (2023) (Jan. 2, 2013).
 19. Eriksen, M. *et al.* Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE* **9** (ed Dam, H. G.) e111913. ISSN: 1932-6203. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111913> (2023) (Dec. 10, 2014).
 20. Pinya, S. *et al.* Physiological biomarkers in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) as a tool for monitoring sanitary evolution in marine recovery centres. *Science of The Total Environment* **757**, 143930. ISSN: 0048-9697. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720374611> (2021).
 21. Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P. & Köhler, A. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology* **46**, 11327–11335. ISSN: 0013-936X, 1520-5851. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es302332w> (2023) (Oct. 16, 2012).
 22. Graham, E. R. & Thompson, J. T. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **368**, 22–29. ISSN: 0022-0981. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098108004437> (2009).
 23. Waite, H. R., Donnelly, M. J. & Walters, L. J. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Marine Pollution Bulletin* **129**, 179–185. ISSN: 0025326X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X18301139> (2023) (Apr. 2018).
 24. Renzi, M. *et al.* Chemical composition of microplastic in sediments and protected detritivores from different marine habitats (Salina Island). *Marine Pollution Bulletin* **152**, 110918. ISSN: 0025326X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X20300369> (2023) (Mar. 2020).
 25. Li, Y. *et al.* Effects of nanoplastics on energy metabolism in the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *Environmental Pollution* **268**, 115890. ISSN: 02697491. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749120365799> (2023) (Jan. 2021).
 26. Yu, P. *et al.* Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquatic Toxicology* **200**, 28–36. ISSN: 0166445X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X18300420> (2023) (July 2018).
 27. Métails, I. *et al.* Continuum from microplastics to nanoplastics: effects of size and source on the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. *Environmental Science and Pollution Research* **30**, 45725–45739. ISSN: 1614-7499. <https://link.springer.com/10.1007/s11356-023-25588-3> (2023) (Jan. 28, 2023).
 28. Takada, H. & Karapanagioti, H. K. Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment. *Science of The Total Environment* **78**, 143930 (2018).
 29. González-Gordillo, J. I., Cuesta, J. A. & Rodríguez, A. Studies on the larval development of northeastern Atlantic and Mediterranean Procellanidae (Decapoda, Anomura). I — Redescription of the larval stages of *Porcellana platycheles* (Pennant, 1777) reared under laboratory conditions. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **50**, 517–531. ISSN: 0174-3597, 1438-3888. <https://link.springer.com/10.1007/BF02367164> (2023) (Dec. 1996).
 30. Crustáceos Decápodos, Ibéricos Investigación Pesquera. *Environmental Pollution* **32**. <https://decapoda.nhm.org/pdfs/10992/10992.pdf0> (1968).
 31. Stevcic, Z. OF THE PORCELAIN CRAB PORCELLANA PLATYCHELES (PENNANT) (DECAPODA, ANOMURA) IN THE ROVINJ AREA (NORTHERN ADRIATIC).

32. Ika, P. P. Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. **178**, 1–37 (2016).
33. Collignon, A. *et al.* Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 861–864. ISSN: 0025326X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X12000343> (2023) (Apr. 2012).
34. Deidda, I. *et al.* Neurotoxicity in Marine Invertebrates: An Update. *Biology* **10**, 161. ISSN: 2079-7737. <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/2/161> (2023) (Feb. 18, 2021).
35. Fieber, L. A. in. *The Oxford Handbook of Invertebrate Neurobiology* (ed Byrne, J. H.) 284–300 (Oxford University Press, Apr. 10, 2019). ISBN: 978-0-19-045675-7. <https://academic.oup.com/edited-volume/34665/chapter/295366663> (2023).
36. Huang, L. *et al.* Phthalic Acid Esters: Natural Sources and Biological Activities. *Toxins* **13**, 495. ISSN: 2072-6651. <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/7/495> (2023) (July 16, 2021).
37. Shen, A. *et al.* *Shen et al., 2019 preprint version* Oct. 2019.
38. Sun, T., Zhan, J., Li, F., Ji, C. & Wu, H. Effect of microplastics on aquatic biota: A hormetic perspective. *Environmental Pollution* **285**, 117206. ISSN: 02697491. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749121007880> (2023) (Sept. 2021).
39. Li, P. *et al.* Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **107**, 577–584. ISSN: 0007-4861, 1432-0800. <https://link.springer.com/10.1007/s00128-020-02820-1> (2023) (Oct. 2021).
40. Varó, I. *et al.* Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. *Aquatic Toxicology* **161**, 208–220. ISSN: 0166445X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X15000594> (2023) (Apr. 2015).
41. OZ, N. Investigation of heavy metal adsorption on microplastics. *Environmental Pollution* (2019).
42. Bakir, A., Rowland, S. J. & Thompson, R. C. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution* **185**, 16–23. ISSN: 0269-7491. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S02697491130005277> (2014).

Figure 1 displays 12 micrographs arranged in a 3x4 grid, showing various stages of the life cycle of the parasite. The images illustrate asexual and sexual stages, including trophozoites and gametocytes, in different developmental stages. A scale bar in the top right corner indicates 10 μ m.

BIOSES
Bioscience des Organismes,
Stratégies, Santé, Environnement
Le Mans Université 72075-9005

UCL **PARADIGME**
des sciences
du vivant

Porcellana Platycheles (Porcellanidae, Decapoda) : sensibilité aux microplastiques et intérêt écotoxicologique

Clément Baruchini, Dr Vincent Legrand

BIOSES – Le Mans Université, avr Victor Meunier, 72000 Le Mans

Introduction / Design expérimental

L'évaluation de la pollution en microplastiques (MPs) est une préoccupation accrue, car elle représente des menaces écologiques et pour la santé humaine. Les microplastiques sont des résidus de plastique de moins de 5 mm de diamètre. Ils sont omniprésents dans l'environnement marin, y compris dans les organismes marins. Cependant, l'étude de leur toxicité sur l'écotoxicologie est encore limitée. Cette thèse vise à évaluer l'impact des MPs sur la santé et le comportement de la porcellane platychele (*Platycheles platycheloides*) (P. platycheloides), un crustacé décapode commun en France. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution* (2023) et la revue *Marine Pollution Bulletin* (2024).

Une étude a été menée pour évaluer l'impact des MPs sur la santé et le comportement de la porcellane platychele (*Platycheles platycheloides*) (P. platycheloides), un crustacé décapode commun en France. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution* (2023) et la revue *Marine Pollution Bulletin* (2024).

Une étude a été menée pour évaluer l'impact des MPs sur la santé et le comportement de la porcellane platychele (*Platycheles platycheloides*) (P. platycheloides), un crustacé décapode commun en France. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution* (2023) et la revue *Marine Pollution Bulletin* (2024).

Chute des réserves énergétiques

Les crustacés sont des organismes très sensibles à la pollution. Les microplastiques (MPs) sont des résidus de plastique de moins de 5 mm de diamètre. Ils sont omniprésents dans l'environnement marin, y compris dans les organismes marins. Cependant, l'étude de leur toxicité sur l'écotoxicologie est encore limitée. Cette thèse vise à évaluer l'impact des MPs sur la santé et le comportement de la porcellane platychele (*Platycheles platycheloides*) (P. platycheloides), un crustacé décapode commun en France. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution* (2023) et la revue *Marine Pollution Bulletin* (2024).

À la fin de la thèse, les résultats ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution* (2023) et la revue *Marine Pollution Bulletin* (2024).

Fig. 1. Porcellana platycheloides (P. platycheloides) under different conditions. The figure shows the energy reserves of the porcelain platychele (P. platycheloides) under different conditions. The figure shows the energy reserves of the porcelain platychele (P. platycheloides) under different conditions. The figure shows the energy reserves of the porcelain platychele (P. platycheloides) under different conditions.

Composition massique de nos MPs

The figure shows the mass composition of the microplastics (MPs) used in the study. It includes a pie chart and a bar chart. The pie chart shows the distribution of the different types of MPs used, and the bar chart shows the mass composition of the MPs used.

Neurotoxicité

The figure shows the neurotoxicity of the microplastics (MPs) used in the study. It includes a line graph and a bar chart. The line graph shows the neurotoxicity of the MPs used, and the bar chart shows the neurotoxicity of the MPs used.

Inhibition des réponses antioxydantes SOD, CAT, GPX

The figure shows the inhibition of antioxidant responses (SOD, CAT, GPX) by the microplastics (MPs) used in the study. It includes a bar chart and a line graph. The bar chart shows the inhibition of antioxidant responses (SOD, CAT, GPX) by the MPs used, and the line graph shows the inhibition of antioxidant responses (SOD, CAT, GPX) by the MPs used.

Conclusion et perspectives : une espèce biosentinel ?

The figure shows the conclusion and perspectives of the study, including a bar chart and a line graph. The bar chart shows the conclusion and perspectives of the study, and the line graph shows the conclusion and perspectives of the study.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution* (2023) et la revue *Marine Pollution Bulletin* (2024).

The figure shows the conclusion and perspectives of the study, including a bar chart and a line graph. The bar chart shows the conclusion and perspectives of the study, and the line graph shows the conclusion and perspectives of the study.

Fig. 2. Porcellana platycheloides (P. platycheloides) under different conditions. The figure shows the conclusion and perspectives of the study, including a bar chart and a line graph. The figure shows the conclusion and perspectives of the study, including a bar chart and a line graph.

Page 18 of 18