



HAL
open science

Effets des microplastiques biodégradables et non biodégradables sur le microbiote d'*Eurytemora affinis*

Jeremy Theyry

► **To cite this version:**

Jeremy Theyry. Effets des microplastiques biodégradables et non biodégradables sur le microbiote d'*Eurytemora affinis*. Biologie animale. Université du Littoral Côte d'Opale; Université de Mons, 2023. Français. NNT : 2023DUNK0688 . tel-04573614

HAL Id: tel-04573614

<https://theses.hal.science/tel-04573614>

Submitted on 13 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat

*Mention Sciences de la mer
Spécialité Biologie et écologie*

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)* de
l'Université du Littoral Côte d'Opale

et

à *l'Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Matériaux, Interfaces et
Nanostructures (EDT MAIN)*
de **l'Université de Mons**

par

Jérémy Thery

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université du Littoral Côte d'Opale

***Effets des microplastiques biodégradables et non biodégradables
sur le microbiote d'Eurytemora affinis***

Soutenue le 06/12/2023, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen présidé par le Professeur
Ruddy Wattiez :

M^{me} Buttino, Chargée de recherche HDR, ISPRA

M^{me} Gobert, Professeure, Université de Liège

Mme Benali, Docteure, Université de Mons

M. Zinck, Professeur, Université de Lille

M. Wattiez, Professeur, Université de Mons

M. Raquez, Professeur, Université de Mons

M. Monchy, Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale

M. Souissi, Professeur, Université de Lille

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur

Invité



Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Sami Souissi qui m'a offert l'opportunité, il y a maintenant plus de 5 ans, d'intégrer son équipe lors de mon stage de M1 et d'ainsi me spécialiser sur le modèle copépode et sur la thématique des microplastiques jusqu'aujourd'hui.

Je remercie également le Pr. Sébastien Monchy, co directeur de cette thèse à l'ULCO pour son aide, ses conseils ainsi que les moyens techniques mis à disposition qui m'ont permis de réussir au mieux mes travaux. Il en est de même pour la Dr. Luen Luen Li, pour son aide lors des expérimentations et des analyses concernant l'important volet biologie moléculaire de mes travaux.

Je suis reconnaissant envers le Pr Jean-Marie Raquez, mon co-directeur à l'UMons qui m'a donné l'opportunité de faire cette thèse et de réaliser mes travaux dans les laboratoires de l'UMons dans les meilleures conditions.

Je remercie la Dr. Samira Benali pour son partage de savoir et son aide précieuse lors de expérimentations à l'UMons.

Je souhaite remercier mes collègues François Gael, Shagnika, Capucine, Wajid aussi bien pour avoir égayé mes journées que pour leur aide professionnelle.

Enfin, je souhaite remercier ma maman ainsi que Julie pour leur soutien sans faille depuis le commencement de ce beau projet.

Résumé

La production, l'utilisation et surtout le relargage sauvage des plastiques dans l'environnement sont devenus ces dernières années une préoccupation majeure au niveau mondial. Les estuaires et l'écosystème marin sont particulièrement impactés puisque qu'ils sont fréquemment à la fois les milieux naturels de transit et terminaux de cette pollution. Ces déchets plastiques, souvent de grandes tailles, peuvent se fragmenter en microplastiques (<5mm) sous l'action combinée de la lumière, de l'oxydation, de l'abrasion mécanique et de la biodégradation par des microorganismes. Une fois en suspension dans la colonne d'eau, ces microplastiques (MPs) peuvent entrer dans la chaîne trophique soit en étant directement ingérés par les organismes aquatiques, soit via la consommation de proies et/ou d'aliments déjà contaminés par des MPs. Durant cette thèse, l'ingestion et l'impact des différents types de MPs ont été étudiés sur le copépode *Eurytemora affinis*, espèce clé de voûte de l'estuaire de la Seine et de plusieurs estuaires de l'hémisphère Nord.

Généralement, les effets des MPs sur le modèle copépode, sont étudiés via l'utilisation de MPs fluorescents. Cependant, cette méthode présente des limitations lorsqu'il s'agit d'étudier des MPs échantillonnés en milieu naturel, qui ne sont pas fluorescents et qui présentent une large diversité de forme, de taille, de nature et de couleur. De plus, les méthodes classiques d'analyse présentent une limite de détection à quelques micromètres, inapplicable aux MPs de petites tailles échantillonnés en milieu naturel. À l'aide de cultures de masse du copépode *Eurytemora affinis*, nous avons développé une méthodologie de caractérisation des MPs ingérés par cette espèce, à la fois plus sensible (en limitant l'altération des MPs) et davantage indépendante de la nature des MPs. Pour cela, les copépodes subissent dans un premier temps une digestion enzymatique à la protéinase K puis sont filtrés sur filtre en polycarbonate, avant caractérisation des MPs par spectroscopie Raman. Le couplage de ces méthodes nous a permis de diminuer de 7µm (relevé dans la littérature) à 1µm la limite de détection des MPs. Cette méthodologie, appliquée à des copépodes prélevés dans l'estuaire de la Seine, a montré chez ces individus sauvages des concentrations en MPs supérieures à ceux relevés chez d'autres espèces sans que cela ne soit lié à une concentration plus importante en MPs dans le biotope. Ce résultat suggère donc une sous-estimation, dans les précédentes études, de la contamination en MPs ingérés par les copépodes à cause des limites de détection des méthodes utilisées.

Plusieurs études ont montré la toxicité et/ou l'impact négatif des MPs sur les espèces aquatiques. Afin de lutter contre cette pollution et de diminuer la contamination en déchets plastique dans les milieux, les industriels tendent à proposer sur le marché de nouveaux plastiques dégradables en compost industriel. L'étude de leur degré de biodégradabilité en milieu naturel, et notamment marin demeure cependant limitée. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que les plastiques représentaient un support pour de nombreux microorganismes, parfois pathogènes ou, au contraire, possédant des

enzymes capables de dégrader ces plastiques. Afin de clarifier l'impact des plastiques considérés comme biodégradables par rapport aux plastiques persistants, nous avons réalisé une double expérimentation en laboratoire de simulation de vieillissement de MPs biodégradables (polybutylène adipate téréphtalate – PBAT) et non biodégradables (polyéthylène basse densité – LDPE) durant 120 jours. Les modifications chimiques des deux types de plastiques au cours du temps ont été analysés par analyse thermogravimétrique (TGA), calorimétrique différentielle à balayage (DSC) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), tandis que les successions des communautés bactériennes à leurs surfaces ont été analysées par séquençage haut débit de l'ARNr 16S. Nos résultats montrent que le vieillissement n'affecte que légèrement la cristallinité du LDPE lors du vieillissement en présence de colonies bactériennes, suggérant une dégradation quasi nulle des deux types de plastique dans nos conditions. Concernant les successions microbiennes, une dynamique a pu être identifiée tout au long de nos différentes dates de prélèvements. Cette dynamique était statistiquement liée à la durée du vieillissement mais n'était pas liée à la nature du plastique. Des espèces indicatrices de chaque type de MPs, telles que *Sulfitobacter pseudonitzschiae* et *Marinobacter sp. Arc7-DN-1* sur le PBAT ou *Thioclava dalianensis* et *Flexibacteraceae DG1392* sur le LDPE ont cependant pu être mises en évidence. Une seconde expérimentation visait à exposer à des concentrations similaires à celles trouvées dans l'environnement, en continu, et sur plusieurs générations, le copépode *E. affinis* avec les mêmes MPs vieillis. L'impact de cette exposition sur le microbiote du copépode a été analysé par séquençage à haut débit de l'ARNr 16S. Nos résultats montrent que les deux types de MPs (PBAT et LDPE) affectent significativement la composition du microbiote d'*E. affinis*, et ce, sous leur forme vierge ou vieillie. Nos résultats ont également montré que le type de MPs (biodégradable ou non) n'avait pas d'impact significatif sur le microbiote d'*E. affinis*.

En conclusion, nos recherches indiquent une biodégradabilité très faible du PBAT lorsqu'il séjourne dans des conditions non optimales pour sa dégradation, et ce même lorsqu'il se trouve sous forme de MPs de quelques micromètres. De plus, les communautés bactériennes attachées à sa surface des MPs ne semblent pas liées à la nature du plastique. Enfin, l'exposition multigénérationnelle d'*E. affinis* aux MPs a montré un impact significatif sur le microbiote du copépode, mais indépendant du type de plastique. Ces conclusions semblent indiquer que le PBAT n'est potentiellement pas le meilleur plastique biodégradable à considérer afin de diminuer l'impact de la pollution plastique sur le biotope et les biocénoses.

Abstract

In recent years, the production, use, and particularly the reckless release of plastics into the environment have become a major global concern. Estuaries and marine ecosystems are particularly affected since they are often both the natural transit and final environments for this pollution. These plastic wastes, often of large sizes, can fragment into microplastics (<5mm) under the combined action of light, oxidation, mechanical abrasion, and biodeterioration by microorganisms. Once suspended in the water column, these microplastics (MPs) can enter the food chain either by direct ingestion by aquatic organisms or through the consumption of prey and/or food already contaminated by microplastics. During this thesis, the ingestion and impact of different types of MPs were studied on the copepod *Eurytemora affinis*, a keystone species in the Seine estuary. Generally, the effects of MPs on the copepod model are studied using fluorescent MPs. However, this method has limitations when it comes to studying MPs sampled in the natural environment, which are not fluorescent and present a wide diversity of shape, size, type, and color. Moreover, classic analysis methods have a detection limit of a few micrometers, which is inapplicable to study smaller-sized MPs sampled in the natural environment. Using mass cultures of the copepod *Eurytemora affinis*, we have developed a methodology for characterizing the MPs ingested by this species, which was both more sensitive (limiting the alteration of MPs) and more independent of the nature of the MPs. For this, the copepods first undergo enzymatic digestion with proteinase K and are then filtered on a polycarbonate filter, before characterization of the MPs by Raman spectroscopy. Coupling these methods let us to reduce the MP detection limit from 7µm (reported in the literature) to 1µm. This methodology, applied to copepods collected in the Seine estuary, showed higher MP concentrations in these wild individuals than those found in other species, without an apparent relation with a higher MP concentration in the biotope. This result, therefore, suggests an underestimation, in previous studies, of the contamination of ingested MPs by copepods due to the detection limits of the methods used.

Numerous studies have demonstrated the toxicity and/or negative impact of MPs on aquatic species. In order to mitigate this pollution and reduce contamination from plastic waste in environments, industries tend to develop and use new plastics that are degradable in industrial compost. However, the study of their degree of biodegradability in a natural environment, and particularly in marine conditions, remains limited. Moreover, many studies have demonstrated that plastics provide a substrate for numerous microorganisms, sometimes pathogenic or, conversely, possessing enzymes capable of degrading these plastics. To clarify the impact of plastics considered biodegradable compared to persistent plastics, we conducted a dual laboratory simulation experiment by aging biodegradable MPs (polybutylene adipate terephthalate – PBAT) and non-biodegradable MPs (low-density polyethylene – LDPE) over 120 days. Chemical modifications of the two types of plastics

over time were analyzed by TGA, DSC, and FTIR, while successions of bacterial communities on their surfaces were analyzed by high-throughput 16S rRNA sequencing. Our results show that aging only slightly affects the crystallinity of LDPE in the presence of bacterial, suggesting almost no degradation of both types of plastic under our conditions. Regarding microbial successions, a dynamic could be identified throughout our various sampling dates. This dynamic was statistically related to the aging duration but was not related to the nature of the plastic. However, indicator species for each type of MPs were highlighted. A second experiment aimed to expose the copepod *E. affinis* to the same aged MPs at concentrations similar to those found in the environment, continuously, and during several generations. The impact of this exposure on the copepod's microbiota was analyzed by high-throughput 16S rRNA sequencing. Our results show that both types of MPs (PBAT and LDPE) significantly affect the composition of *E. affinis*'s microbiota, in both their virgin or aged forms. Our results also showed that the type of MPs (biodegradable or not) had no significant impact on the microbiota of *E. affinis*.

In conclusion, our research highlights a very low biodegradability to PBAT when it resides under non-optimal conditions for its degradation, even when it is in the form of MPs of a few micrometers. Furthermore, the bacterial communities attached to the surface of the MPs do not seem to be related to the nature of the plastic. Finally, the multigenerational exposure of *E. affinis* to MPs showed a significant impact on the copepod's microbiota, but this was independent of the type of plastic. These conclusions seem to suggest that PBAT is potentially not the best biodegradable plastic to consider in order to reduce the impact of plastic pollution on the biotope and biocenoses.

Table des matières

Remerciements.....	3
Résumé.....	4
Abstract	6
Table des matières	8
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	15
Liste des Annexes.....	17
Liste des acronymes.....	18
Introduction générale.....	19
Chapitre I. Méthodes d'identification et de caractérisation des microplastiques chez le modèle copépode <i>E. affinis</i>	28
Résumé.....	29
1. Introduction.....	30
2. Matériels et méthodes	32
2.1. Types de MPs utilisés sur les cultures de masse de copépodes.....	32
2.2. Modèle copépode.....	32
2.3. Protocole de digestion employé sur les copépodes provenant des cultures de masse....	34
2.4. Méthodes d'identification des MPs sur les copépodes provenant de cultures de masse	34
2.5. Application des méthodes validées sur les copépodes provenant du milieu naturel.....	37
3. Résultats	37
3.1. Méthodes de coloration des MPs sur les copépodes entiers.....	37
3.2. Digestion des copépodes et observation par épifluorescence des MPs colorés sur filtre résultant de la filtration du lysate.....	39
3.3. Application de la microspectroscopie Raman sur les copépodes issus de cultures de masse	41
3.4. Premières estimations de la contamination en MPs d' <i>Eurytemora affinis</i> en Estuaire de Seine	41
4. Discussion	42
4.1. Détection des MPs avec coloration au Nile Red chez les copépodes de cultures de masse .	42
4.2. Efficacité du protocole de digestion et cas spécifique du polylactide	43
4.3. Possibilités d'identification des MPs via l'utilisation de filtres membrane noirs en polycarbonate	44
4.4. Cas du filtre en oxyde d'aluminium : diminution de la limite d'identification des MPs par microspectroscopie Raman	44
4.5. Validation d'une méthode complète sur les échantillons environnementaux de copépodes	45

Chapitre II. Exposition multigénérationnelle du microbiote d'*E. affinis* (copépode) aux microplastiques : étude comparative entre microplastiques biodégradables (PBAT) et non biodégradables (LDPE) 47

Résumé.....	48
1. Introduction.....	49
2. Matériels et Méthodes.....	51
2.1. Matériel biologique.....	51
2.2. Microplastiques.....	52
2.3. Approche expérimentale.....	52
2.4. Extraction des ADN, préparation des bibliothèques des ADNr 16S, séquençage et préparation des séquences.....	53
2.5. Analyses statistiques et représentations graphiques.....	54
3. Résultats.....	55
3.1. Analyse des séquences des ARNr 16S.....	55
3.2. Effets des MPs sur les indices de diversité alpha du microbiote des copépodes.....	56
3.3. Dynamique des assemblages bactériens au cours des différentes générations.....	56
3.4. Effets des MPs sur la diversité beta du microbiote des copépodes.....	62
4. Discussions.....	64

Chapitre III. Expérimentation de vieillissement de plastique biodégradable (polybutylène adipate téréphtalate – PBAT) et non biodégradable (polyéthylène basse densité – LDPE) sous forme de Microplastiques : étude de la dégradation chimique et de la plastisphère durant 120 jours en conditions contrôlées .. 69

Résumé.....	70
1. Introduction.....	70
2. Matériels et méthodes.....	72
2.1. Matériels.....	72
2.2. Préparation des échantillons de MPs.....	73
2.3. Design expérimental.....	73
2.4. Isolement des communautés bactériennes à la surface des MPs.....	74
2.5. Isolement des MPs pour la caractérisation chimique.....	74
2.6. Extraction des ADN, préparation des bibliothèques des ADNr 16S, séquençage et analyse des séquences.....	75
2.7. Caractérisation des propriétés chimiques des MPs durant le processus de vieillissement.....	75
2.8. Analyses statistiques et représentations graphiques.....	76
3. Résultats.....	77
3.1. Evolution des propriétés chimiques des MPs durant le vieillissement.....	77
3.2. Analyse des séquences ARNr 16S.....	79
3.3. Variations des indices de diversité alpha durant l'expérimentation.....	80

3.4. Analyse de la structure des communautés microbiennes et effet du type de polymère	81
4. Discussion	89
Chapitre IV. Conclusions et perspectives	95
Résultats principaux et limites des études.....	96
Perspectives.....	98
Bibliographie.....	101
Annexes.....	121
Articles publiés.....	125

Liste des Figures

- Figure introductive 1** : Détails du cycle de vie d'*Eurytemora affinis*. Les stades de développement Nx correspondent aux différents stades Nauplii (larvaires) et Cx aux différents stades Copépodites (juvéniles). Dessins compilés dans le fascicule du GIP Seine-Aval 2011, d'après Katona (1971).....23
- Figure 1.1** : Microplastiques de PS (A), PLA (B), LDPE (C), (D) marqués au Nile Red et détectés (cercles rouges) dans le tractus digestif (A-C) et les fèces (D) d'individus du copépode *E. affinis* après protocole d'ingestion, observés au microscope à épifluorescence (longueur d'onde :455-494 nm). D'après They *et al.* (2022).....38
- Figure 1.2** : Echantillon de MPs *in situ* marqué au Nile Red et observé au microscope à épifluorescence (longueur d'onde : 455-494 nm) (A). (B) : Observation de MPs *in situ* ingérés et visibles (cercle rouge) dans le tractus digestif d'un adulte d'*E. affinis*. D'après They *et al.* (2022).....39
- Figure 1.3** : Observation de copépodes provenant de cultures de masse contaminés par des MPs (cercles rouges) de LDPE (A) et de PS (B) ayant été digérés et filtrés sur filtre membrane en polycarbonate noir. Les filtres étaient ensuite marqués au Nile Red et observés au microscope à épifluorescence (longueur d'ondes : 455-494 nm). Les résidus de cuticules non digérés par l'attaque enzymatique sont visibles sous formes de voiles de couleur verte (flèches blanches). D'après They *et al.* (2022).....40
- Figure 1.4** : Observation de copépodes de cultures de masse contaminés aux MPs de LDPE, digérés et filtrés sur filtre en oxyde d'aluminium. Le filtre était ensuite marqué au Nile Red puis observé au microscope à épifluorescence (longueur d'ondes : 455-494 nm). Sur ce filtre, MPs et fragments de cuticules ne sont pas différenciables (flèches blanches). D'après They *et al.* (2022).....40
- Figure 2.1** : Diagramme de Venn des OTUs partagées entre le microbiote des copépodes en conditions contrôles, l'eau et l'algue utilisée comme nourriture pour les copépodes. L'algue n'a pas été échantillonnée durant la dernière génération. C : microbiote des copépodes en conditions non contaminées en MPs ; C_eau : eau utilisée pour démarrer chaque génération et échantillonnée à la fin ; rhodo : microalgue rouge *Rhodomonas sp.* utilisée pour nourrir les copépodes ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après They *et al.* (2023).....55

Figure 2.2 : Représentation graphique des indices de diversité alpha des taxa. Les boîtes à moustache représentent la distribution des valeurs des indices de diversité (Simpson et Shannon), de richesse (Chao 1) et de dominance (Equitabilité) pour le microbiote des copépodes en conditions contrôles et contaminées en MPs durant les générations exposées (G1-G4) et de détoxification (G5). Chaque boîte à moustache correspond à une condition d'étude du microbiote des copépodes : C : en conditions contrôles ; PBAT : en présence de MPs vierges de PBAT ; PE : en présence de MPs vierges de LDPE ; PBATv : en présence de MPs de PBAT vieillis ; PEv : en présence de MPs de LDPE vieillis. D'après Thery *et al.* (2023).....56

Figure 2.3 : Composition des communautés microbiennes du microbiote des copépodes dans les différentes conditions durant l'exposition multigénérationnelle à l'échelle de l'ordre phylogénétique. Les ordres bactériens ont été groupés par classe puis par phylum. Les Protéobacteria ont été représentés en nuances de mauve pour les Alphaproteobacteria et de bleu pour les Gammaproteobacteria. Les Bacteroidota en nuances de marron ; Actinobacteria en nuances de rouge ; Planctomycetota en nuances de gris ; les Bacilli en nuances de vert et les Phycispharæ en orange. Uniquement les classes avec une abondance supérieure à 1% de la somme totale des séquences d'OTUs ont été représentées (recouvrement total de 97,6%). C : condition contrôle ; PBAT : MPs vierges de PBAT ; LDPE : MPs vierges de LDPE ; PBATv : MPs vieillis de PBAT ; LDPEv : MPs vieillis de LDPE ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après Thery *et al.* (2023).....58

Figure 2.4 : Composition des communautés microbiennes à l'échelle de l'ordre bactérien, des eaux utilisés pour débiter chaque génération et de l'algue *Rhodomonas sp.* utilisée pour le nourrissage des copépodes. Les taxa ont été groupés par classe puis par phylum. Les Alphaproteobacteria ont été représentées en nuances de mauve, vert et rose, excepté Defluviicoccales qui est représenté en bleu turquoise. Les Gammaproteobacteria sont représentés en nuances de bleu et de rouge, les Bacteroidota en nuances de marron, Les Verrucomicrobiae en nuances de gris et les Actinobacteria en nuance de vert turquoise et rouge vif. Enfin, mes Rhodothermia, représentés uniquement par les Balneolales sont représentés en jaune. C_eau : eau utilisée pour débiter chaque génération ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération de détoxification. D'après Thery *et al.* (2023).....59

Figure 2.5 : Cluster hiérarchique des communautés microbiennes du microbiote du copépode E. affinis dans les différentes conditions expérimentales durant les 5 générations (1-4 : générations exposées aux MPs ; 5 : génération de détoxification). La matrice de distance a été calculée avec

l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis après transformation raciné carré du nombre de séquences des OTUs. Les rectangles de couleur correspondent à la séparation arbitraire des différents clusters. C : condition contrôle ; PBAT : MPs vierges de PBAT ; LDPE : MPs vierges de LDPE ; PBATv : MPs vieillis de PBAT ; LDPEv : MPs vieillis de LDPE ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après Thery *et al.* (2023).....60

Figure 2.6 : Représentation NMDS (« Nonmetric multidimensional scaling ») des communautés du microbiote d'*E. affinis* pour les différentes conditions expérimentales durant les 5 générations (1-4 : exposées aux MPs ; 5 : de détoxification). L'eau utilisée pour débiter chaque génération et l'algue de nourrissage sont également représentées. Les couleurs de symboles correspondent aux différentes générations tandis que les symboles représentent les différentes conditions. Des cercles de couleur ont été placés de manière arbitraire afin de mettre en évidence les différents groupes. Le cercle noir représente les différents échantillons d'eau utilisée comme milieu et le cercle orange correspond aux différents échantillons de microalgue *Rhodomonas sp.* C : eau utilisée pour débiter chaque génération ; C : condition contrôle ; PBAT : MPs vierges de PBAT ; LDPE : MPs vierges de LDPE ; PBATv : MPs vieillis de PBAT ; LDPEv : MPs vieillis de LDPE ; rhodo : microalgue *Rhodomonas sp.* utilisée pour le nourrissage ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après Thery *et al.* (2023).....61

Figure 3.1 : Diagramme de Venn des OTUs partagées entre les communautés bactériennes du PBAT et du LDPE durant les 6 dates de vieillissement. Pour la première date d'analyse (T15), les résultats ont été comparés avec l'eau utilisée pour débiter le vieillissement. Eau vieillissement : eau utilisée pour débiter le vieillissement ; PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE. T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours).79

Figure 3.2 : Représentation graphique des indices de diversité alpha des taxa. Les boîtes à moustache représentent la distribution des valeurs des indices de diversité (Simpson et Shannon), de richesse (Chao 1) et de dominance (Equitabilité) pour les communautés bactériennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE aux différentes dates de vieillissement. La durée de vieillissement est exprimée en jours. PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE.....80

Figure 3.3 : Composition des communautés microbiennes de l'eau utilisée pour le vieillissement, du PBAT et du LDPE durant les différentes dates de vieillissement, à l'échelle de la classe

phylogénétique. Les classes bactériennes ont ensuite été groupées par phylum. Les Protéobacteria ont été représentés en nuances de mauve. Les Planctomycetota en nuances de bleu, les Bacteroidota en nuances de marron, les Firmicutes en nuances de rouge, les Actinobacteriota en nuances de gris, les Verrucomicrobiota en nuances de rose, les Myxococcota en nuances de vert clair et les Acidobacteriota en nuances de jaune. Les chloroflexi et les Dependuntiae sont respectivement en orange et vert. Les groupes taxonomiques représentés correspondent à 98,5% de l'ensemble des séquences du jeu de données. Eau vieillissement : eau utilisée pour débiter le vieillissement ; PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE. T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours).82

Figure 3.4 : Cluster hiérarchique des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE durant les différentes de vieillissement. La matrice de distance a été calculée par indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Les rectangles de couleur correspondent à la séparation arbitraire des différents clusters. PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE. T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours).....83

Figure 3.5 : Représentation NMDS (« Nonmetric multidimensional scaling ») des communautés microbiennes présentes initialement dans l'eau utilisée pour le vieillissement et sur les MPs de PBAT et de LDPE pour les différentes durées de vieillissement. Les couleurs de symboles correspondent aux différentes durées de vieillissement et les symboles correspondent aux conditions. Eau vieillissement : Eau utilisée pour débiter l'expérimentation de vieillissement des MPs ; LDPE : MPs de LDPE ; PBAT : MPs de PBAT ; 0/15/30/45/75/105/120 : correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours). La durée de vieillissement 0 fait référence au démarrage de l'expérimentation et n'est donc valable que pour l'eau.....84

Figure 3.6 : Heatmap des 64 espèces les plus abondantes (recouvrement > 75%) échantillonnées et séquencées dans l'eau utilisée pour débiter le vieillissement et à la surface des MPs de PBAT et de LDPE durant l'intégralité de l'expérimentation de vieillissement. Les rectangles de couleur correspondent à la séparation arbitraire des différents groupes logiques d'espèces eu égard à leurs abondances durant l'expérimentation. T0 : Eau utilisée pour débiter le vieillissement ; PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE ; T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement des MPs (en jours).....88

Liste des Tableaux

Tableau 1.1 : Tableau résumé des différents types de filtres testés (excepté pour celui en cellulose) et des possibilités offertes pour la détection de MPs après marquage au Nile Red et observation au microscope à épifluorescence. Également pour la détection et caractérisation chimique par microspectroscopie Raman des MPs ingérés par <i>E. affinis</i> provenant du milieu naturel.....	41
Tableau 1.2 : Moyenne (\pm EC), minimum et maximum des tailles de MPs ingérés par le copépode <i>E. affinis</i> échantillonné dans la zone « La Bouille » de l'estuaire de la Seine.....	42
Tableau 2.1 : Résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure du microbiote d' <i>E. affinis</i> à l'échelle de l'OTU sur les 4 générations exposées aux MPs (G1-G4) calculée par les distances de Bray-Curtis. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.....	62
Tableau 2.2 : Résultats du test ADONIS par paires réalisé sur la composition du microbiote d' <i>E. affinis</i> des différentes conditions expérimentales durant les générations contaminées en MPs (G1-G4), calculé par les distances de Bray-Curtis. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.....	63
Tableau 2.3 : Résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure du microbiote d' <i>E. affinis</i> à l'échelle de l'OTU durant la génération de détoxification, calculée par les distances de Bray-Curtis. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.....	63
Tableau 3.1 : Caractéristiques des échantillons de MPs de PBAT et LDPE préparés pour l'expérimentation de vieillissement.....	73
Tableau 3.2 : Récapitulatif des mesures de cristallinité obtenues par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) lors de la seconde analyse thermique des MPs de PBAT et de LDPE vierges, puis vieillis durant différentes périodes (15 à 120 jours) en eau autoclavée (sans bactéries) et en eau synthétique estuarienne (composée d'eau de mer de la Manche Orientale et d'eau déminéralisée) riche en bactéries.....	78
Tableau 3.3 : Résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE à l'échelle de l'OTU calculée par les distances de Bray-Curtis sur l'intégralité de l'expérimentation de vieillissement. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.....	85
Tableau 3.4 : Résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE à l'échelle de l'OTU calculée par	

les distances de Bray-Curtis sur les deux premières dates de vieillissement (15 et 30 jours). Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.....85

Tableau 3.5 : Résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE à l'échelle de l'OTU calculée par les distances de Bray-Curtis sur les dates de vieillissement ultérieures à 30 jours (45, 75, 105 et 120 jours). Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.....86

Liste des Annexes

Annexe 1.1 : Spectre Raman d'un microplastique de 2.1µm ingéré par un individu d'E. affinis échantillonné dans l'estuaire de la Seine (A) et comparaison de ce spectre avec la banque de données (B) KnowItAll, Biorad®. Dans le cas présent, le MP identifié était un copolymère composé de polyamide et de polyvinyl acétate.....	121
Annexe 2.1 : Nombre d'OTUs qui ont un changement statistiquement significatif d'abondance (augmentation ou diminution) après exposition aux MPs (PBAT ou LDPE), vieillis ou non durant l'intégralité de l'exposition multigénérationnelle (G1-G5).....	122
Annexe 3.1 : Spectres ATR-FTIR des microplastiques de LDPE (A) et de PBAT (B) vierges (t0), après 120 jours de vieillissement en eau estuarienne autoclavée (« t120 autoclaved water ») et après 120 jours de vieillissement en eau estuarienne non autoclavée (« t120 »).....	123
Annexe 3.2 : DSC lors de la seconde analyse thermique des MPs de LDPE (A-B) et de PBAT (C-D) vieillis en eau estuarienne autoclavée (A-C) et non autoclavée (B-D). t0 : échantillons initiaux de MPs vierges ; t15/30/45/75/105/120 : durée de vieillissement des MPs (en jours)	124

Liste des acronymes

LDPE : polyéthylène basse densité

PBAT : polybutylène adipate terephthalate

HDPE : polyéthylène haute densité

PS : polystyrène

PVC : polychlorure de vinyle

PP : polypropylène

PLA : acide polylactique

Introduction générale

La présence de matériaux plastiques dans les écosystèmes a été décrite pour la première fois en 1972 (Carpenter *et al.*, 1972). Dans les décennies suivant cette découverte, un grand nombre d'études ont démontré l'impact écologique négatif sur des animaux marins occupant des maillons trophiques élevés comme les oiseaux marins (Blight et Burger, 1997 ; Tanaka *et al.*, 2013), les tortues marines (Campani *et al.*, 2013), les poissons (Romeo *et al.*, 2015) ou encore les mammifères marins (Laist, 1997). Parallèlement à cela, il a été découvert que les déchets plastiques présents dans les milieux naturels vont tendre à s'altérer, et plus ou moins lentement en fonction du type de plastique, se fractionner par plusieurs phénomènes physiques et chimiques (Andrady, 2011 ; Andrady, 2015). Les phénomènes participant à la dégradation et au fractionnement de ces matériaux sont au nombre de 5 et dépendent de facteurs biotiques et abiotiques (Andrady, 2011) :

- La biodégradation par l'action des microorganismes
- La photo-dégradation par l'action des UV-B
- La dégradation thermo-oxydative par l'action de gammes de températures modérées
- La dégradation mécanique par l'action des courants et des vagues
- L'hydrolyse par réaction chimique avec l'eau

Cette diminution de taille progressive a amené la communauté scientifique à créer différents préfixes dans le dessein de catégoriser les déchets plastiques en fonction de leur taille. En outre, les particules d'une taille inférieure à 5mm ont été dénommées « microplastiques » (MPs) (Arthur *et al.*, 2009), ceci afin de permettre un consensus et une harmonisation de qualification de ce xénobiotique par la communauté scientifique. La dégradation des déchets plastiques de grandes tailles n'est pas la seule source génératrice de MPs. En effet, l'humain utilise dans la vie de tous les jours des objets émetteurs de MPs, industrialisés directement dans la gamme de taille microscopique. Ce type de MPs est notamment utilisé dans les produits cosmétiques exfoliants (Napper *et al.*, 2015) ou encore relargué sous forme de fibres provenant des vêtements synthétiques lors des passages en machine à laver (Napper et Thompson, 2016). Pour ces derniers, quand ils existent, les réseaux d'assainissement des eaux permettent de capter entre 88% et 94% des MPs entrants, résultant ainsi d'un taux de MPs relargués dans les milieux aquatiques naturels de l'ordre de 6-12%, en fonction du type d'infrastructure et des méthodes employées (Napper et Thompson, 2016 ; U. Iyare *et al.*, 2020). D'un point de vue définition, les MPs provenant de MPs industrialisés comme tel sont appelés « MPs primaires », tandis que ceux provenant de la fragmentation de déchets de tailles supérieures sont nommés « MPs secondaires ».

Tout comme les déchets plastiques de grande taille, une partie de ces MPs va avoir la capacité de se déplacer dans les écosystèmes aquatiques via les rivières jusqu'à l'environnement marin en passant par les estuaires. Andrady (2011) a estimé dans sa revue scientifique que 80% de la contamination

marine en plastique provenait des rivières. La contamination plastique des biotopes marins et aquatiques a été étudiée avec attention par le passé, sur des zones clés comme les rivières (Cole *et al.*, 2011 ; Browne *et al.*, 2011 ; Wagner *et al.*, 2014 ; Dris *et al.*, 2015), les côtes (Galgani *et al.*, 2000 ; Lindeque *et al.*, 2020) ou encore les zones au large (Lusher *et al.*, 2014). Concernant les zones estuariennes, la quantité de littérature disponible sur la thématique de la contamination en MPs est bien inférieure. Par exemple, Dris *et al.* (2020) n'ont pu dénombrer que 18 publications ayant étudié, à minima partiellement, la contamination des biotopes estuariens par ce xénobiotique. Ceci peut s'expliquer par le grand nombre de critères complexes inféodés aux estuaires à prendre en compte. En outre, le brassage et mélange d'eau de mer va impliquer un gradient de salinité le long de l'estuaire. En outre, le débit d'eau à l'instant « *t* », l'influence des marées ou encore les paramètres hydro-morphologiques de l'estuaire étudié sont des éléments tout aussi complexes à prendre en compte lors de l'échantillonnage pouvant expliquer la faible quantité d'études sur la contamination en MPs des estuaires (Dris *et al.*, 2020). Plus généralement, il est admis que la quantification et la caractérisation en MPs des échantillons environnementaux (eau, sédiment, biote) est un défi intellectuel et technique propre à chaque type de matrice précitée (Lusher *et al.*, 2016 ; Lindeque *et al.*, 2020) afin de ne pas sous-évaluer les niveaux de contamination en MPs quand leur taille est de l'ordre de quelques micromètres (Lindeque *et al.*, 2020). En outre, la gamme de taille, la diversité de forme des MPs (fibres, fragments, microbilles) mais également la caractérisation de leur nature polymérique requièrent des méthodologies et des équipements de pointes afin de quantifier et caractériser ce contaminant. Notamment par le fait qu'en égard à leur taille, de nombreuses études ont démontré la biodisponibilité¹ des MPs par des organismes « clé de voûte » des réseaux trophiques. Parmi eux, les bivalves et poissons provenant de la pêche et à destination de la consommation humaine (Rochman *et al.*, 2015) mais également le zooplancton (Steer *et al.*, 2017) dont le modèle d'intérêt de nos travaux : le copépode (Desforges *et al.*, 2015) avec l'espèce *Eurytemora affinis*.

E. affinis est un copépode estuarien phytoplanctonophage ubiquiste dans l'hémisphère nord. Il a été démontré que cette espèce est capable de s'adapter à différentes salinités par sélection naturelle des individus et non pas par plasticité génotypique (Lee *et al.*, 2003). Dans l'estuaire de la Seine, cette espèce représente la grande majorité du méso-zooplancton (jusqu'à 80%) de la partie oligo-mésohaline² de l'estuaire durant la majeure partie de l'année (Dur et Souissi, 2018). Pour se nourrir, *E. affinis* est capable de se déplacer à la verticale sur l'intégralité de la colonne d'eau jusqu'à la surface du sédiment et se trouve parfois dans des zones de l'estuaire où la turbidité mais également sa nourriture sont très importantes (Castel et Viega, 1990 ; Morgan *et al.*, 1997). Il a par ailleurs été

¹ Biodisponibilité : capacité d'être ingéré par un organisme.

² Oligo-mésohaline : zone de l'estuaire où la salinité est comprise entre 0,5 et 18 de salinité.

démontré que cette espèce possédait une certaine sélectivité alimentaire (Tackx *et al.*, 2003) mais aussi pouvait excréter plus rapidement une particule non nutritive après ingestion (Powell et Berry, 1990). Du fait des activités humaines et la forte démographie présentes le long de la Seine, l'estuaire, notamment dans la zone de présence d'*E. affinis* est fortement pollué (Cailleaud *et al.*, 2009). On retrouve notamment dans ce milieu de fortes concentrations en Cadmium présentes dans le sédiment qui posent problèmes eu égard à leur persistance et leur remobilisation possible (Chiffolleau *et al.*, 2001). Récemment, il a été démontré que l'estuaire de la Seine était impacté par la pollution en MPs (Gasperi et Cachot, 2021). Cependant, aucune étude n'avait étudié l'impregnation en MPs chez *E. affinis* dans ce biotope malgré son importance comme d'autres espèces de copépodes considérées comme modèles en écotoxicologie (Kulkarni *et al.*, 2013 ; Know *et al.*, 2015). Pour qu'un organisme soit considéré comme « modèle en écotoxicologie », il est nécessaire que celui-ci présente des caractéristiques intéressantes vis-à-vis de cette discipline scientifique. Pour certaines espèces de copépodes pélagiques, notamment *E. affinis*, l'élément principal réside dans la dominance observée de ces espèces dans leurs environnements. En effet, des études ont démontré que cette caractéristique pouvait s'avérer cruciale lorsqu'il s'agit d'estimer la « bonne santé » d'un écosystème (Das *et al.*, 2019 ; Navon *et al.*, 2020). En outre, ces espèces résidentes et représentatives de leur milieu en conditions normales sont appelées espèces indicatrices (Powell et Powell, 1986). A cela s'ajoute la capacité de maintenir ce type d'organisme en laboratoire sous forme de cultures de masse relativement aisément. Le cycle de vie d'*E. affinis* est réalisé en 15 jours à 19°C, il est complexe mais également intéressant pour l'étude des effets de contaminants (Figure introductive 1). Etant un arthropode, le développement d'*E. affinis* se fait par mues successives qui vont permettre en premier lieu le développement des stades larvaires appelés « nauplii », au nombre de 6 (Figure introductive 1). S'en suivent les stades « copépodites » également au nombre de 6, le dernier étant le stade adulte sexuellement mature et apte à se reproduire (Figure introductive 1). A ce stade, les individus mâles et femelles sont facilement identifiables grâce à des dimorphismes sexuels caractéristiques. Après reproduction, les femelles produisent des œufs qui se développent dans une matrice de protection appelée « sac ovigère ». Le cycle de vie revient à la phase initiale lorsque les œufs éclosent et libèrent les nauplii stade 1 de la génération suivante (Figure introductive 1).

Eu égard à ce cycle de vie, de nombreuses études ont démontré les effets de plusieurs contaminants tels que des composés organiques hydrophobes (Cailleaud *et al.*, 2009), des perturbateurs endocriniens oestrogéniques (Cailleaud *et al.*, 2011), des métaux traces (Kadiene *et al.*, 2019 ; Zidour *et al.*, 2019 ; Das *et al.*, 2020), ou plus récemment, des métaux traces en cocktail contenus dans des sédiments pollués (Das *et al.*, 2022) lors d'expositions courtes ou chroniques sur plusieurs générations successives d'*E. affinis* sur de nombreux estimateurs.

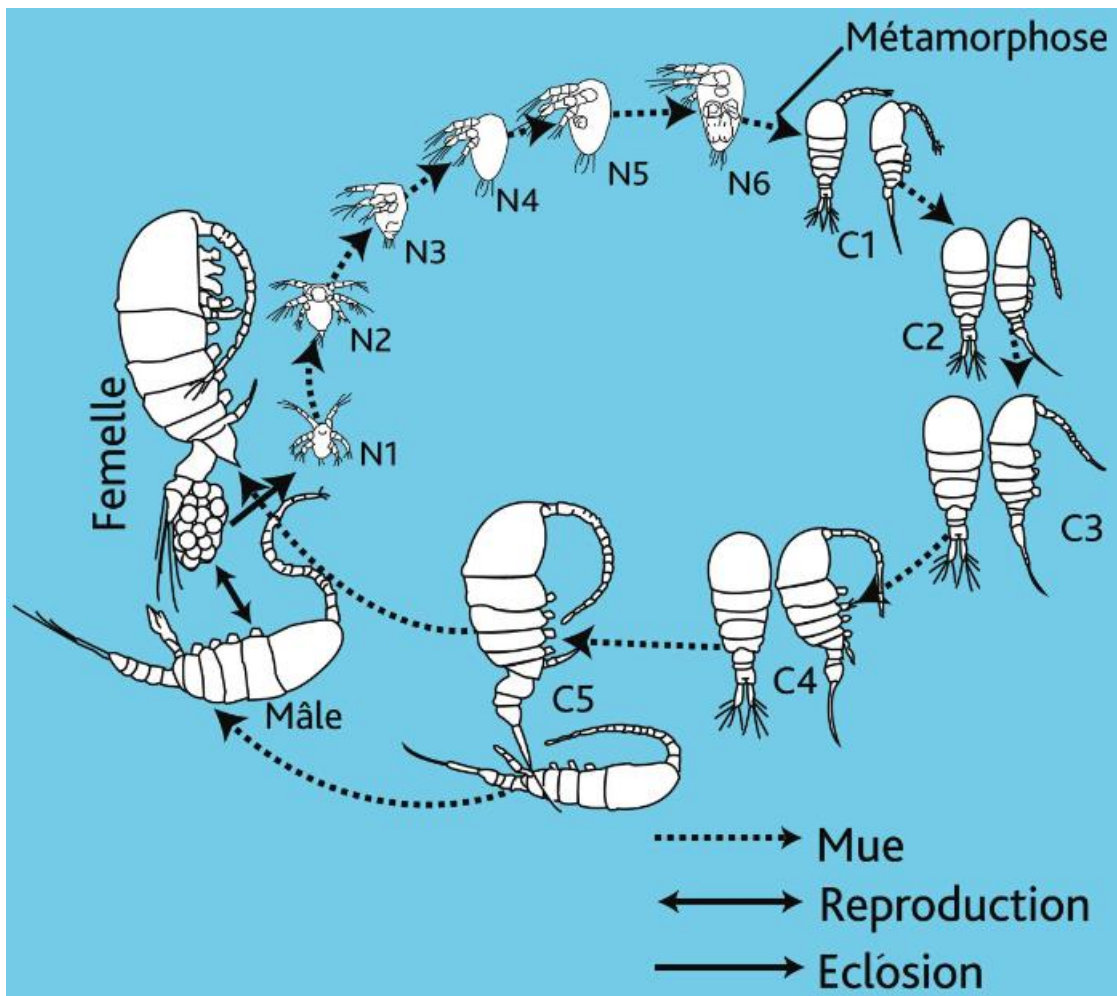


Figure introductive 1 : Détails du cycle de vie d'*Eurytemora affinis*. Les stades de développement Nx correspondent aux différents stades Nauplii (larvaires) et Cx aux différents stades Copépodites (juvéniles). Dessins compilés dans le fascicule du GIP Seine-Aval 2011, d'après Katona (1971).

E. affinis n'a été que très peu utilisée comme modèle d'étude lorsqu'il s'agissait de reporter les effets des MPs (Setälä *et al.*, 2014). Cependant, force est de constater qu'avec un très grand nombre d'études établies sur une large gamme de contaminants sur cette espèce, elle est le porte étendard des études écotoxicologiques réalisées sur les copépodes calanoïdes³ (Choi *et al.*, 2021). De même, le génome de la souche d'*E. affinis* utilisé dans nos travaux a été séquencé récemment (Choi *et al.*, 2021). En particulier dans cette étude, les gènes codant pour les mécanismes relatifs à la détoxification (cytochromes P450s, glutathion S-transférase, transporteurs ABC) ont été identifiés. La mise en lumière de l'expression de ces gènes pourrait être un avantage de taille en écotoxicologie moléculaire afin d'élargir le spectre des effets relevés des MPs chez cette espèce.

La seconde problématique inhérente aux MPs, demeure être la présence de biofilms bactériens à leur surface. En effet, durant leur séjour dans le milieu aquatique, les MPs vont très vite devenir le support

³ Calanoïde : ordre phylogénétique des copépodes dont fait partie l'espèce *Eurytemora affinis*.

de vie de microorganismes, notamment bactériens. Eu égard à l'hydrophobicité de surface des MPs, ceux-ci vont se charger en matière organique, appelé film conditionnant, et ainsi devenir un substrat pour les premières espèces faisant partie intégrante de la colonisation primaire, et ce en moins de 24h (Sheavly et Register, 2007 ; Dang *et al.*, 2008 ; Lobelle et Cunliffe, 2011 ; Jacquin *et al.*, 2019). Ces mêmes études s'accordent pour conclure que les communautés microbiennes installées dépendent de plusieurs paramètres complexes intrinsèques ou extrinsèques aux MPs tels que : la texture de surface, le type de plastique ou encore la saison. Les MPs représentent donc une aubaine pour les microorganismes pour lesquels le développement sur substrat sous forme de biofilm offre des conditions beaucoup plus optimales que sous forme libre dans la colonne d'eau. Cette formation de biofilm va par ailleurs représenter une couche de protection à la surface des plastiques, les rendant moins exposés au milieu extérieur et donc ralentissant potentiellement leur dégradation (Muthukumar *et al.*, 2011) par les autres facteurs abiotiques de dégradation précédemment cités (Andrady, 2011). Au sein des communautés bactériennes qui utilisent les MPs comme support de vie, il a été démontré que des espèces toxiques ou pathogènes peuvent avoir la possibilité de se développer sur ce support et ainsi atteindre des environnements inatteignables sans le vecteur physique « microplastique », persistant dans l'environnement. Le genre *Vibrio* a été plusieurs fois mis en lumière dans la littérature scientifique. En milieu naturel marin mais aussi sur la plage, attaché à des MPs de polypropylène (PP) (Zettler *et al.*, 2013 ; Quilliam *et al.*, 2014). Snoussi *et al.* (2009) ont quant à eux isolé l'espèce *Vibrio alginolyticus* et démontré la colonisation par cette espèce du polyéthylène (PE), du polystyrène (PS) ainsi que du polychlorure de vinyle (PVC). A cette problématique de colonisation des MPs par des espèces endémiques des écosystèmes s'ajoute les conséquences des rejets des stations d'épuration des eaux (STEPs) dans les milieux naturels. En effet, durant les traitements, les MPs arrivants vont devenir substrats et vecteurs des microorganismes présents dans les eaux de traitements. Ces communautés microbiennes sont extrêmement semblables à celles du tractus digestif humain et contiennent des espèces pathogènes (Newton *et al.*, 2011). Les STEPs rejettent une partie non négligeable de ces MPs (Murphy *et al.*, 2016 ; Ziajahromi *et al.*, 2016) dans les milieux naturels vecteurs d'espèces anthropogéniques et potentiellement dangereuses (Newton *et al.*, 2011).

Une décontamination à l'échelle mondiale de la pollution plastique semble irréaliste. Pour les années futures deux solutions semblent prendre leurs voies afin de diminuer l'impact de ce polluant sur les écosystèmes : la réduction de la production matériaux plastiques et le recyclage afin de diminuer les intrants dans les milieux naturels. La seconde solution est le remplacement des plastiques persistents connus (PE, PS, polypropylène (PP), PVC, etc..) par des plastiques appelés « biopolymères ».

Le terme bioplastique englobe plusieurs types de plastiques qui peuvent être considérés comme vertueux, pour leur origine (ressource renouvelable) et/ou leur fin de vie (biodégradable). Il existe 3 catégories de bioplastiques :

- Les plastiques biosourcés dont la majorité des constituants provient d'une biomasse renouvelable. Ces plastiques sont considérés comme vertueux du fait de leur origine mais ne sont pas forcément biodégradables
- Les plastiques biodégradables, qui sont d'origine pétrolière mais qui répondent à la norme NF EN 13432 (Afnor, 2000) en termes de biodégradabilité. Cette catégorie correspond aux plastiques qui vont se dégrader par attaques bactériennes et fongiques et respecter des exigences de durée maximum de 6 mois de biodégradation (> à 90% de la biomasse initiale) en compost industriel. Il est primordial de souligner que cette biodégradation en compost industriel a lieu en conditions optimales induites par le compost industriel, bien éloignées des conditions du milieu naturel.
- Les plastiques biosourcés et biodégradables qui répondent aux deux définitions précédentes.

Pour nos travaux, nous avons considéré deux bioplastiques intéressants pour nos thématiques. L'acide polylactique (PLA) a été sélectionné par son omniprésence sur le sujet des bioplastiques. Le PLA est un polymère semi-cristallin synthétisé à partir de biomasse renouvelable comme la fécule de maïs ou encore le sucre de canne (Grigoras 2021). Il a d'abord été utilisé dans le domaine biomédical dans les années 1970s (Masutani et Kimura, 2015). Sa production est depuis quelques années beaucoup plus importante eu égard à la volonté de remplacer les plastiques pétro sourcés par d'autres alternatives. En effet, du fait de ses propriétés mécaniques, il est candidat au remplacement d'autres polymères rigides comme le PS et le PP (European Bioplastics, 2022). Ce polymère est considéré comme biodégradable. Cependant, comme nous avons pu l'exposer précédemment, cette biodégradabilité est vérifiée dans des conditions de compost industriel bien spécifiques. A l'heure actuelle, uniquement une poignée d'études se sont intéressées à la biodégradabilité des bioplastiques en milieu naturel. Elles ont cependant pu démontrer que la biodégradabilité de ce bioplastique était relative en milieu naturel après des durées prolongées d'immersion, notamment en conditions marines (Deroiné *et al.*, 2014 ; Delacuvellerie *et al.*, 2021 ; Delacuvellerie *et al.*, 2023). De plus, ce polymère commence à être échantillonné sous forme de MPs en milieu naturel (Lerebours *et al.*, 2022). Il y a donc nécessité de mettre en place des méthodes permettant de caractériser au mieux ce nouveau contaminant dans les biotopes mais surtout dans les biocénoses, avec notamment les organismes occupant les premiers maillons trophiques comme le modèle copépode pour lesquels la gamme de taille des MPs les rends biodisponibles pour ces organismes.

Le second bioplastique sélectionné pour nos travaux était le polybutylène adipate terephthalate (PBAT). Le PBAT est un copolymère aliphatique et aromatique obtenu par polycondensation de l'acide adipique, du 1,4-butanediol et de l'acide téréphthalique. A contrario du PLA, le PBAT n'est pas biosourcé mais également considéré comme biodégradable. En effet, sa partie aliphatique le rend intéressant de par sa sensibilité à l'hydrolyse (Jian *et al.*, 2020). Il se place sur le marché des bioplastiques comme une alternative au LDPE eu égard à sa flexibilité (European Bioplastics, 2022) qui le rend intéressant sous forme de films comme utilisé dans les emballages alimentaires ou les sacs plastique. Pour le PBAT, des études en milieu marin ou mimant ce milieu ont démontré une dégradation plus importante que celle du PLA, bien que n'atteignant pas les taux mesurés en compost industriel (Delacuvellerie *et al.*, 2021 ; Delcuvellerie *et al.*, 2023). Cependant, ces études ont examiné la dégradation des plastiques sous forme de macro-échantillons. La question d'une augmentation ou d'une diminution de la vitesse de dégradation sous forme de MPs peut donc se poser.

Compte tenu des défis méthodologiques concernant la caractérisation des MPs chez le copépode et aux questions soulevées par les plastiques considérés comme biodégradables, notamment concernant leur biodégradabilité en conditions marines et leur écotoxicité, nous avons choisi le copépode *Eurytemora affinis* comme modèle d'étude. Cette espèce a été utilisée comme descripteur de la contamination en MPs dans l'estuaire de la Seine mais aussi afin d'estimer l'écotoxicité des bioplastiques sur ce modèle en utilisant un nouveau descripteur de d'écotoxicité chez le modèle copépode : le microbiote.

Objectifs de cette thèse.

Dans le contexte présenté en introduction, 3 objectifs ont été établis pour cette thèse :

- (i) Mettre en place une méthodologie d'identification et de caractérisation des MPs chez le copépode *E. affinis* en laboratoire et valider cette méthode sur des échantillons environnementaux d'*E. affinis*.
- (ii) Réaliser une étude comparative des effets de MPs de LDPE et de PBAT sur le microbiote d'*E. affinis* lors d'une exposition multigénérationnelle.
- (iii) Réaliser une étude comparative de vieillissement en simulation de conditions estuariennes du LDPE et PBAT sous forme de MPs afin d'étudier les paramètres chimiques des polymères et la dynamique microbienne à leurs surfaces.

Les chapitres de cette thèse ont été préparés et traduits comme de manuscrits de publications parus (Chapitre I : « A New Method for Microplastics Identification in Copepods », They *et al.*, 2022 et II : « Multigénérationnal exposure of microplastics on the microbiota of *E. affinis* (copepod) : a

comparative study between biodegradable and nonbiodegradable microplastics », They *et al.*, 2023)
et en préparation (Chapitre III.) à des revues scientifiques à comité de lecture.

**Chapitre I. Méthodes
d'identification et de
caractérisation des
microplastiques chez le
modèle copépoide *E.*
*affinis***

Résumé

Cette étude explore plusieurs méthodes d'identification des microplastiques (MPs) de petites tailles ($<10\ \mu\text{m}$) chez le copépode *Eurytemora affinis* récolté dans l'estuaire de la Seine (France) et identifié à l'aide de la microscopie à épifluorescence et de la microspectroscopie Raman. Pour calibrer la méthodologie, des copépodes issus de cultures de masse ont été utilisés. Tout d'abord, nous avons marqué trois types de MP (c'est-à-dire, polystyrène, polyéthylène et polylactide) avec du Nile Red et avons confirmé leur ingestion par *E. affinis* grâce à la microscopie à épifluorescence. Considérant la détection aisée des MPs marqués au Nile Red à la microscopie à épifluorescence, nous avons tenté de coupler cette méthode avec la microspectroscopie Raman. Pour ce faire, nous avons développé une méthode de digestion enzymatique débutant par la digestion des copépodes à l'aide de la Protéinase K, suivie d'une étape de passage aux ultrasons afin de fragmenter leur cuticule. Le lysat était ensuite filtré sous vide sur des filtres membrane en polycarbonate noir, s'avérant être les plus adaptés pour la microscopie à épifluorescence. Les MPs potentiels étaient marqués au Nile Red directement sur le filtre, permettant une détection visuelle relativement rapide. Cependant, nos résultats ont montré que les filtres membrane en polycarbonate noir induisaient une fluorescence de fond significative lors de l'identification Raman des MPs, rendant impossible la caractérisation des particules de moins de $10\ \mu\text{m}$. De ce fait, nous n'avons pas pu associer la méthode de marquage au Nile Red à la micro-Raman pour la gamme de tailles de MPs ciblée dans cette étude. Ainsi, des filtres en oxyde d'aluminium ont été testés et la méthode de marquage au Nile Red a été remplacée par une observation classique à la loupe binoculaire pour délimiter des zones d'observation de MPs potentiels pour caractérisation ultérieure par microscopie Raman. Les filtres en oxyde d'aluminium ont induit moins de fluorescence, permettant la détection de MPs (de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre) sur des copépodes issus de cultures en laboratoire exposés aux MPs. Nous avons appliqué cette méthode sur des copépodes collectés dans l'estuaire de la Seine. Dans un échantillon de 20 copépodes répartis en trois réplicats, nous avons identifié 17 MPs (moyenne de 0,28 MPs/copépode) composés de huit types de plastiques différents et de six couleurs. Ces MPs correspondaient à 59% de fibres d'un diamètre de $14,1 \pm 9,4\ \mu\text{m}$ et d'une longueur de $391,6 \pm 600,4\ \mu\text{m}$ ainsi qu'à 41% de fragments avec un diamètre moyen de $13,2\ \mu\text{m} \pm 9,5\ \mu\text{m}$. Cette étude présente une nouvelle approche pour détecter la présence de petites particules de MPs $< 10\ \mu\text{m}$ ingérées par les copépodes dans l'environnement naturel.

Mots clés : copépodes, *Eurytemora affinis*, microplastiques, protocole de digestion, coloration Nile Red, microspectroscopie Raman

1. Introduction

L'étude de l'impact des petits fragments de plastique sur presque tous les composants des réseaux alimentaires marins a été récemment documentée (Jeong *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020). Une fraction significative des débris plastiques est acheminée vers les milieux marins par les rivières et les estuaires. Par exemple, dans la Seine, la pollution plastique est observée dans les échantillons environnementaux depuis 1965 sur des sites soumis à l'influence des marées (Tramoy *et al.*, 2019). Alors que les débris plastiques de grande taille sont visibles dans les habitats aquatiques et sont appelés macro-plastiques, la fraction la plus petite, appelée microplastique, arbitrairement définie comme des fragments de plastique de moins de 5mm, représente la partie cachée (Arthur *et al.*, 2008) et la majorité (Lindeque *et al.*, 2020) de la pollution plastique. Les MPs peuvent provenir de la dégradation des débris plastiques de plus grande taille par des mécanismes physiques et chimiques lors de leur migration dans les écosystèmes (Andrady, 2011). Ainsi, lorsque la taille des MPs diminue, leur nombre augmente inévitablement (Maes *et al.*, 2017).

En raison de leur petite taille et de leurs diverses propriétés (abondance, variété de densité et de couleurs), les MPs présentent une biodisponibilité importante pour une vaste variété de vertébrés et d'invertébrés occupant les niveaux trophiques inférieurs (Wright *et al.*, 2013). Les chercheurs se concentrant sur le sujet des MPs ont utilisé des méthodologies diverses pour détecter et caractériser ce xénobiotique dans différents compartiments environnementaux (Renner *et al.*, 2018). Même si la plupart des études utilisent l'identification visuelle au microscope, cette méthode, lorsqu'elle est utilisée seule, reste controversée (Song Y. K. *et al.*, 2015) en raison des importantes variations entre observateurs, ce qui peut conduire à une surestimation ou à une sous-estimation des MPs (Prata *et al.*, 2019). Pour remédier à ce problème, davantage de méthodes analytiques tendent à être utilisées pour obtenir une caractérisation chimique plus précise. Parmi elles, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Frias *et al.*, 2014) et la spectroscopie Raman (Lenz *et al.*, 2015) sont des méthodes populaires. Selon la littérature, la FTIR représente une bonne alternative à l'analyse visuelle car elle est moins chronophage comparée à la spectroscopie Raman. Cependant, elle pourrait conduire à une sous-estimation des MPs < 20 µm par rapport à la spectroscopie Raman en raison de la limite de diffraction de la spectroscopie IR (Käppler *et al.*, 2016) dont la limite de détection semble être fixée à 10 µm (Sun *et al.*, 2018a).

Les copépodes sont un groupe largement répandu dans tous les écosystèmes aquatiques (Mauchline, 1998). Plusieurs études ont montré qu'aussi bien les copépodes de grande taille, tels que le calanoïde *Calanus helgolandicus*, que le petit cyclopoïde *Paracyclopina nana* ont la capacité d'ingérer des MPs dans la gamme de taille de leurs proies naturelles, en utilisant des billes fluorescentes d'un seul polymère, généralement le polystyrène (Cole *et al.*, 2014; Cole *et al.*, 2015; Cole *et al.*, 2016; Jeong

et al., 2017). L'ingestion de particules non métabolisables induit des stress mesurables à l'échelle individuelle, comme un manque d'énergie pour le développement de l'organisme, une diminution du succès reproducteur et des réserves lipidiques (Cole *et al.*, 2015). L'impact écotoxicologique des MPs a également été démontré à l'échelle moléculaire avec l'induction du stress oxydatif (Jeong *et al.*, 2017). Le taux d'ingestion des MPs dépend de la sélectivité alimentaire des individus, qui dépend elle-même de la capacité à distinguer les proies naturelles des MPs (Setälä *et al.*, 2014). En outre, les copépodes possèdent des mécano- et chimiorécepteurs qui leur permettent de relativement bien gérer leur environnement et de discriminer les éléments non alimentaires des éléments alimentaires (Strickler, 1982). Cependant, dans l'environnement, les MPs peuvent être très similaires aux éléments alimentaires et ainsi duper les copépodes car ils : ont des formes différentes comme des fibres ou des fragments, proviennent de différents polymères, et sont généralement colonisés par des biofilms bactériens. En effet, certaines études ont montré que les taux d'ingestion variaient en fonction de la nature et de la forme du polymère (Desforges *et al.*, 2015; Coppock *et al.*, 2019) et également si les MPs étaient colonisés comparativement à ceux vierges et intacts (Vroom *et al.*, 2017).

Bien qu'importantes, les études montrant l'interaction entre les MPs fluorescents et les copépodes sont difficiles à extrapoler à la situation du milieu naturel, car la plupart des MPs *in situ* ne sont pas fluorescents et ont une grande variété de formes. Par conséquent, l'investigation des interactions entre les copépodes et les MPs non fluorescents reste limitée et nécessite un développement méthodologique adéquat. Pour contourner ce problème, certaines études ont utilisé la détection visuelle en marquant les MPs avec le Nile Red puis en observant les copépodes entiers par microscopie à épifluorescence lorsqu'ils tentaient d'observer les MPs non fluorescents dans le tractus digestif des copépodes (Cole *et al.*, 2019; Coppock *et al.*, 2019). Bien que cette méthode soit efficace, la coloration des MPs est effectuée avant l'ingestion des MPs par les copépodes dans ce contexte. Par conséquent, nous ne savons pas si cette méthode est adaptée à l'étude de l'imprégnation en MPs des échantillons environnementaux de copépodes. Une autre problématique identifiée lors de la tentative de détection et de caractérisation des MPs non fluorescents ingérés par les copépodes est l'élaboration de nouvelles méthodes capables d'expulser les MPs en dehors de la matrice copépode, notamment de la cuticule, et de minimiser leur altération lors de cette étape. Les études portant sur la contamination des copépodes provenant de l'environnement naturel par les MPs ont utilisé un protocole de digestion par attaques acides (Desforges *et al.*, 2015). Cependant, cette méthode pourrait conduire à la digestion des polymères à faible tolérance au pH et sous-évaluer la contamination des MPs chez les individus étudiés. Pour la caractérisation chimique des MPs, la détection visuelle et la μ -FTIR demeurent les deux méthodes utilisées avec une limite inférieure de 7 μ m constatée pour la caractérisation des MPs (Sun *et al.*, 2018a).

À notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée à ce jour ayant développé une méthode analytique adéquate pour l'identification et la caractérisation chimique des MPs de petite taille (~1-10 μm) ingérés par des copépodes provenant du milieu naturel. Ainsi, nous avons développé une méthodologie complète adéquate en utilisant des individus adultes d'une culture de masse de l'espèce *Eurytemora affinis* afin de calibrer certains paramètres comme le temps de digestion enzymatique, le type de filtre à utiliser lors de la caractérisation au micro-Raman ou encore le paramétrage de celui-ci. Une fois cette méthode validée avec une nouvelle limite de détection chez le modèle copépode de 1 μm , elle a été appliquée sur des copépodes de la même espèce prélevés dans l'estuaire de la Seine.

2. Matériels et méthodes

2.1. Types de MPs utilisés sur les cultures de masse de copépodes

Tout d'abord, trois types de plastiques commerciaux ont été considérés séparément au cours de cette étude : deux plastiques pétrosourcés non biodégradables, à savoir le polystyrène (PS) ($d < 1 \text{ g cm}^{-3}$) et le polyéthylène (PE) ($d < 1 \text{ g cm}^{-3}$) et un plastique biosourcé biodégradable, à savoir le polylactide (PLA) ($d > 1 \text{ g cm}^{-3}$). Les billes de PS ont été fournies par Polysciences Inc., États-Unis. Ces microsphères de PS étaient dispersées de manière homogène dans une solution et d'un diamètre de 6 μm . Le PE a été fourni par le Prof. J. Cachot (Université de Bordeaux, France) et obtenu en utilisant un protocole de broyage et de cryobroyage, produisant des MPs d'un diamètre de 4-6 μm . Les MPs de PLA, d'un diamètre de 3-9 μm , ont été préparés par Resinex (Belgique) à partir du biopolymère Ingeo™ 4043D fourni par NatureWorks LLC (États-Unis). Pour tester nos méthodes sur une combinaison de polymères, nous avons également utilisé un mélange de macroplastiques collectés dans l'estuaire de la Seine, qui a été broyé et cryobroyé en microplastiques utilisés pour les études menées dans le cadre du projet français Plastic-Seine financé par le GIP Seine-Aval (MPs *in situ*). Les échantillons étaient composés en termes de masse de 65% de PE (40% de polyéthylène basse densité (LDPE) et 25% de polyéthylène haute densité (HDPE)), 25% de PP et 10% de PS. Ces trois polymères sont représentatifs de la contamination globale des milieux par les MPs car ils sont massivement produits chaque année et sont courants dans l'environnement marin (Avio *et al.*, 2017). Au total, 7% des MPs dans cet échantillon avaient une taille dans notre gamme de taille ciblée <10 μm , eu égard à leur utilisation pour plusieurs recherches sur différents modèles biologiques durant le projet Plastic-Seine.

2.2. Modèle copépode

2.2.1. Copépodes provenant de cultures de masse

La culture de masse du copépode *E. affinis* utilisée dans nos expériences provient d'individus sauvages échantillonnés en septembre 2014 dans la zone oligo- mésohaline de l'estuaire de la Seine et maintenue depuis cette date à la Station Marine de Wimereux à une température constante de 19°C avec une photopériode de 12:12 à une salinité de 15 PSU (mélange d'eau de mer de la Manche Orientale filtrée et d'eau déminéralisée) (Michalec *et al.*, 2017) en utilisant le protocole multi-génération développé par notre groupe (Souissi *et al.*, 2016 ; Das *et al.*, 2020). Cette culture de masse fournit des individus standardisés pour les études écotoxicologiques. Pour ce travail méthodologique, nous nous sommes concentrés sur les stades adultes en utilisant les deux sexes pour réaliser les expositions aux MPs.

Les copépodes étaient nourris avec la microalgue *Rhodomonas sp.* qui est une bonne source nutritionnelle pour les copépodes, permettant une haute performance de la culture (Dayras *et al.*, 2021). Les copépodes ont été maintenus à jeun pendant 1 semaine avant l'exposition aux MPs. Ceci pour rendre les MPs plus attrayants pour l'ingestion, mais aussi pour faciliter l'observation avec un microscope à épifluorescence en raison de l'auto-fluorescence relativement élevée des cellules de *Rhodomonas sp.*

2.2.2. Copépodes échantillonnés dans le milieu naturel

Afin de valider nos méthodes sur des échantillons environnementaux, 60 (3 répliques de 20 copépodes) adultes d'*E. affinis* ont été isolés de la station "La Bouille" (coordonnées GPS : 49.3540, 0.9293) par le laboratoire d'Écologie Fonctionnelle et Environnement de Toulouse (EcoLab - UMR CNRS-UPS-INPT 5245) à l'aide d'un filet à plancton dans le cadre du projet SENTINELLES (<https://www.seine-aval.fr/projet/sentinelles/>). Cette station est située dans la zone amont de l'estuaire de la Seine. Les copépodes ont été échantillonnés à deux points différents en filtrant 50 L d'eau sur un filet de maille de 50 µm. Ensuite, chaque échantillon de zooplancton a été conservé dans une solution de formaldéhyde à 4% de 200 ml.

Des individus adultes d'*E. affinis* ont été triés afin d'étudier leur contamination en MPs. Les échantillons de zooplancton ont d'abord été tamisés et abondamment rincés pour éliminer le formaldéhyde, puis placés dans de l'éthanol de manière homogène avec une boîte Motoda. Les individus d'*E. affinis* ont ensuite été isolés avec une pipette Pasteur et mis dans un bocal en verre fermé avec une solution d'éthanol à 70% pour les futures études d'imprégnation en MPs.

Pendant l'isolement des copépodes, un récipient en verre ouvert rempli d'eau MilliQ a été placé près de l'opérateur pendant toute la manipulation afin d'être utilisé comme témoin de la contamination

atmosphérique en MPs. Cette eau MilliQ a ensuite été filtrée sous vide et les MPs ont été comptés afin d'évaluer la contamination atmosphérique qui pourrait affecter les filtres servant pour nos études.

2.3. Protocole de digestion employé sur les copépodes provenant des cultures de masse

Pour les MPs testés (c'est-à-dire PS, PE, PLA et MPs *in situ*) dans les copépodes de cultures de masse, le protocole d'ingestion était le même. Un témoin et trois réplicats de 20 adultes d'*E. affinis* étaient isolés à l'aide d'une pipette Pasteur sous une loupe binoculaire (Olympus SZX2-ILLK, Olympus, Japon) puis conservés dans un bécher de 80 ml avec de l'eau à 15 PSU (salinité estuarienne) sous aération constante. La salinité estuarienne a été obtenue en mélangeant de l'eau MilliQ avec de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm de la Manche Orientale.

Pour chaque échantillon de MPs mentionné ci-dessus, une concentration de 3 mg/L de MPs (gamme de tailles décrite dans la section 2.1) a été ajoutée dans chaque bécher pendant 12 h dans l'obscurité afin de conserver la fluorescence des MPs, lorsqu'ils étaient colorés au Nile Red. Dans ces conditions, la quantité de Nile Red adsorbé sur les MPs était suffisamment faible pour éviter tout effet négatif sur les copépodes pendant l'exposition.

2.4. Méthodes d'identification des MPs sur les copépodes provenant de cultures de masse

2.4.1. Marquage des MPs

Pour les trois méthodes de marquage décrites ci-dessous, une solution mère de 500 µg/ml de Nile Red était préparée dans de l'acétone et conservée à 4°C à l'abri de la lumière pour les besoins futurs des expériences.

2.4.1.1. Coloration des MPs avant exposition aux copépodes

Cette première méthode de marquage a été réalisée en tant que travail préliminaire. L'objectif de cette expérience était de démontrer la capacité des adultes d'*E. affinis* issus de cultures en masse d'ingérer des échantillons de MPs d'une taille conforme à notre objectif ciblé pour les MPs (<10 µm). Les MPs étaient placés dans un micro-tube avec quelques gouttes de solution mère de Nile Red pendant 10 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite, les MPs marqués étaient filtrés sous vide sur une membrane en polycarbonate Whatman™ Nuclepore (0,2 µm, 47 mm), brièvement rincés à l'acétone pour éliminer l'excès de colorant, puis abondamment rincés à l'eau MilliQ. Enfin, les MPs étaient remis en suspension pour l'expérience d'ingestion décrite précédemment (Section 2.3).

2.4.1.2. Coloration des MPs après exposition aux copépodes sans protocole de digestion

La coloration des MPs avant ingestion n'était pas applicable pour les copépodes sauvages. Ainsi, afin d'étudier la possibilité de détecter des MPs sur des copépodes entiers à l'aide de la microscopie à épifluorescence, nous avons essayé différents protocoles de marquage. Tout d'abord, nous avons marqué les MPs dans le tractus digestif après ingestion par les copépodes, sans digérer les organismes. Pour s'assurer que les individus avaient des MPs dans le tractus digestif, un total de 20 copépodes pour lesquels les MPs étaient détectés dans le tractus digestif en utilisant le marquage au Nile Red avant ingestion étaient laissés pendant 2 heures à la lumière du jour dans une boîte de Pétri afin de stopper la fluorescence du Nile Red. Ensuite, les copépodes étaient placés dans un bécher avec 20 ml d'eau MilliQ. Puis, 10 µl de la solution mère de Nile Red étaient ajoutés. Les copépodes étaient laissés dans l'obscurité pendant 10 minutes avant l'observation au microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon, Japon).

2.4.1.3. Coloration des MPs après exposition aux copépodes et digestion des individus

Après avoir testé les possibilités offertes par le marquage des MPs sur des copépodes entiers avec le Nile Red, les mêmes techniques ont été directement appliquées à un filtre, après digestion des individus contaminés aux MPs et filtration sous vide. L'hypothèse de cette méthode était d'utiliser l'avantage du marquage au Nile Red tout en rendant possible une caractérisation par microspectroscopie Raman. Comme des filtres en polycarbonate étaient utilisés, une seconde solution de Nile Red (5 µg/ml) dans du n-hexane était préparée en diluant la solution mère faite dans l'acétone. Le n-hexane était utilisé comme solvant pour ne pas modifier les propriétés du filtre en polycarbonate, rapporté par une étude précédente (Shim *et al.*, 2016). Cette concentration plus faible de Nile Red était utilisée pour continuer à colorer les MPs sans induire une fluorescence du filtre trop importante. Après la digestion des individus et la filtration sous vide du lysat, la solution était brièvement vortexée et 1ml de la solution de marquage était ajouté sur le filtre, puis laissé pendant 10 minutes pour permettre l'évaporation totale du solvant. Le même protocole de coloration était réalisé pour les tests sur filtres en oxyde d'aluminium.

2.4.2. Etapas préliminaires réalisées sur les copépodes pour l'identification des MPs

Pour les copépodes de culture de masse, à la fin du protocole d'ingestion, les individus étaient tamisés, fixés avec de l'éthanol à 70% puis délicatement rincés avec de l'eau MilliQ pour éliminer les MPs sur les parties externes des copépodes, comme la cuticule et les appendices.

Ensuite, l'étape suivante de la préparation des copépodes dépendait de la méthode analytique finale utilisée :

Pour les deux premiers protocoles de marquage, qui ne nécessitaient pas de digestion des copépodes comme décrit précédemment, les individus étaient directement placés sur des lames de microscope et observés par microscopie à épifluorescence.

Pour les tests sur des copépodes digérés, un groupe de 20 individus contaminés aux MPs était placé dans un Erlenmeyer de 100 ml avec 20 ml d'eau MilliQ et 160 μ l (0,2 mg/ml) de solution de Protéinase K (AppliChem GmbH, Allemagne). La digestion des copépodes était réalisée pendant une nuit à 50°C (température optimale pour l'activité de la Protéinase K) sous agitation, suivie de 20 minutes de passage aux ultrasons. Le lysat était filtré sous vide sur une membrane noire de polycarbonate Whatman™ Nuclepore (0,2 μ m, 47 mm) ou un filtre d'oxyde d'aluminium Whatman™ Anodisc™ (0,2 μ m, 47 mm) selon les expériences.

Les filtres de cellulose n'ont pas été utilisés en raison du fort signal Raman émis par la cellulose (Wright *et al.*, 2019). Le papier et la fibre de verre ont été utilisés dans nos tests préliminaires mais rapidement éliminés de notre protocole final en raison de leur épaisseur relativement importante qui ne permettait pas d'identifier facilement les MPs sur le filtre.

Les filtres étaient finalement placés dans des boîtes de Pétri recouvertes de Parafilm pour minimiser la contamination externe par les MPs de l'air, puis placés dans un dessiccateur avec du gel de silice jusqu'à analyse ultérieure. Pour l'analyse par microspectroscopie Raman, le même protocole de digestion était suivi.

2.4.3. Identification des MPs par microscopie à épifluorescence

Les échantillons étaient analysés avec un microscope à épifluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 455 nm et une longueur d'onde d'émission de 494 nm avec des objectifs x10, x20 et x40 (Olympus, Japon) lorsque cela était nécessaire. Pour les échantillons digérés, pendant l'observation, les zones de présence potentielle de MPs étaient délimitées avec un crayon pour réduire le temps d'observation lors de la détection et la caractérisation manuelle par micro-Raman.

2.4.4. Identification par microspectroscopie Raman

Les filtres ont été analysés à l'aide d'un micro-Raman Xplora Plus (HORIBA Scientific®, France) équipé d'une chambre fermée qui protège les filtres de la contamination extérieure par les particules en suspension dans l'air. Les zones de présence de MPs potentiels précédemment marquées étaient observées avec un objectif x10 puis x100 à l'aide d'un microscope (Olympus, France). Les particules

détectées étaient analysées avec deux lasers ayant une longueur d'onde de 532 nm et 785 nm selon la particule, dans la plage de 200 à 3 300 cm^{-1} afin d'obtenir les spectres des principaux polymères (Käppler *et al.*, 2016). Pour chaque MP suspecté, le spectre Raman était comparé à une base de données d'identification des polymères (KnowItAll, BioRad®) et à une bibliothèque personnelle réalisée avec des polymères standard obtenus de Goodfellow (France). Pour les échantillons préparés à partir de copépodes collectés dans l'estuaire de la Seine, des photos des particules ont été prises à l'aide du logiciel Labspec 6 (Horiba Scientific, Japon). De plus, leur taille, forme et couleur ont été enregistrées.

2.5. Application des méthodes validées sur les copépodes provenant du milieu naturel

Un ensemble de 60 individus prélevés dans l'estuaire de la Seine a été analysé en utilisant la méthode la plus efficace que nous avons développée à partir de nos conclusions sur les copépodes provenant de cultures de masse. Brièvement, les individus ont été digérés puis filtrés sur des filtres en oxyde d'aluminium Whatman™. En effet, nos résultats sur les copépodes expérimentaux ont montré la nécessité d'utiliser un filtre en oxyde d'aluminium pour la caractérisation chimique des petits MPs (<10 μm) avec la microspectroscopie Raman. De plus, la méthode de marquage au Nile Red était impossible avec ce type de filtre. Afin de minimiser le temps d'observation des MPs potentiels sur le filtre lors de l'analyse Raman, le marquage des MPs et l'observation par épifluorescence étaient remplacées par une observation préliminaire à la loupe binoculaire (Olympus SZX10, Olympus, Japon) durant laquelle les zones de présence potentielles de MPs étaient délimitées avec un crayon. Ensuite, les particules étaient analysées par microspectroscopie Raman comme décrit précédemment.

3. Résultats

3.1. Méthodes de coloration des MPs sur les copépodes entiers

Nos essais préliminaires de marquage des MPs avec le Nile Red avant ingestion nous ont permis de marquer et d'observer des polymères seuls (Figure 1.1) et en mélange sous forme de MPs *in situ* en utilisant la microscopie en fluorescence. Grâce à la nature solvatochromique du Nile Red, les différents polymères observés avaient une coloration différente en fonction de leurs caractéristiques de polarité de surface (Maes *et al.*, 2017).

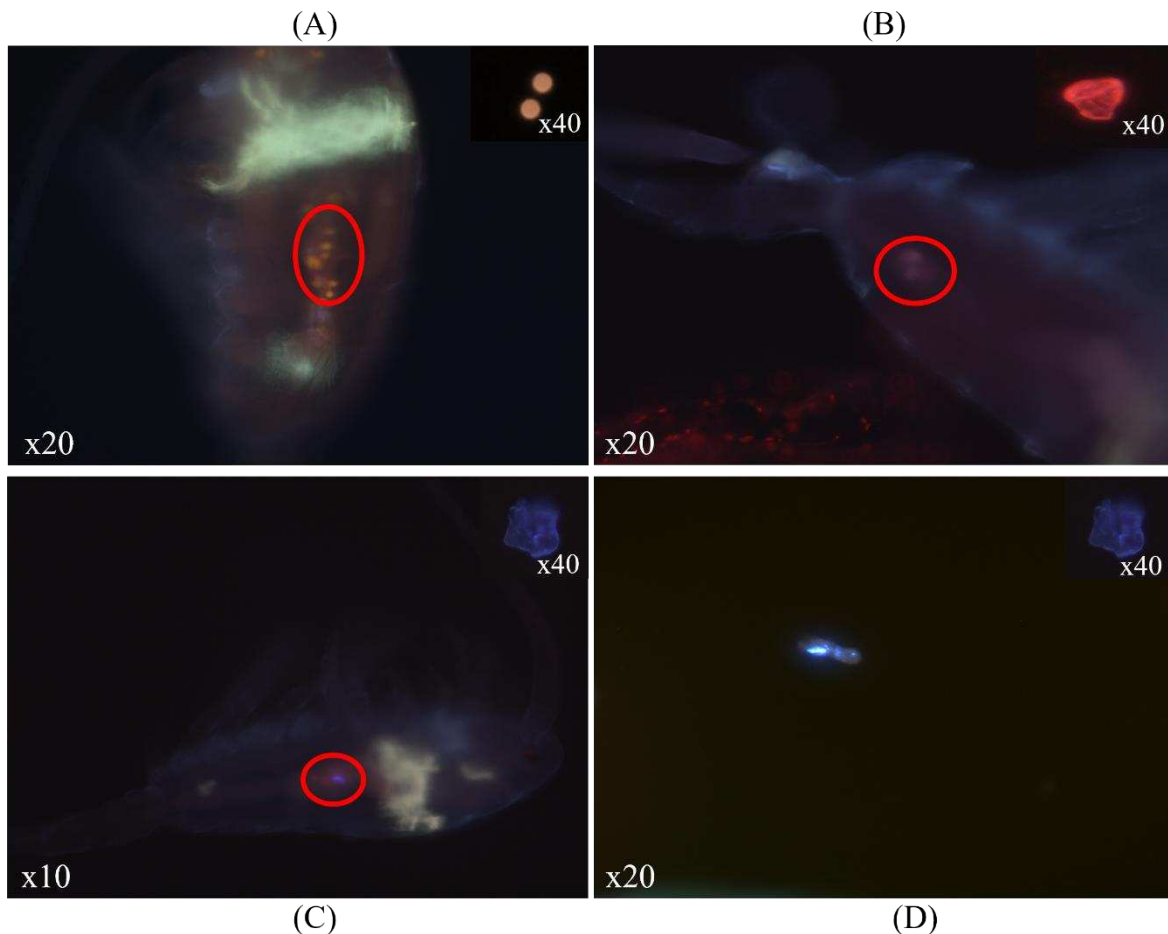


Figure 1.1 : Microplastiques de PS (A), PLA (B), LDPE (C), (D) marqués au Nile Red et détectés (cercles rouges) dans le tractus digestif (A-C) et les fèces (D) d'individus du copépode *E. affinis* après protocole d'ingestion, observés au microscope à épifluorescence (longueur d'onde :455-494 nm). D'après Theyry *et al.* (2022).

Cette caractéristique a permis la détection de chaque type de polymère séparément (PS, PE ou PLA) dans le tractus digestif des individus d'*E. affinis* et également dans leurs fèces. Pour le mélange de MPs *in situ*, nous avons comparé l'abondance relative de chaque couleur de coloration avec l'échantillon pour déterminer quel polymère correspondait à quelle couleur (Figure 1.2A) et avons confirmé les résultats avec le micro-Raman. Contrairement au PS et au PP, les surfaces des particules de PE étaient composées en proportions variables de deux couleurs. Cette caractéristique découle du fait que le PE des échantillons était un assemblage de HDPE et de LDPE, ce qui modifie la coloration renvoyée selon la nature solvatochromique du Nile Red. Cette méthode de coloration rapide a permis de confirmer que les adultes d'*E. affinis* étaient capables d'ingérer des fragments et des billes de MPs dans la gamme de tailles ciblée pour calibrer nos méthodes et similaire à leurs aliments courants (microalgue *Rhodomonas sp.*)

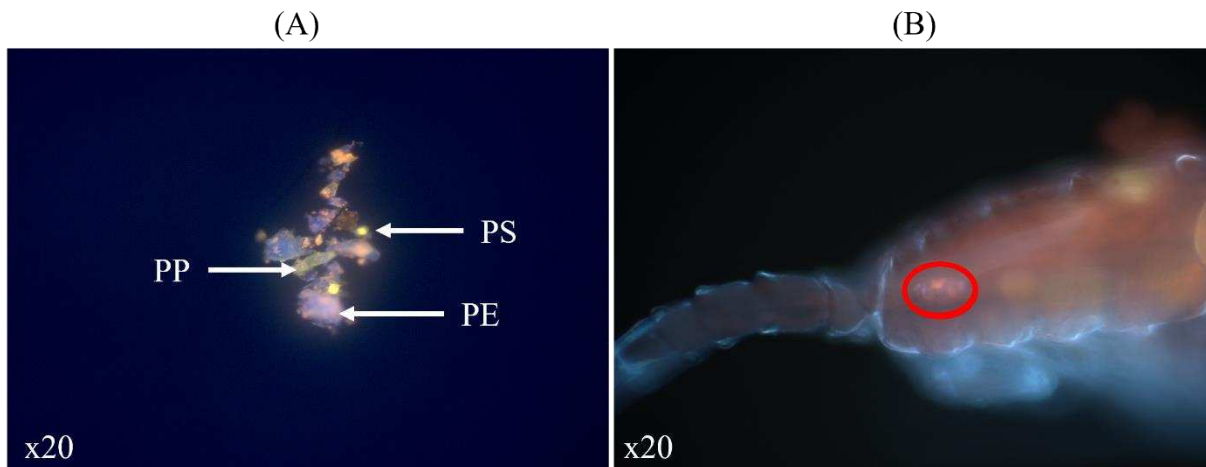


Figure 1.2 : Echantillon de MPs *in situ* marqué au Nile Red et observé au microscope à épifluorescence (longueur d'onde : 455-494 nm) (A). (B) : Observation de MPs *in situ* ingérés et visibles (cercle rouge) dans le tractus digestif d'un adulte d'*E. affinis*. D'après They *et al.* (2022).

Nous avons noté que, lorsqu'ils étaient ingérés et visibles dans le tractus digestif des copépodes, seule la couleur de fluorescence principale de l'échantillon, donnée par la plupart des particules de PE dans le mélange de MPs *in situ*, était visible avec le microscope en épifluorescence (Figure 1.2B). Pour tous les types de MPs étudiés, nous avons souligné que cette méthode, basée sur l'observation par microscopie en épifluorescence de MPs marqués au Nile Red avant ingestion, était limitée par la fluorescence naturelle des copépodes, notamment la cuticule et les gouttelettes lipidiques. Les conséquences étaient que les MPs pouvaient être manqués lors de l'observation et que leur quantification était limitée. La seconde expérimentation réalisée a été la tentative de marquage au Nile Red des MPs après avoir été ingérés. Cette approche aurait pu conduire à une méthodologie applicable pour les échantillons environnementaux de copépodes sans étape de digestion. Cependant, lors de l'observation, nous avons remarqué que cette méthode n'était pas applicable aux copépodes sauvages. En effet, lors des essais sur les copépodes de cultures de masse, le marquage ne colorait que les gouttelettes lipidiques des copépodes et n'interagissait pas avec les MPs dans le tractus digestif. À ce stade, la digestion des individus était une étape obligatoire afin de trouver une méthode basée sur la microscopie à épifluorescence et la microspectroscopie Raman opérable sur les copépodes prélevés dans le milieu naturel.

3.2. Digestion des copépodes et observation par épifluorescence des MPs colorés sur filtre résultant de la filtration du lysate

Par inspection visuelle, nous avons noté que la méthode de digestion était efficace pour digérer tous les matériaux organiques du copépode et fragmenter la chitine de la cuticule. En effet, la cuticule se trouvait sous forme de petits fragments translucides verts reconnaissables (Figures 1.3A, B), après marquage au Nile Red et observation par microscopie à épifluorescence sur filtre membrane en

polycarbonate noir. Lors de l'observation par épifluorescence, nous avons détecté que le PE (Figure 1.3A) et le PS (Figure 1.3B) avaient les mêmes colorations que celles indiquées par notre méthode précédente, lorsque les MPs étaient marqués avant ingestion sans digestion des individus.

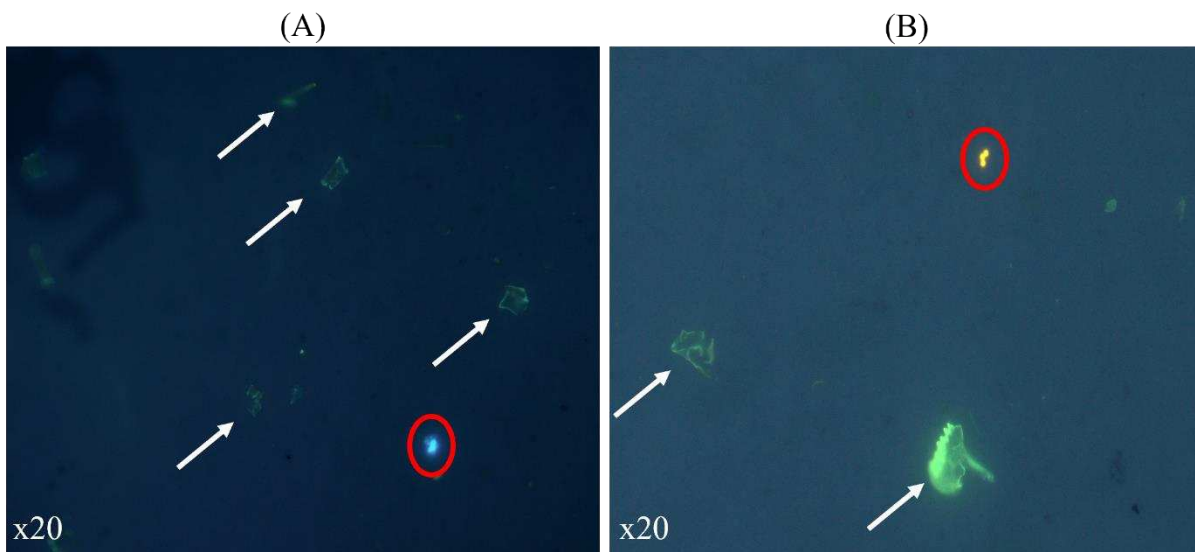


Figure 1.3 : Observation de copépodes provenant de cultures de masse contaminés par des MPs (cercles rouges) de LDPE (A) et de PS (B) ayant été digérés et filtrés sur filtre membrane en polycarbonate noir. Les filtres étaient ensuite marqués au Nile Red et observés au microscope à épifluorescence (longueur d'ondes : 455-494 nm). Les résidus de cuticules non digérés par l'attaque enzymatique sont visibles sous formes de voiles de couleur verte (flèches blanches). D'après Thery *et al.* (2022).

En ce qui concerne la méthode de coloration sur les filtres en oxyde d'aluminium, beaucoup plus de bruit de fond était observé, probablement en raison de l'interaction entre le Nile Red et la nature du filtre. Les particules sur le filtre étaient alors beaucoup moins visibles (Figure 1.4). Aucune différence critique n'était observée entre les MPs et les fragments de cuticule qui permettent de les distinguer.

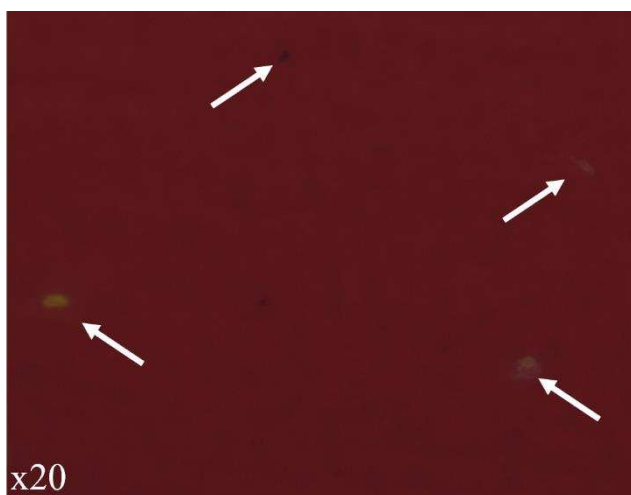


Figure 1.4 : Observation de copépodes de cultures de masse contaminés aux MPs de LDPE, digérés et filtrés sur filtre en oxyde d'aluminium. Le filtre était ensuite marqué au Nile Red puis observé au microscope à épifluorescence (longueur d'ondes : 455-494 nm). Sur ce filtre, MPs et fragments de cuticules ne sont pas différenciables (flèches blanches). D'après Thery *et al.* (2022).

3.3. Application de la microspectroscopie Raman sur les copépodes issus de cultures de masse

La première hypothèse était de coupler la méthode de marquage au Nile Red permettant une détection rapide des microplastiques (MPs) sur filtre avec une caractérisation chimique possible via la microspectroscopie Raman. Cependant, malgré ces avantages, nous avons rencontré une limite dans l'identification des polymères avec le micro-Raman, relativement élevée ($>10 \mu\text{m}$), pour le filtre membrane en polycarbonate noir, comparativement à celui en oxyde d'aluminium. Pour ce dernier, plusieurs MPs ingérés de $1 \mu\text{m}$ ont été caractérisés avec succès. En outre, le bruit de fond du signal Raman émis par le filtre en polycarbonate ne permettait pas d'analyser les particules plastiques dans la plage de taille cible de $1-10 \mu\text{m}$ que nous avons fixée dans notre étude. Par conséquent, le filtre en oxyde d'aluminium a été sélectionné pour la détection des MPs sur des individus collectés *in situ* (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Tableau résumé des différents types de filtres testés (excepté pour celui en cellulose) et des possibilités offertes pour la détection de MPs après marquage au Nile Red et observation au microscope à épifluorescence. Également pour la détection et caractérisation chimique par microspectroscopie Raman des MPs ingérés par *E. affinis* provenant du milieu naturel.

Type de filtre	Detection visuelle facile	Possibilité de coupler épifluorescence et microspectroscopie Raman	Limite de détection avec la microspectroscopie Raman
Cellulose	Non testée ^a		
Paper	Non		
Glass fiber Black	Non		
Polycarbonate	Oui	Oui	$> 10 \mu\text{m}$
Aluminum oxide	Oui	Non	$> 1 \mu\text{m}$

^aType de filtre exclu du fait du fort signal de la cellulose émis par microspectroscopie Raman

3.4. Premières estimations de la contamination en MPs d'*Eurytemora affinis* en Estuaire de Seine

Au total, 17 microplastiques, soit une moyenne de 0,28 MPs/individu, ont été identifiés parmi les 60 copépodes analysés (3 répliques de 20 individus) échantillonnés dans l'Estuaire de Seine (Tableau 1.2). Huit types différents de polymères ont été caractérisés, à l'exception d'une fibre eu égard à l'intensité de la fluorescence qui masquait le signal Raman.

Tableau 1.2 : Moyenne (\pm EC), minimum et maximum des tailles de MPs ingérés par le copépode *E. affinis* échantillonné dans la zone « La Bouille » de l'estuaire de la Seine.

Forme	Moyenne (μm)	EC ^a (μm)	Min. (μm)	Max. (μm)
Fragment	13.3	9.6	2.1	33.3
Fibre (longueur)	391.6	600.4	21.9	1726.0
Fibre (diamètre)	14.1	9.5	2.1	21.8

^a: EC : Ecart-type

Le polystyrène (PS) a été le polymère le plus couramment identifié avec cinq éléments, suivi du polyéthylène haute densité (HDPE), du polypropylène (PP), du polycarbonate (PC), et du polyéthylène téréphtalate (PET) avec deux particules pour chaque type. Enfin, nous avons trouvé une particule d'un copolymère composé de polyamide (PA) et d'acétate de polyvinyle (PVAC) (Annexe 1.1), et aussi une particule pour le polyamide et le polyéthylène basse densité (LDPE). En ce qui concerne la forme des éléments, aucune microbille n'a été observée. Les fibres étaient la forme prédominante (59%) suivie des fragments (41%). Le bleu, le noir et le rose étaient les couleurs les plus identifiées avec respectivement six, cinq et trois particules, suivies du rouge, de l'orange et du translucide avec une particule pour chacune. Concernant le blanc utilisé comme témoin de la possible contamination atmosphérique durant les expérimentations, aucun MPs n'a été détecté sur celui-ci durant l'analyse par microspectroscopie Raman.

4. Discussion

4.1. Détection des MPs avec coloration au Nile Red chez les copépodes de cultures de masse

La méthode de marquage utilisant le Nile Red dans l'acétone, précédemment développée dans la littérature (Cole, 2016), nous a permis de marquer et d'observer avec une lumière bleue les polymères lorsqu'ils étaient seuls ou en mélange dans le tractus digestif d'individus adultes d'*E. affinis*. Cela nous a permis de démontrer la capacité physiologique de cette espèce à ingérer des MPs de taille comprise entre 1 et 10 μm . Nos observations ont confirmé la nature solvatochromique du Nile Red qui nous a permis de discriminer les polymères les plus courants (PE, PS, et PP) ainsi que le PLA sur la base de leurs caractéristiques de polarité de surface (Maes *et al.*, 2017). Cette méthode de marquage des MPs avant ingestion par le copépode a fourni des informations cruciales sur l'écotoxicité des MPs chez le modèle copépode, avec notamment des effets sur l'accumulation de lipides, l'alimentation, la sélectivité alimentaire ou la densité fécale (Cole *et al.*, 2019 ; Coppock *et al.*, 2019) et pourrait être clairement appliquée à l'avenir à *E. affinis*. Cette méthode pourrait permettre pour mieux comprendre l'interaction entre les MPs et cette espèce dans l'environnement estuarien. De plus, nous avons démontré la capacité du Nile Red à marquer un polymère biosourcé (PLA) et à le détecter dans le

tractus digestif d'*E. affinis*. Cela pourrait conduire à l'étude d'autres impacts de polymères biosourcés et/ou biodégradables sur les traits de vie du modèle copépode.

Cependant, nos résultats ont souligné le fait que le marquage des MPs au Nile Red ne peut être utilisé pour quantifier avec précision les fragments de plastique dans le tractus digestif d'*E. affinis*. De plus, le marquage des MPs après ingestion par les copépodes ne se révèle pas efficace en raison de la grande affinité du Nile Red pour les gouttelettes lipidiques des copépodes (Song Y. S. *et al.*, 2015). Cette méthode ne pouvait donc pas être appliquée directement sur des copépodes provenant du milieu naturel. Ainsi, nous avons suggéré que la digestion des copépodes était une étape nécessaire lorsque des résultats quantitatifs ou une caractérisation chimique des polymères sont nécessaires, comme pour les individus échantillonnés à l'état sauvage.

4.2. Efficacité du protocole de digestion et cas spécifique du polylactide

En ce qui concerne les études sur les compartiments biotiques ou abiotiques, il n'existe pas de protocole standardisé et de consensus pour la digestion des matières organiques et l'isolement des MPs. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le KOH ont été les traitements chimiques les plus utilisés à cette fin (Renner *et al.*, 2018; Kazour *et al.*, 2019). Dans le cas des copépodes, la plupart des études ont utilisé un traitement de digestion à l'acide nitrique (HNO₃) développé par Desforges *et al.* (2015). Dans notre étude, nous avons utilisé une digestion enzymatique avec la Protéinase K en raison de sa capacité à minéraliser les tissus biologiques sans endommager les microplastiques de petite taille (Cole *et al.*, 2014). De plus, Claessens *et al.* (2013) ont montré que des acides minéraux forts comme le HNO₃ peuvent oxyder, endommager ou détruire les MPs provenant de plastiques à faible tolérance au pH tels que le PS ou le Polyamide (PA) et peuvent ainsi conduire à une sous-estimation des MPs. Après l'incubation des échantillons avec la Protéinase K, 100% du matériel organique du copépode a été digéré durant nos essais. Malgré l'agitation constante pendant cette étape, les cuticules semblaient intactes pour 90% des individus et engendraient une difficulté supplémentaire pour détecter les MPs libérés du tractus digestif des copépodes. Cependant, l'étape supplémentaire de passage aux ultrasons pendant 20 minutes a résolu ce problème et les cuticules étaient présentes sous forme de petits fragments sur le filtre après filtration sous vide, permettant d'identifier directement les MPs avec la microscopie à épifluorescence ou la microspectroscopie Raman.

Il est important de garder à l'esprit que nos expérimentations de digestion des copépodes contaminés aux MPs de PLA ont démontré une digestion complète des particules de ce polymère. Une étude précédente sur les films de copolymères (10 mm x 10 mm x 0,4 mm) a montré la capacité de la protéinase K à dégrader les unités L-lactyle par rapport aux unités D-lactyle (Li *et al.*, 2000). Étant donné que le PLA représente l'une des meilleures alternatives pour remplacer certains plastiques non

biodégradables, notamment le polypropylène (European Bioplastics, 2018), des recherches futures sont nécessaires pour étudier correctement le devenir de ce plastique sur des échantillons de copépodes prélevés *in situ* afin de potentiellement ne pas sous évaluer les niveaux d'imprégnation du PLA.

4.3. Possibilités d'identification des MPs via l'utilisation de filtres membrane noirs en polycarbonate

Ce type de filtre couplé à un marquage au Nile Red (solubilisé dans le n-hexane) a été utilisé dans le passé pour détecter des MPs présents dans des échantillons d'eau et de sable (Shim *et al.*, 2016). Les auteurs ont souligné la facilité relative de détection des MPs lors de l'observation par épifluorescence en raison de la surface homogène et du fond noir de ce filtre. Dans notre étude, cette méthode a été efficace pour détecter les MPs de copépodes contaminés et digérés. Contrairement aux tests effectués auparavant sur la carapace d'Amphipode (Shim *et al.*, 2016), les fragments de cuticule dans notre étude ont été marqués, montrant un motif de fluorescence vert clair lors de l'observation au microscope à épifluorescence. Dans le cas de figure où les fragments de chitine restants pourraient poser un problème pour l'identification des MPs, le recours à la chitinase peut être évalué (Cole *et al.*, 2014).

Cette première étape de détection des microplastiques ne peut pas donner précisément la nature polymérique des MPs. Elle peut être considérée comme une méthode préliminaire visuelle simple et utile pour détecter rapidement les MPs suspectés et cibler directement les zones de présences pour une caractérisation chimique ultérieure via la microspectroscopie Raman. En effet, nos résultats ont montré que le filtre membrane en polycarbonate noir peut représenter une bonne option pour coupler le marquage au Nile Red, la microscopie à épifluorescence et la spectroscopie Raman. Cependant, ce filtre est limité par un seuil de détection relativement élevé des MPs. En outre, dans notre cas, l'utilisation du filtre en polycarbonate noir a conduit à une limite d'identification par micro-Raman évaluée à 10 µm en raison de la forte fluorescence émise par le matériau du filtre.

4.4. Cas du filtre en oxyde d'aluminium : diminution de la limite d'identification des MPs par microspectroscopie Raman

Le filtre d'oxyde d'aluminium a été testé par le passé sur des MPs vierges (4–50 µm) pour détecter la contamination aérienne de ce contaminant. Il a démontré un signal Raman d'intensité globalement faible, une détection visuelle claire des MPs suspects sur le filtre, mais n'a pas permis aux auteurs de cartographier les MPs en utilisant le mode Streamline (mode d'analyse automatique d'un logiciel associé au microspectroscope Raman), contrairement aux filtres à membrane d'argent et aux filtres

en cellulose mélangée (Wright *et al.*, 2019) avec un laser de 785 nm. Contrairement à cette dernière conclusion, nous avons pu identifier des MPs vierges de PS et PE dans une plage de taille de 1–10 µm avec ce type de filtre. Cela pourrait être dû à la longueur d'onde relativement élevée utilisée dans cette étude. En effet, lors de notre analyse, nous avons remarqué qu'en diminuant la longueur d'onde de 785 nm à 532 nm, cela conduisait généralement à un résultat de spectre identifiable avec beaucoup moins de bruit de fond pour les MPs de quelques microns.

Wright *et al.* (2019) ont également signalé des bandes d'intensité plus faibles des MPs de PS en raison d'interférences lorsque des filtres en cellulose sont utilisés. Cela peut conduire à une sous-estimation des MPs de PS lorsque la microspectroscopie Raman est utilisée pour les identifier, en particulier pour détecter les microplastiques ingérés par le modèle copéode (Sun *et al.*, 2018a).

4.5. Validation d'une méthode complète sur les échantillons environnementaux de copépodes

Nos résultats sur les copépodes provenant de culture de masse ont montré que cette méthode représentait la meilleure option pour caractériser les microplastiques de quelques microns avec la microspectroscopie Raman comme méthode finale. Afin de diminuer le temps d'analyse, la méthode de fluorescence a été remplacée par une inspection visuelle avec une loupe binoculaire.

Afin de valider notre méthodologie sur les copépodes sauvages, 60 individus ont été digérés et étudiés. Avec 94,1% de microplastiques suspectés pour lesquels le polymère a été clairement identifié avec une taille minimale de 2,1 µm, nous avons pu supposer que le filtre en oxyde d'aluminium représentait une solution appropriée pour l'identification manuelle des MPs par microspectroscopie Raman. De plus, cette méthodologie a démontré une limite de caractérisation des MPs bien inférieure à celle constatée de 7µm chez le modèle copéode dans la littérature (Sun *et al.*, 2018a).

Gasperi et Cachot (2021) ont étudié les niveaux de contamination des MPs dans l'estuaire de la Seine à la même station d'échantillonnage que celle des copépodes étudiés dans cet article. Bien qu'ils aient concentré leurs recherches sur la fraction >50 µm, ils ont signalé dans la station échantillonnée étudiée une concentration de 5 MP/m³ avec trois formes : principalement des fragments, des microbilles et des fibres. Dans notre étude, nous avons montré que les fibres étaient la forme la plus ingérée suivie des fragments, avec respectivement 59% et 41%. La différence d'abondance de la forme fibreuse dans le compartiment abiotique comparé à nos résultats sur le biote peut être expliquée par la taille de maille relativement élevée de 300 µm utilisée qui ne permet pas de capturer correctement les petites fibres. De plus, un échantillonnage ponctuel avec une taille de maille de 80 µm a montré une densité plus élevée de MPs sous forme de fibres dans cette étude. La plupart des études sur la contamination en MPs des copépodes prélevés *in situ* ont également signalé la forme fibre comme étant la forme prédominante ingérée (Sun *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2018a; Sun *et al.*, 2018b; Zheng *et al.*, 2021).

Concernant les polymères identifiés, nos résultats sont cohérents avec ceux identifiés dans l'estuaire de la Seine (Gasperi et Cachot, 2021). De plus, cette étude et la nôtre ont démontré une dominance du PE, du PS, du PP et du PET par rapport aux autres polymères.

Avec une rétention moyenne de 0,28 MPs par individu, nos résultats ont montré une concentration plus élevée de MPs ingérés chez les individus d'*E. affinis* de l'estuaire de la Seine comparativement à d'autres études similaires où les concentrations variaient de 0,03 MPs/individu dans le nord-est de l'océan Pacifique (Desforges *et al.*, 2015) à 0,26 MPs/individu dans la baie de Jiaozhou — mer Jaune (Zheng *et al.*, 2021). Pour ces deux dernières études, la contamination en MPs de la colonne d'eau n'a pas été étudiée, il est donc difficile de conclure si cette différence peut être expliquée par le niveau d'imprégnation en MPs de la colonne d'eau ou par la limite de détection des MPs. Cependant, Md Amin *et al.* (2020), ont effectué une analyse de la contamination en MPs à la fois dans l'eau avec des conditions d'échantillonnage proches de Gasperi et Cachot (2021) et les copépodes. Les résultats des MPs dans l'eau variaient de 0,3 à 1,45 MPs/L et une moyenne de 0,13 MPs/individu a été reportée chez les copépodes calanoïdes analysés avec une limite de détection de 100 µm par FTIR. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'avec des concentrations entre 60 et 290 fois plus élevées dans l'eau dans l'étude de Md Amin *et al.* (2020) par rapport à celle établie dans l'estuaire de la Seine par Gasperi et Cachot (2021), la concentration de MPs ingérés par les copépodes dans cette première étude aurait pu être plus élevée, car les mesures ont également été réalisées sur des espèces calanoïdes, ainsi donc proches d'*E. affinis*. En conclusion, nous avons développé dans cette étude une nouvelle méthodologie pour identifier les MPs ingérés par les copépodes avec une nouvelle limite de détection de 1 µm. La digestion enzymatique était le premier point critique développé pour assurer une dégradation correcte des organismes sans risque de dégrader les polymères potentiels. Nos résultats sur les copépodes cultivés et sauvages indiquent la capacité de la protéinase K couplée à un passage aux ultrasons afin de digérer correctement les copépodes pour la caractérisation des MPs sans causer de dommages aux polymères classiques à faible tolérance au pH. Cependant, l'utilisation de cette enzyme a conduit à une digestion totale des fragments de PLA dans nos conditions. Des études futures devraient être menées pour mieux connaître la tolérance d'autres polymères biosourcés ou biodégradables aux protocoles de digestion chimique ou enzymatique utilisés pour étudier la contamination biotique ou environnementale par les MPs. Nous avons démontré que l'utilisation du filtre d'oxyde d'aluminium pour l'analyse par microspectroscopie Raman permet d'atteindre une limite de taille de 1 µm pour la caractérisation des MPs chez les copépodes, ce qui est bien inférieur à ce qui est trouvé dans la littérature actuelle. Notre approche semble prometteuse afin de mieux estimer l'imprégnation des MPs dans des organismes clés comme les copépodes.

**Chapitre II. Exposition
multigénérationnelle du
microbiote d'*E. affinis*
(copépode) aux
microplastiques : étude
comparative entre
microplastiques
biodégradables (PBAT) et non
biodégradables (LDPE)**

Résumé

L'accumulation de débris plastiques dans le monde, en particulier dans les environnements marins, a été bien documentée au cours des dernières décennies. Des études récentes ont découvert que les surfaces des microplastiques (MPs) peuvent être utilisées par des micro-organismes comme substrats pour former un écosystème appelé "plastisphère". Certains micro-organismes présents sur les MPs sont capables de produire des enzymes les dégradant. De plus, les MPs peuvent également servir de vecteurs et transporter des micro-organismes (y compris potentiellement pathogènes) vers des niveaux trophiques supérieurs via leur ingestion par des animaux. Dans cette étude, les impacts sur le microbiote du copépode *Eurytemora affinis* lors d'une exposition chronique multigénérationnelle aux MPs ont été étudiés en exposant les copépodes à un polymère à usage unique classique (polyéthylène basse densité (LDPE)) et à un polymère biodégradable (polybutylène adipate téréphtalate (PBAT)). Les copépodes ont été exposés à des MPs "vierges" et "vieillis" pendant quatre générations à une concentration environnementale de 300 µg/L, suivie d'une génération de "détoxification" sans exposition aux MPs. Les impacts de l'exposition aux MPs sur le microbiote des copépodes ont été étudiés en utilisant le séquençage à haut débit de l'ARNr 16S. Les résultats de l'analyse NMDS (nonmetric multidimensional scaling) ont montré que les copépodes (avec ou sans exposition aux MPs) portaient un microbiote distinct par rapport aux communautés microbiennes de l'eau du milieu expérimental et de la microalgue utilisées pour le nourrissage des copépodes. Selon les résultats de l'analyse PERMANOVA (Analyse de la variance par permutations), le microbiote des copépodes exposés aux MPs (PBAT et LDPE) était significativement différent de celui des copépodes non exposés pendant les générations une à quatre. Cependant, après la "détoxification", aucune différence significative dans la composition du microbiote n'a été observée parmi toutes les conditions de la cinquième génération. En somme, des impacts sur la composition du microbiote d'*E. affinis* lors de l'exposition aux MPs sur plusieurs générations ont été observés, indépendamment de l'origine du plastique (biodégradable ou non) et du vieillissement des MPs. De plus, il semble que le microbiote des copépodes revienne à sa structure originale dès que l'exposition aux MPs s'arrête.

Mots clés : microplastics, microbiota, copepod, *Eurytemora affinis*, séquençage haut débit, LDPE, PBAT

1. Introduction

En raison de leurs nombreuses utilisations dans la société moderne, notamment dans l'emballage, le secteur de la construction, l'industrie automobile, et plus encore, la production mondiale de plastiques à base de pétrole augmentait chaque année avant la crise du coronavirus (COVID) en 2020 (Plastics, 2021). Même si les installations de recyclage et la valorisation énergétique progressent et réduisent les décharges de plastique, 6,9 millions de tonnes de plastiques sont restées stockés dans des décharges en 2020 (Plastics Europe, 2021) dans les États membres et les pays candidats de l'Union européenne (UE27 + 3). De plus, Geyer *et al.* (2017) ont estimé que 60 % de tous les plastiques produits au fil du temps s'accumulent dans les décharges et les océans. Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont démontré l'impact écologique de ce polluant qui cause la mort de nombreux organismes marins situés à des niveaux trophiques supérieurs, tels que les poissons (Romeo *et al.*, 2015), les oiseaux marins (Tanaka *et al.*, 2013) ou les mammifères marins (Laist, 1997 ; Lusher, 2015). À l'heure actuelle, la principale solution proposée et mise en œuvre pour éviter cette pollution mondiale est le remplacement de certains plastiques à usage unique persistants par des plastiques biodégradables tels que le polybutylène adipate téréphtalate (PBAT) ou l'acide polylactide (PLA), dont leur durabilité dans l'environnement est considérée comme limitée. Cependant, l'évaluation globale des impacts écotoxicologiques de ces bioplastiques émergents sur les écosystèmes marins ne demeure pas suffisamment documentée (Ali *et al.*, 2023).

Lorsqu'ils pénètrent dans les mers, les débris de plastique subissent une dégradation physique et mécanique, notamment associée à la photo-dégradation, l'oxydation, l'abrasion (Andrady, 2011), et le *biofouling* en moins de 24 heures (Sheavly and Register, 2007). Ces phénomènes conduisent à la fragmentation des débris de plastique en microplastiques et nanoplastiques (Peng *et al.*, 2020). Les microplastiques (MP) (<5 mm) représentent la partie cachée et la majorité de la pollution plastique (Lindeque *et al.*, 2020). En raison de leurs propriétés (taille réduite, abondance, variété de densité, etc.), les MPs peuvent affecter un large éventail d'organismes, résidents des niveaux trophiques inférieurs tels que le phytoplancton (Li S. *et al.*, 2020) et les copépodes (Cole *et al.*, 2015 ; They *et al.*, 2022) mais aussi occupant les niveaux trophiques supérieurs tels que la moule bleue *Mytilus edulis* (Von Moos *et al.*, 2012 ; Li L.-L. *et al.*, 2020) ou même les humains à travers la consommation de produits de la mer (Wright *et al.*, 2013). Chez le copépode, des études ont montré que l'ingestion de MPs peut induire un stress oxydatif (Jeong *et al.*, 2017) ou modifier le protéome (Zhang *et al.*, 2019), pouvant entraîner une réduction du taux de survie et de fécondité (Lee *et al.*, 2013 ; Cole *et al.*, 2015). Lorsqu'ils sont ingérés puis excrétés par les copépodes, les MPs peuvent modifier la solidité, le volume et la densité des fèces (Cole *et al.*, 2016 ; Coppock *et al.*, 2019). Le sort des fèces dans l'environnement naturel est déterminé par leur vitesse de sédimentation, les conduisant généralement

au fond de la colonne d'eau. Les modifications des propriétés des fèces impactées par les MPs, peuvent affecter ce mécanisme naturel et exercer une influence sur les cycles du carbone et des nutriments (Cole *et al.*, 2016).

Des études antérieures ont montré que les MPs peuvent être colonisés par les premières communautés bactériennes seulement quelques heures après leur entrée dans l'environnement marin (Sheavly and Register, 2007 ; Dang *et al.*, 2008 ; Lobelle and Cunliffe, 2011 ; Jacquin *et al.*, 2019). Ces communautés s'organisent sous forme de biofilms (Oberbeckmann *et al.*, 2015) qui peuvent être nommés « plastisphères » (Zettler *et al.*, 2013). Les MPs offrent un support et une protection aux micro-organismes dans la plastisphère (Muthukumar *et al.*, 2011), y compris des espèces potentiellement pathogènes telles que *Vibrio sp.* (Zettler *et al.*, 2013). Par conséquent, l'ingestion de tels MP « porteurs de plastisphère » peut introduire des communautés microbiennes étrangères chez les animaux et avoir des impacts sur leur microbiote. Le microbiote joue un rôle clé dans le maintien de la santé des hôtes (Man *et al.*, 2017). Ainsi donc, un microbiote déséquilibré peut conduire à une plus grande susceptibilité aux maladies (de Steenhuijsen Piters *et al.*, 2022). Récemment, des chercheurs ont commencé à étudier les effets des MPs sur le microbiote intestinal et les excréments de modèles animaux. Des études ont montré que l'exposition aux MPs contribuait significativement à la diminution des familles bactériennes impliquées dans le cycle de l'azote et la décomposition de la matière organique dans le tube digestif des oligochètes (Zhu *et al.*, 2018) et induisait une dysbiose⁴ dans l'intestin des poissons zèbres (Qiao *et al.*, 2019). L'exposition aux MPs semble également affecter la richesse et la diversité bactérienne dans le microbiote intestinal et les excréments des souris (Lu *et al.*, 2018) et modifier le microbiote des moules bleues, ce qui pourrait entraîner une augmentation de l'abondance de pathogènes humains potentiels (Li L.-L. *et al.*, 2020). Complémentaire à ces découvertes, notre étude se distingue en prenant en considération à la fois les MPs biodégradables et non biodégradables ainsi que leurs impacts sur le microbiote du copépode *E. affinis* tout au long d'une expérience multigénérationnelle. Dans l'ensemble, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'ingestion de MPs, en particulier de MPs avec des plastisphères, pourrait induire une dysbiose du microbiote des copépodes, ce qui pourrait potentiellement affecter les traits de vie des individus.

Le copépode est considéré comme un organisme modèle en écotoxicologie (Kwok *et al.*, 2015) car il représente un groupe largement réparti dans tous les écosystèmes aquatiques (Turner, 2004), et certaines espèces peuvent être cultivées en laboratoire. Des études antérieures ont démontré la toxicité aiguë et sublétales des MPs chez les copépodes lors d'une exposition de quelques jours à des concentrations élevées (Lee *et al.*, 2013 ; Cole *et al.*, 2015). Compte tenu du cycle de vie relativement

⁴ Dysbiose : déséquilibre de la structuration des communautés bactériennes.

court des copépodes, il convient d'examiner les effets des MPs lors d'expositions à long terme à des concentrations environnementales réalistes en utilisant une approche multigénérationnelle. Par exemple, Zhang *et al.* (2019) ont étudié les effets multigénérationnels de microbilles de polystyrène sur la plasticité du protéome du copépode marin *Tigriopus japonicus* sur trois générations (deux exposées aux MPs et une de détoxification). L'espèce de copépode d'intérêt dans cet article, *Eurytemora affinis*, a déjà été étudiée concernant les effets multigénérationnels de la variation de facteurs naturels tels que la température et la salinité (Souissi *et al.*, 2021) et les effets de polluants tels que les métaux traces et les sédiments contaminés (Das *et al.*, 2020 ; Das *et al.*, 2022). Cependant, les études concernant le microbiote des copépodes sont relativement rares. La plupart des études existantes se sont concentrées sur la relation spécifique entre les copépodes et *Vibrio sp.* (Heidelberg *et al.*, 2002 ; Huq *et al.*, 2005).

Dans cette étude, nous avons examiné les effets des MPs sur le microbiote d'*E. affinis* sur plusieurs générations lors d'une exposition chronique aux MPs à une concentration environnementalement réaliste. Deux types de MPs, de plastique biodégradable (PBAT) et de plastique non biodégradable (LDPE), ont été sélectionnés pour l'expérience d'exposition. De plus, la notion de vieillissement des MPs a été utilisée pour étudier les impacts potentiels sur le microbiote des copépodes, non seulement par les MPs eux-mêmes, mais aussi par les micro-organismes (pouvant inclure des agents pathogènes potentiels) qui étaient attachés aux MPs durant le vieillissement. Le séquençage à haut débit de l'ADNr 16S a été employé pour analyser les impacts de l'exposition aux MPs sur le microbiote des copépodes. À notre connaissance, il s'agit de la première étude examinant les effets de l'exposition aux MPs sur le microbiote du copépode sur plusieurs générations.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériel biologique

Les cultures du modèle *E. affinis* utilisées pour cette étude ont été prélevées à partir d'échantillons de copépodes sauvages en septembre 2014 dans la zone oligo- mésohaline de l'estuaire de la Seine (Michalec *et al.*, 2017 ; Das *et al.*, 2020). Un protocole spécifique avec des conditions contrôlées (salinité à 15 PSU, température constante à 19°C et une photopériode de 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité) a été développé (Souissi *et al.*, 2016) pour maintenir la culture de masse et fournir des individus standardisés pour les études écotoxicologiques (Das *et al.*, 2020). Pour cette expérience, une culture de copépodes maintenue dans 300 litres, généreusement alimentée avec la microalgue *Rhodomonas sp.*, a été lancée 1 mois avant le début de l'expérience afin d'assurer la bonne acclimatation des copépodes.

2.2. Microplastiques

Pour cette étude, le PBAT a été sélectionné pour représenter les plastiques biodégradables et le LDPE pour les plastiques non biodégradables. Des granules de LDPE (code produit : BM50, EXXONMOBIL™, Dallas, États-Unis) et de PBAT (code produit : Ecoflex F blend C 1200, distribué par B-Plast 2000, BASF, Ludwigshafen, Allemagne) ont été broyés par cryobroyage (CRYOMILL, RETSCH®, Hann, Allemagne) en MPs dans une plage de taille de 1 à 10 µm. En effet, il a été précédemment démontré que les individus d'*E. affinis* ingéraient des MPs de moins de 10 µm (They *et al.*, 2022). La plage de taille de chaque échantillon de MPs a été confirmée par diffusion dynamique de la lumière (Mastersizer 2000, Malvern Panalytical, Malvern, Royaume-Uni). Les MPs ont été préparés individuellement pour chaque réplica dans des flacons stérilisés de 10 mL (540 µg de MPs par flacon).

Pour préparer les MPs vieillis, 540 µg de MPs ont été mélangés avec 10 mL d'eau à 15 PSU (eau de mer filtrée à 25 µm diluée avec de l'eau déminéralisée pour obtenir une salinité de 15 PSU) dans des piluliers et incubés à 19°C avec une photopériode de 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité sur un agitateur rotatif à 200 tr/min pendant 45 jours. Chaque flacon était recouvert d'un couvercle percé pour permettre l'échange d'air et prévenir au maximum la contamination/évaporation.

2.3. Approche expérimentale

Pendant quatre générations successives, les copépodes ont été exposés à cinq conditions : témoin (sans MPs), PBAT vierge, PBAT vieillis, LDPE vierge et LDPE vieillis (chacun en triplicata), suivies de la cinquième génération sans exposition aux MPs pour la détoxification. Pour chaque génération, les copépodes étaient maintenus dans un bécher de 2 L rempli de 1,8 L d'eau à 15 PSU avec un flux d'air constant assuré par une pipette en verre et un système de bullage servant également pour lutter contre la sédimentation des MPs. Au cours des cinq générations, les copépodes étaient nourris tous les 2 jours avec 10 mL de microalgues *Rhodomonas sp.* (Dayras *et al.*, 2021). Des protocoles précédemment établis (Souissi *et al.*, 2010 ; Souissi *et al.*, 2016) ont été suivies afin de préparer les cultures de microalgues et nourrir les copépodes. Afin d'avoir des copépodes dans des stades de développement synchronisés, un protocole spécifique a été suivi (Das *et al.*, 2020). En outre, pour démarrer chaque génération de copépodes, chaque bécher était muni d'un pondeur et rempli de 1,8 L d'eau à 15 PSU fraîchement préparée. Un total de 30 femelles ovigères provenant de la culture en masse étaient ajoutées à la suite. Après 2 à 3 jours et éclosion des œufs, les nauplii avaient la possibilité de traverser la maille de 200 µm du pondeur pour sédimenter au fond du bécher. À ce moment-là, les femelles non ovigères étaient retirées avec les pondeurs, puis les échantillons de

microplastiques étaient ajoutés selon les conditions respectives (concentration finale de 300 µg/L de MPs). Cette concentration finale était considérée comme réaliste par rapport au milieu naturel eu égard à une publication précédente (Paul-Pont *et al.*, 2018) sur la présence et la concentration des microplastiques dans différentes études en milieu marin. Après l'éclosion et le développement des stades larvaires en adultes (10 à 15 jours), les copépodes de chaque réplica étaient récoltés avec une maille de 33 µm. Pour démarrer la génération suivante, 30 femelles ovigères étaient sélectionnées parmi chaque cohorte et ajoutées dans leurs béciers respectifs après le renouvellement de l'eau à 15 PSU. Les copépodes restants étaient brièvement fixés avec de l'éthanol à 70 % et abondamment rincés à l'eau stérilisée MilliQ.

2.4.Extraction des ADN, préparation des librairies des ADNr 16S, séquençage et préparation des séquences

Un total de 50 individus adultes (y compris mâles, femelles et femelles ovigères) étaient collectés de manière aléatoire et stockés dans des microtubes de 1,5 mL à -20°C en attendant l'extraction de l'ADN du microbiote. À la fin de chaque génération, après l'isolement des copépodes, les échantillons d'eau de chaque bécier étaient filtrés à travers des unités de filtration Sterivex de 0,22 µm (Millipore, Burlington, MA, États-Unis). Puis les filtres étaient stockés à -20°C. Les cultures de microalgues destinées à l'alimentation des copépodes ont également été échantillonnées au cours de l'exposition multigénérationnelle (200 µL par filtre, une fois par génération, des générations un à quatre) en utilisant des filtres Sterivex, puis stockées à -20°C. Avant l'extraction de l'ADN, les copépodes ont d'abord été broyés et homogénéisés à l'aide de micro-pilons stériles à usage unique. Pour les échantillons d'eau et de microalgues, les filtres étaient sortis des unités Sterivex puis découpés et placés dans des microtubes de 1,5 mL. Pour tous les échantillons, l'ADN total a été extrait à l'aide du kit QIAamp PowerFecal Pro DNA (Qiagen, Hilden, Allemagne), en suivant les instructions du fabricant. La bibliothèque d'amplicons 16S a été préparée par amplification de la région V3-V4 du gène de l'ARN ribosomal 16S bactérien à l'aide des amorces 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') et 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). La polymérase Phusion™ High-Fidelity DNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) a été utilisée pour la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivant les instructions du fabricant. Les produits de PCR ont été examinés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %, et purifiés avec le kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Allemagne). La quantification de l'ADN extrait a été réalisée à l'aide du kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) et du fluorimètre Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). La deuxième PCR, pour fixer les codes-barres pour le multiplexage des échantillons, et le séquençage

ont été réalisés par Eurofins Genomics (Germany GmbH). Enfin, le traitement des séquences a été effectué en suivant les méthodes utilisées dans une publication précédente du groupe (Li L.-L. *et al.*, 2020). En bref, les séquences d'ADNr ont été analysées selon la procédure standard (https://mothur.org/wiki/miseq_sop/) (Schloss *et al.*, 2011) du programme MOTHUR v1.47.0 (Kozich *et al.*, 2013). Tout d'abord, les séquences ont été extraites et triées par échantillon en fonction de leur étiquette d'index, puis traitées pour un filtrage de qualité (élimination des chimères, des singletons et des séquences erronées). Les séquences de haute qualité restantes ont été affectées à des unités taxonomiques opérationnelles (OTU) à un seuil de similarité de 97 % (Behnke *et al.*, 2011). Après normalisation de l'ensemble de données, la séquences des OTU a été recherchée dans la base de données SILVA (version 138, <http://www.arb-silva.de/>) (Quast *et al.*, 2012) à l'aide de BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) pour l'affiliation taxonomique. Les données de séquençage ont été soumises à la base de données d'archives de séquences NCBI (SRA accession: PRJNA980077).

2.5. Analyses statistiques et représentations graphiques

Les indices de dissimilarité des assemblages microbiens ont été calculés en utilisant la méthode de Bray-Curtis comme indice de dissimilarité avec une normalisation de l'abondance des séquences d'OTU en utilisant R Studio avec le package "vegan" (Dixon, 2003). Une analyse de regroupement hiérarchique a été réalisée avec la méthode de Ward en utilisant le package "Cluster" (Maechler *et al.*, 2013). Les résultats ont ensuite été représentés dans un dendrogramme à l'aide des packages "factoextra" (Kassambara and Mundt, 2017) et "RcolorBrewer" (Neuwirth and Neuwirth, 2011). L'analyse multidimensionnelle non métrique (NMDS) et l'analyse de variance par permutations (PERMANOVA-Adonis) ont été réalisées à l'aide du package "vegan" (Dixon, 2003). Les tests ADONIS post-hoc ont été effectués à l'aide du package "pairwiseAdonis" (Teng *et al.*, 2018). Les estimateurs de la diversité alpha (diversité - Simpson et Shannon ; richesse - Chao 1 ; et dominance - Equitabilité) ont été calculés à l'aide du logiciel Past 4.03 (Hammer *et al.*, 2001) pour chaque réplica de chaque traitement. Les valeurs ont ensuite été moyennées pour chaque traitement et la distribution des valeurs d'index a été représentée sous forme de boîtes à moustache à l'aide du package "ggplot2". Les éventuelles différences significatives dans les estimateurs de la diversité alpha entre les conditions de chaque génération ont été évaluées à l'aide d'une ANOVA à un facteur ou d'une analyse de variance à un facteur de Kruskal-Wallis, en fonction des résultats de normalité et d'homoscédasticité des variances avec le logiciel R. Une valeur-p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1. Analyse des séquences des ARNr 16S

Avant contrôle qualité et normalisation entre les échantillons, un total de 4 053 284 séquences a été obtenue. Après normalisation et exclusion des singletons, un total de 264 178 séquences de haute qualité ($10\,567 \pm 3\,938$ séquences par échantillon) correspondant à 7 540 OTUs ont été identifiées pour le microbiote des copépodes au cours de l'exposition multigénérationnelle. Dans les échantillons d'eau collectés à la fin de chaque génération, 2 532 OTUs (710 ± 171 OTUs par échantillon) ont été trouvées, tandis que seulement 395 OTUs (176 ± 34 OTUs par échantillon) ont été détectés chez la microalgue *Rhodomonas sp* lors des différents prélèvements. Sur les cinq générations, le microbiote des copépodes en condition témoin était composé de 994 ± 203 OTUs (Figure 2.1). Respectivement, le microbiote des copépodes partageait 113 ± 32 OTUs avec les communautés microbiennes des échantillons d'eau (représentant 6,7 % du microbiote des copépodes) et 47 ± 21 OTUs avec les communautés de la microalgue (2,85 %) (Figure 2.1). Tout au long des cinq générations, le nombre d'OTUs partagées entre les trois matrices est resté similaire.

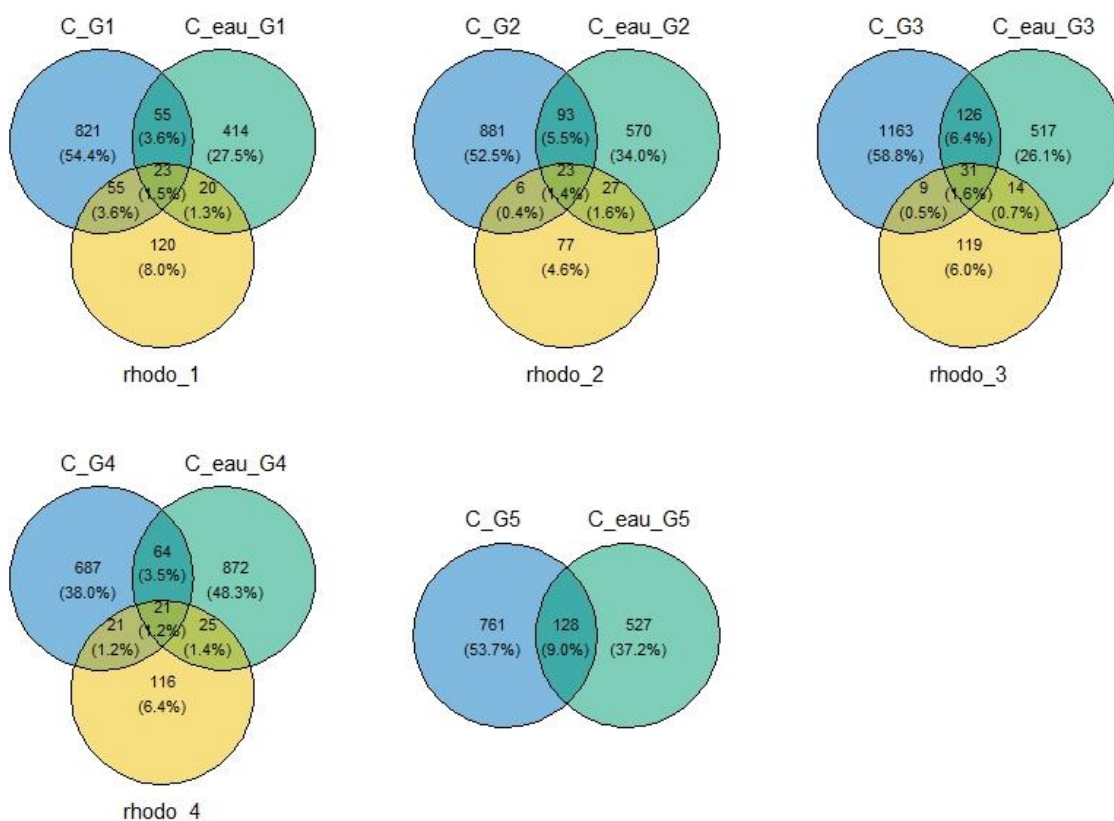


Figure 2.1 : Diagramme de Venn des OTUs partagées entre le microbiote des copépodes en conditions contrôles, l'eau et l'algue utilisée comme nourriture pour les copépodes. L'algue n'a pas été échantillonnée durant la dernière génération. C : microbiote des copépodes en conditions non contaminées en MPs ; C_eau : eau utilisée pour démarrer chaque génération et échantillonnée à la fin ; rhodo : microalgue rouge *Rhodomonas sp.* utilisée pour nourrir les copépodes ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après They *et al.* (2023).

3.2. Effets des MPs sur les indices de diversité alpha du microbiote des copépodes

Les estimateurs de la diversité alpha n'ont montré aucune différence significative dans les communautés bactériennes entre les traitements sur les cinq générations pour les indices de Simpson, Shannon et d'Equitabilité (Figure 2.2). Deux différences significatives ($p = 0,037$) pour l'indice de Chao 1 ont été détectées lors de la deuxième génération (G2) entre le témoin (T) et le PBAT vieilli (PBATv) ($p = 0,05$) et entre le LDPE vierge (PE) et le PBAT vieilli (PBATv) ($p = 0,05$).

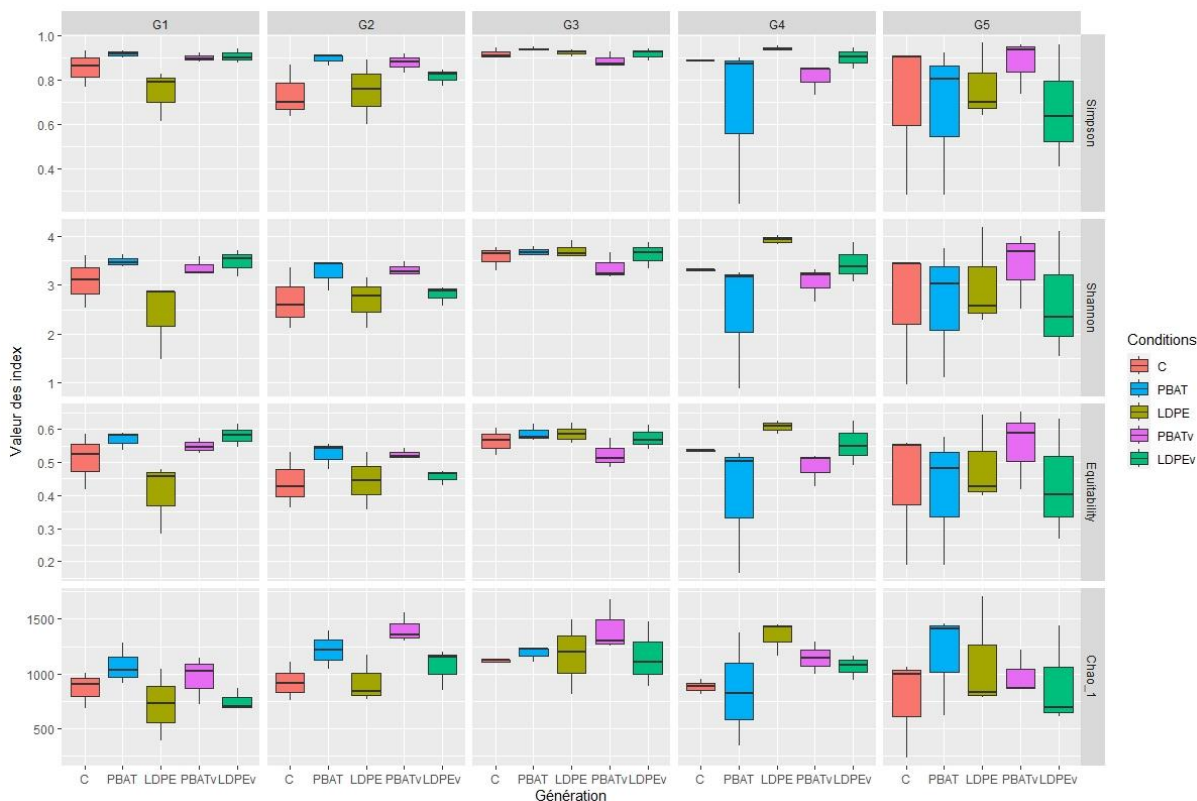


Figure 2.2 : Représentation graphique des indices de diversité alpha des taxa. Les boîtes à moustache représentent la distribution des valeurs des indices de diversité (Simpson et Shannon), de richesse (Chao 1) et de dominance (Equitabilité) pour le microbiote des copépodes en conditions contrôles et contaminées en MPs durant les générations exposées (G1-G4) et de détoxification (G5). Chaque boîte à moustache correspond à une condition d'étude du microbiote des copépodes : C : en conditions contrôles ; PBAT : en présence de MPs vierges de PBAT ; PE : en présence de MPs vierges de LDPE ; PBATv : en présence de MPs de PBAT vieillis ; PEv : en présence de MPs de LDPE vieillis. D'après They *et al.* (2023).

3.3. Dynamique des assemblages bactériens au cours des différentes générations

La classification taxonomique des séquences d'amplicons de rRNA 16S a permis d'identifier 55 ordres phylogénétiques de bactéries dans le microbiote des copépodes au cours des cinq générations de l'expérience. Les ordres Rhodobacterales, Pseudomonadales, Enterobacterales et Rhizobiales étaient les quatre ordres les plus abondants présents dans toutes les conditions au cours de toutes les générations, représentant respectivement 29,6 %, 15 %, 11,1 % et 8 %. Les Flavobacteriales étaient

abondants lors de la première génération pour tous les traitements, mais ont diminué dans les conditions "contrôle" et "LDPE" lors de la deuxième génération. Elles ont également diminué lors de la troisième génération dans les conditions "PBAT" et "PBATv", mais sont restées abondantes dans la condition "PEv" (Figure 2.3). Au cours des quatrième et cinquième générations, l'abondance de cet ordre était faible dans tous les échantillons, sauf dans la condition "PBAT" de la quatrième génération, où elle a augmenté. Dans la classe des Bacilli, les résultats ont montré une augmentation des Thermoactinomycetales lors de la deuxième et de la troisième génération, suivie d'une diminution lors des deux dernières générations.

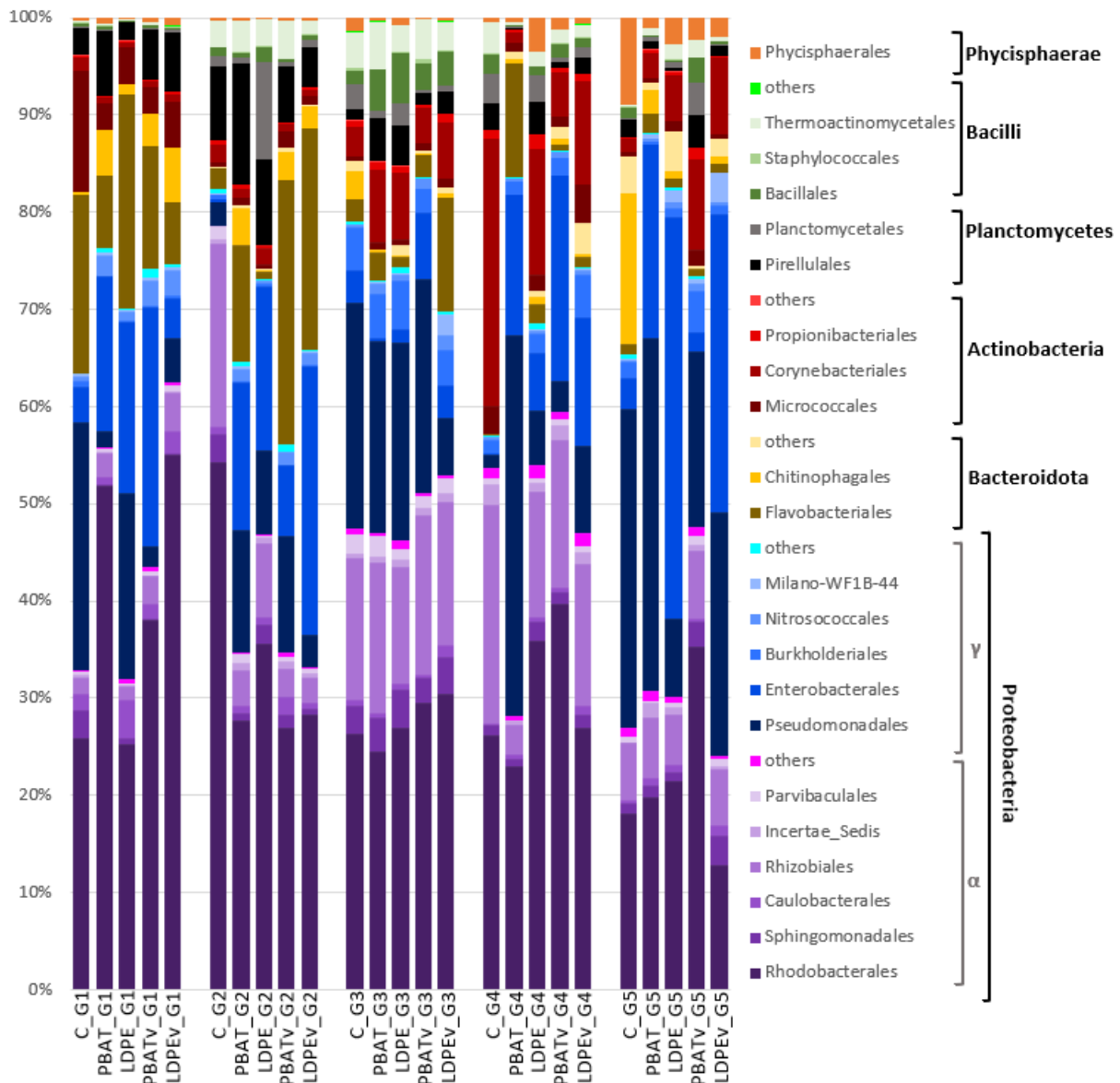


Figure 2.3 : Composition des communautés microbiennes du microbiote des copépodes dans les différentes conditions durant l'exposition multigénérationnelle à l'échelle de l'ordre phylogénétique. Les ordres bactériens ont été groupés par classe puis par phylum. Les Protéobacteria ont été représentés en nuances de mauve pour les Alphaproteobacteria et de bleu pour les Gammaproteobacteria. Les Bacteroidota en nuances de marron ; Actinobacteria en nuances de rouge ; Planctomycetota en nuances de gris ; les Bacilli en nuances de vert et les Phycisphaerae en orange. Uniquement les classes avec une abondance supérieure à 1% de la somme totale des séquences d'OTUs ont été représentées (recouvrement total de 97,6%). C : condition contrôle ; PBAT : MPs vierges de PBAT ; LDPE : MPs vierges de LDPE ; PBATv : MPs vieillis de PBAT ; LDPEv : MPs vieillis de LDPE ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après Thery *et al.* (2023).

Les Bacillales étaient également relativement abondantes lors de la troisième génération (Figure 2.3). Dans l'eau qui a été utilisée pour démarrer chaque génération de copépodes, les communautés bactériennes ont montré des différences au niveau des ordres bactériens au cours des cinq générations. Les ordres Pseudomonadales, Flavobacterales, Rhodobacterales et Burkholderiales étaient les principaux ordres présents lors de la première génération. Lors de la deuxième génération, l'abondance des ordres mentionnés ci-dessus a globalement diminué et l'abondance des

Enterobacterales a fortement augmenté. Lors de la troisième génération, les Enterobacterales ont diminué tandis que les Pseudomonadales, Milano-WF1B-44 et Rhodobacterales ont augmenté.

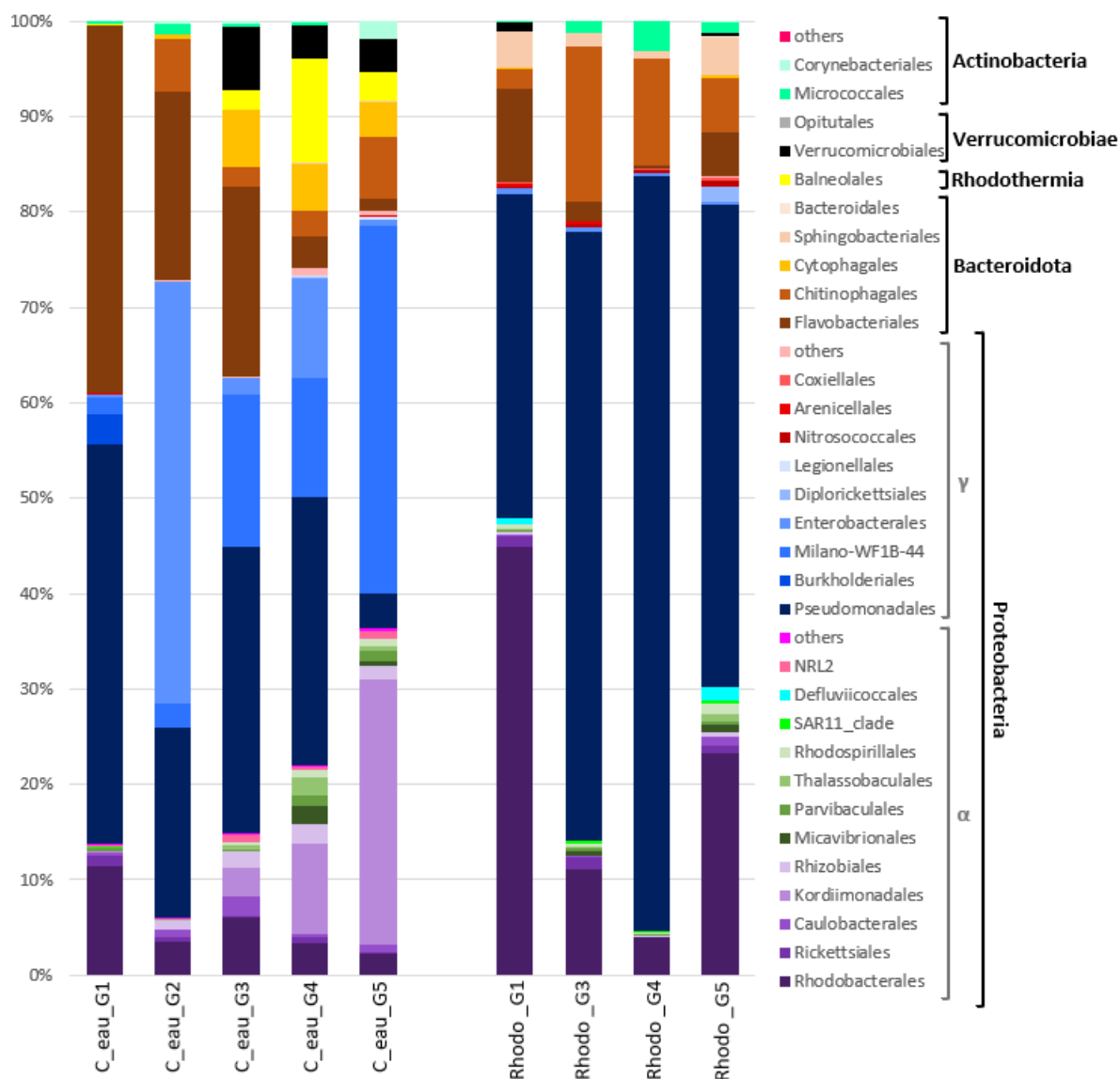


Figure 2.4 : Composition des communautés microbiennes à l'échelle de l'ordre bactérien, des eaux utilisées pour débiter chaque génération et de l'algue *Rhodomonas sp.* utilisée pour le nourrissage des copépodes. Les taxa ont été groupés par classe puis par phylum. Les Alphaproteobacteria ont été représentées en nuances de mauve, vert et rose, excepté Defluviicoccales qui est représenté en bleu turquoise. Les Gammaproteobacteria sont représentés en nuances de bleu et de rouge, les Bacteroidota en nuances de marron, Les Verrucomicrobiae en nuances de gris et les Actinobacteria en nuance de vert turquoise et rouge vif. Enfin, mes Rhodothermia, représentés uniquement par les Balneolales sont représentés en jaune. C_eau : eau utilisée pour débiter chaque génération ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération de détoxification. D'après They *et al.* (2023).

Certains ordres tels que les Verrucomicrobiales, les Cytophagales et les Balneolales sont apparus à une abondance plus élevée (Figure 2.4) par rapport aux deux premières générations. Au cours de la quatrième et cinquième générations, principalement les Kordiimonadales et Milano-WF1B-44 ont augmenté et étaient les deux ordres les plus abondants lors de la cinquième génération. En revanche, les Balneolales et les Rhodobacterales ont vu leurs abondances diminuer. Les communautés bactériennes présentes dans le milieu de *Rhodomonas sp.* étaient relativement stables et

principalement composées des ordres des Pseudomonadales, des Rhodobacterales, des Flavobacteriales et des Chitinophagales (Figure 2.4).

Les résultats de l'analyse de regroupement hiérarchique (basée sur les distances Bray-Curtis) ont montré que le microbiote des copépodes était globalement regroupé en fonction de leurs générations (Figure 2.5).

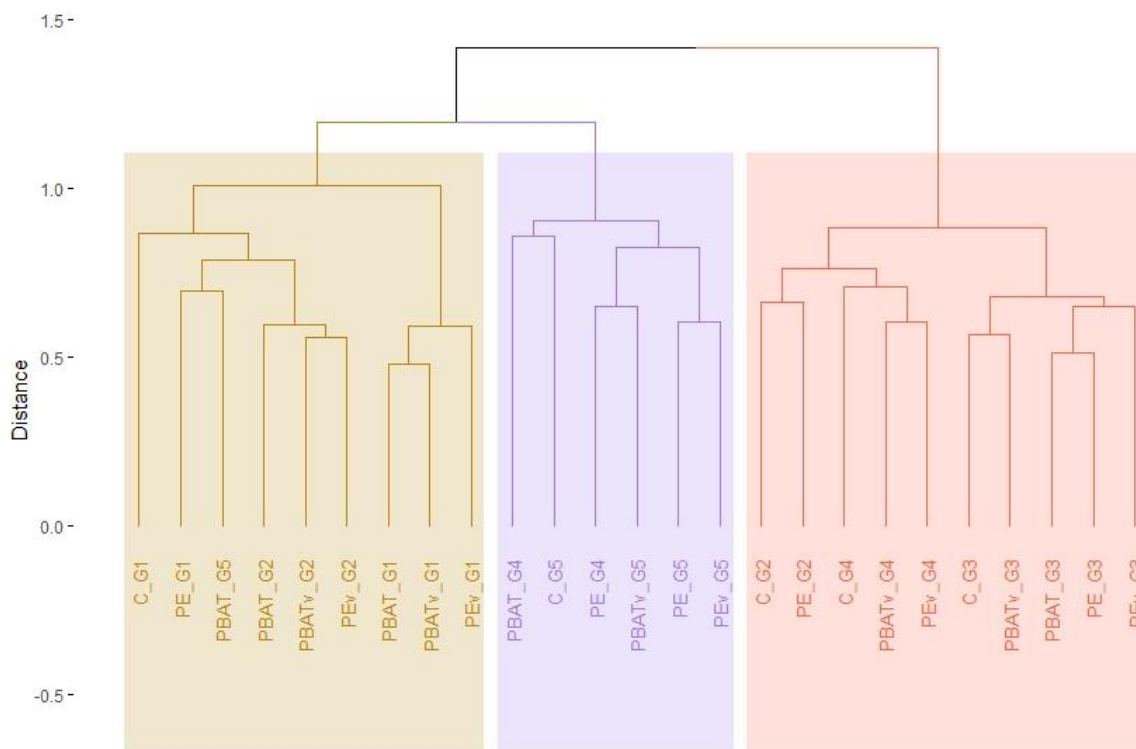


Figure 2.5 : Cluster hiérarchique des communautés microbiennes du microbiote du copépode *E. affinis* dans les différentes conditions expérimentales durant les 5 générations (1-4 : générations exposées aux MPs ; 5 : génération de détoxification). La matrice de distance a été calculée avec l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis après transformation raciné carré du nombre de séquences des OTUs. Les rectangles de couleur correspondent à la séparation arbitraire des différents clusters. C : condition contrôle ; PBAT : MPs vierges de PBAT ; LDPE : MPs vierges de LDPE ; PBATv : MPs vieillis de PBAT ; LDPEv : MPs vieillis de LDPE ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D'après They *et al.* (2023).

Sur le dendrogramme, les traitements des cinq générations pouvaient globalement être divisés en trois groupes : les générations un et deux, les générations trois et quatre, et la génération de détoxification (G5) (Figure 2.5). Les communautés bactériennes des deux premières générations présentaient une distance de Bray-Curtis plus proche avec la génération de détoxification (G5) par rapport aux générations trois et quatre avec la génération cinq (Figure 2.5). Au sein des conditions pour un même type de MPs (PBAT ou LDPE), les échantillons vierges et vieillis présentaient généralement des distances de Bray-Curtis plus proches pour la même génération (Figure 2.5). De plus, nous avons remarqué que les copépodes exposés au PBAT vierge dans la génération de détoxification étaient

placés dans le premier groupe avec la plupart des échantillons correspondant aux conditions des générations un et deux.

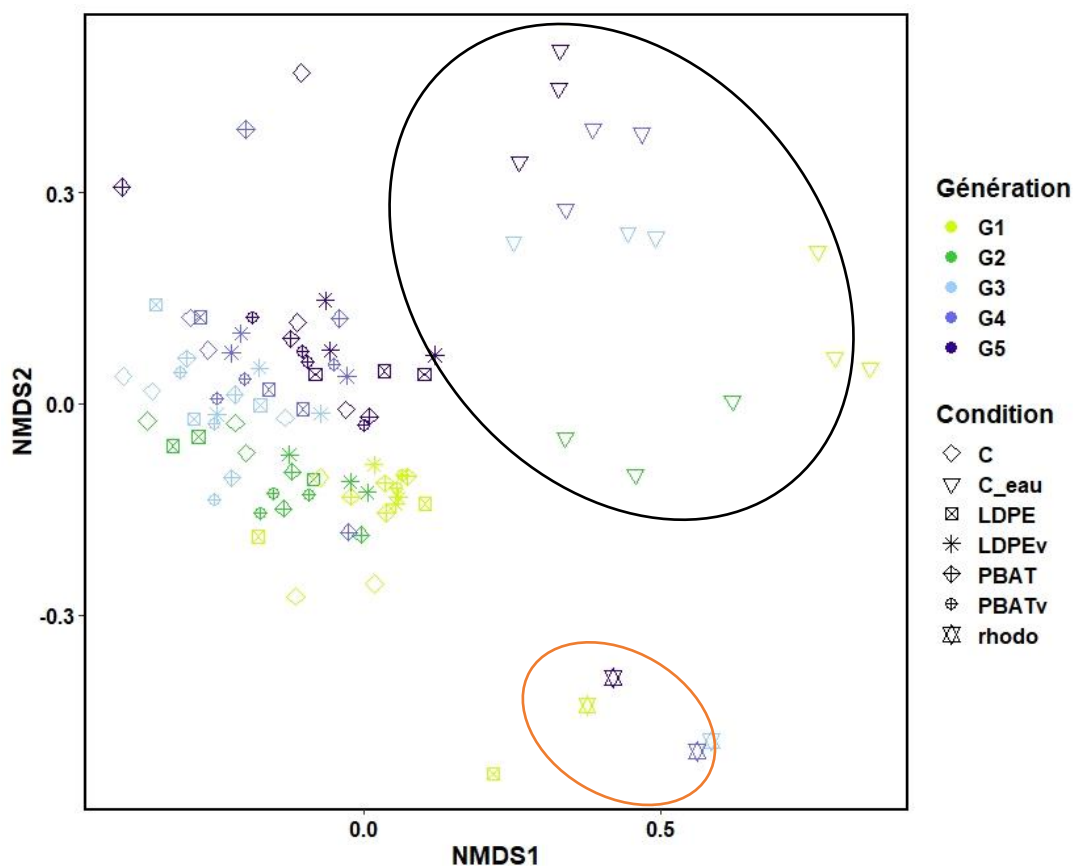


Figure 2.6 : Représentation NMSD (« Nonmetric multidimensional scaling ») des communautés du microbiote d’*E. affinis* pour les différentes conditions expérimentales durant les 5 générations (1-4 : exposées aux MPs ; 5 : de détoxification). L’eau utilisée pour débiter chaque génération et l’algue de nourrissage sont également représentées. Les couleurs de symboles correspondent aux différentes générations tandis que les symboles représentent les différentes conditions. Des cercles de couleur ont été placés de manière arbitraire afin de mettre en évidence les différents groupes. Le cercle noir représente les différents échantillons d’eau utilisée comme milieu et le cercle orange correspond aux différents échantillons de microalgue *Rhodomonas sp.* C : eau utilisée pour débiter chaque génération ; C : condition contrôle ; PBAT : MPs vierges de PBAT ; LDPE : MPs vierges de LDPE ; PBATv : MPs vieillis de PBAT ; LDPEv : MPs vieillis de LDPE ; rhodo : microalgue *Rhodomonas sp.* utilisée pour le nourrissage ; G1 : génération 1 ; G2 : génération 2 ; G3 : génération 3 ; G4 : génération 4 ; G5 : génération 5 (détoxification). D’après They *et al.* (2023).

Afin de mieux comprendre la dispersion des différentes conditions en fonction des communautés bactériennes qui les composent, une analyse nMDS a été réalisée pour analyser les données du microbiote des copépodes, de l’eau pour les copépodes et de la microalgue utilisée pour le nourrissage (Figure 2.6). Trois groupes sont apparus sur ce graphique : le premier groupe comprenait les échantillons d’eau utilisés pour démarrer chaque génération (cercle noir) ; le deuxième groupe comprenait les quatre échantillons de *Rhodomonas sp.* pour l’alimentation (cercle orange), et le troisième groupe comprenait les échantillons correspondant au microbiote des copépodes avec de légères différences en fonction des générations (Figure 2.6), toutes conditions confondues. Ces résultats concordaient avec le résultat des diagrammes de Venn (Figure 2.1) qui suggéraient que les copépodes portaient un microbiote spécifique. Pour rappel, le microbiote des copépodes ne partageait

en moyenne que 6,7 % et 2,9 % d'OTUs avec les échantillons d'eau et de microalgue *Rhodomonas sp.*, respectivement.

3.4. Effets des MPs sur la diversité beta du microbiote des copépodes

Les résultats des analyses nMDS associées à l'analyse PERMANOVA pour les quatre générations exposées aux MPs (G1-G4) ont révélé que la génération ($p = 0,001$), le type de MPs ($p < 0,01$) et les effets de la génération x type de MPs ($p < 0,05$) influençaient significativement le microbiote des copépodes (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure du microbiote d'E. affinis à l'échelle de l'OTU sur les 4 générations exposées aux MPs (G1-G4) calculée par les distances de Bray-Curtis. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.

	Degrés de Liberté	Somme Des Carrés	F- Statistique	R ²	Valeur-p
Effets principaux					
Type de MPs	2	0.6969	2.1250	0.04936	0.0094*
Vieillessement	1	0.2389	1.4568	0.01692	0.1260
Génération	3	3.9347	7.9983	0.27867	0.0001***
Type de MPs x Génération	6	1.4323	1.4557	0.10144	0.0300*
Type de MPs x Vieillessement	1	0.2124	1.2952	0.01504	0.1933
Génération x Vieillessement	3	0.7089	1.4409	0.05020	0.0712
Type de MPs x Génération x Vieillessement	3	0.5003	1.0171	0.03544	0.4160
Résidus	39	6.3952	0.45293		
Total	58	14.1196	1.00000		

*valeur-p < 0,05, **valeur-p < 0,01, ***valeur-p < 0,001 – seuils de significativité statistique.

Permutations n = 9999

Afin de mieux comprendre comment les facteurs ont influencé significativement les communautés bactériennes des différentes conditions, un test post-hoc (ADONIS par paires) a été réalisé. La comparaison par paire entre le "contrôle" et le PBAT a montré que la génération ($p = 0,0001$), le type de MPs ($p < 0,002$) et les effets de la génération x type de MP ($p < 0,001$) influençaient significativement le microbiote des copépodes (Tableau 2). En ce qui concerne le contrôle et le "LDPE", seule la génération ($p = 0,0001$) et le type de MPs ($p < 0,05$) avaient un impact statistiquement significatif sur le microbiote des copépodes (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Résultats du test ADONIS par paires réalisé sur la composition du microbiote d'*E. affinis* des différentes conditions expérimentales durant les générations contaminées en MPs (G1-G4), calculé par les distances de Bray-Curtis. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.

Conditions	Effets principaux	Test ADONIS			
		Somme des carrés	F	R ²	Valeur-p
Contrôle vs. PBAT	Type de MPs	0.5358	3.7725	0.06543	0.0011**
	Génération	2.5987	6.0992	0.31735	0.0001***
	Vieillissement	0.2051	1.4445	0.02505	0.1425
	Type de MPs x Génération	1.0215	2.3975	0.12475	0.0009***
	Génération x Vieillissement	0.561	1.3166	0.06851	0.1341
Contrôle vs. PE	Type de MPs	0.3498	1.8754	0.04054	0.0482*
	Génération	2.4986	4.4658	0.28963	0.0001***
	Vieillissement	0.2461	1.3198	0.02853	0.1941
	Type de MPs x Génération	0.5946	1.0628	0.06893	0.3597
	Génération x Vieillissement	0.6482	1.1586	0.07514	0.2522
PBAT vs. PE	Type de MPs	0.2109	1.2895	0.01896	0.1996
	Génération	3.4437	7.0175	0.30951	0.0001***
	Vieillissement	0.2389	1.4604	0.02147	0.1318
	Type de MPs x Génération	0.5768	1.1753	0.05184	0.2334
	Type de MPs x Vieillissement	0.2124	1.2984	0.01909	0.2006
	Génération x Vieillissement	0.7089	1.4445	0.06371	0.076
	Type de MPs x Génération x Vieillissement	0.5003	1.0196	0.04497	0.412

*valeur-p <0,05, **valeur-p<0,01, ***valeur-p<0,001 – seuils de significativité statistique. Permutations n = 9999

Entre le LDPE et le PBAT, seule la génération (p = 0,0001) exerçait une influence significative sur le microbiote des copépodes. Une analyse PERMANOVA a également été réalisée sur les données de la génération de dépollution (G5), et aucune différence significative n'a été trouvée entre les traitements (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure du microbiote d'*E. affinis* à l'échelle de l'OTU durant la génération de détoxification, calculée par les distances de Bray-Curtis. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.

	Degrés de Liberté	Sommes des Carrés	Statistique-F	R ²	Valeur-p
Condition	2	0.7231	1.3572	0.17273	0.1207
Résidus	13	3.4633		0.82727	
Total	15	4.1864		1.0000	

*valeur-p <0,05, **valeur-p<0,01, ***valeur-p<0,001 – seuils de significativité statistique. Permutations n = 9999

Pour chaque génération, les différences pour chaque OTUs du nombre de séquences entre le contrôle et les différents traitements ont été analysées à l'aide d'un test de Wilcoxon non paramétrique. Au

total, 34 OTUs ont montré des différences significatives d'abondance (augmentation/diminution) après exposition aux MPs par rapport au contrôle (Annexe 2.2). Au niveau taxonomique, ces OTUs appartenaient aux classes des Alphaproteobacteria (47,1 %), de Gammaproteobacteria (23,5 %), d'Actinobacteria (14,7 %), de Bacteroidota (8,8 %) et de Planctomycetes (5,9 %). Alphaproteobacteria était composé de Rhodobacterales (10 OTUs), de Rhizobiales (cinq OTUs) et de Caulobacterales (un OTU). Gammaproteobacteria était représenté par Enterobacterales (cinq OTUs) et Legionellales, Nitrosococcales et Pseudomonadales avaient une OTU pour chaque ordre. Actinobacteria était composé de Micrococcales (trois OTUs) et de Corynebacteriales (deux OTUs). Bacteroidota comprenait Flavobacteriales (deux OTUs) et Cytophagales (une OTU). Pirellulales (deux OTUs) était la seule famille présente pour les Planctomycetes. Respectivement, 12, 11, 8, 0 et 4 OTUs ont changé en abondance au cours des générations un, deux, trois, quatre et la génération de détoxification, avec plus de 82 % de ces OTUs montraient une augmentation d'abondance suite à l'exposition aux MPs par rapport au traitement témoin (Annexe 2.2). Une seule OTU (OTU 941, "*Microbacterium*") présentait une différence significative dans le nombre de séquences pour les deux traitements (PBAT vieilli et LDPE vieilli) durant la génération un. Toutefois, il est à noter que les OTUs affectés par les traitements aux MPs, tels que détectés par le test de Wilcoxon, étaient principalement présents en faible nombre de séquences (≤ 3). Les conditions de MPs vieillis (c'est-à-dire le PBAT vieilli et le LDPE vieilli) semblaient avoir l'effet le plus important sur l'abondance des séquences des OTUs par rapport au contrôle à cette échelle d'étude. Enfin, le test de Wilcoxon a identifié une OTU (OTU 2602 - *Labrenzia alba*) qui était présente dans la condition contrôle mais absent dans les traitements de PBAT vierge et de LDPE vieilli.

4. Discussions

L'impact des microparticules (MPs) sur les copépodes a été précédemment documenté, de l'échelle moléculaire (Heindler *et al.*, 2017 ; Choi *et al.*, 2020) et au niveau des traits de vie (Cole *et al.*, 2015 ; Cole *et al.*, 2016). Cependant, à notre connaissance, les impacts potentiels des MPs sur le microbiote des copépodes n'avait pas été étudiés. Les copépodes représentent une proportion élevée de la biomasse carbonée du zooplancton et jouent un rôle clé entre les producteurs primaires et les consommateurs secondaires dans les réseaux trophiques marins et estuariens (Turner, 2004). De plus, des études ont montré que le microbiote joue un rôle essentiel dans le maintien de la santé des animaux (Zhang *et al.*, 2010) et dans le soutien du système immunitaire (Nicholson *et al.*, 2012). De plus, les MPs offrent un soutien et une protection aux microorganismes dans la "plastisphère" (Muthukumar *et al.*, 2011), y compris des espèces potentiellement pathogènes telles que *Vibrio sp.* (Zettler *et al.*,

2013). Par conséquent, il est essentiel d'étudier les impacts de l'exposition aux MPs sur les copépodes sous tous leurs aspects, y compris le microbiote.

Des études antérieures ont montré que l'exposition aux MPs avait un impact sur la richesse du microbiote des planaires, avec une augmentation significative des indices de Simpson et de Shannon (Han *et al.*, 2022), ainsi que sur le microbiote des médakas marins, avec une diminution des indices de Shannon et de Chao 1 (Zhang *et al.*, 2023). Cependant, dans notre étude, les effets sur le microbiote d'*E. affinis* après exposition aux MPs semblent être plus subtils, avec seulement une différence significative dans l'indice Chao 1 observée entre le groupe contrôle et le groupe exposé aux MPs de PBAT vieillis pendant la deuxième génération. Les explications possibles pourraient découler du fait que les études de Han *et al.* (2022) et de Zhang *et al.* (2023) se sont concentrées spécifiquement sur le microbiote intestinal, qui est considéré comme plus sensible aux polluants par rapport au microbiote externe (Fackelmann et Sommer, 2019). En effet, dans notre étude, en raison de la petite taille d'*E. affinis* et de l'absence de protocoles pour isoler le tractus intestinal, l'ADN total et non pas uniquement intestinal a été extrait à partir de chaque échantillon. Par conséquent, le microbiote pourrait provenir à la fois de la partie interne (intestin) et externe (cuticule de chitine) des copépodes, y compris de MPs qui ont été ingérés par les copépodes ou qui se sont fixés à leurs parties externes. De plus, la concentration environnementalement réaliste de MPs utilisée dans cette étude pourrait également contribuer à l'observation de changements subtils. En effet, contrairement à d'autres études exposant les organismes modèles à des concentrations élevées de MPs, la concentration réaliste de MPs utilisée dans notre étude pourrait n'être pas suffisante pour affecter les estimateurs de diversité alpha du microbiote d'*E. affinis*. Des résultats similaires ont été rapportés chez la moule bleue *Mytilus edulis* exposée à des concentrations comparables de MPs (200 µg/L), ce qui n'a pas entraîné de différences significatives dans les estimateurs de la diversité alpha de la diversité microbienne intestinale (Li L.-L. *et al.*, 2020).

Les résultats des analyses de la structure des communautés microbiennes au niveau des OTU suggèrent que les copépodes possèdent leur propre microbiote spécifique qui diffère de l'eau environnante et de la microalgue *Rhodomonas sp* dont ils se nourrissent. Cependant, nous avons remarqué que la structure de la communauté évoluait tout au long de l'expérience à chaque génération de copépodes. Cette observation pourrait être due à l'introduction de communautés bactériennes "nouvelles" au début de chaque génération par le biais du changement d'eau. En effet, nos résultats montrent que la structure de la communauté de l'eau a évolué au cours des cinq générations, avec de fortes augmentations/diminutions des principaux ordres bactériens. De plus, même si les structures bactériennes étaient assez stables au cours de l'expérience, quelques changements au niveau de l'ordre phylogénétique ont été observés. En ce qui concerne notre plan expérimental, le facteur génération est clairement influencé par l'eau utilisée pour chaque génération et l'algue de nourrissage. Cette

hypothèse assure une explication évidente sur l'effet « génération » en tant que facteur le plus explicatif de la dynamique de structure des communautés microbiennes des copépodes, comme le montre l'analyse PERMANOVA et les comparaisons par paires avec le test post-hoc.

Selon les résultats de la PERMANOVA, l'autre facteur qui influence significativement le microbiote des copépodes est l'exposition aux MPs. Cette découverte concorde avec une étude de Li L.-L. *et al.*, (2020), qui a également identifié "l'exposition aux MPs" comme un facteur significatif influençant le microbiote intestinal des moules bleues en utilisant une analyse PERMANOVA. Nos résultats concordent également avec des études existantes sur les souris, les poissons-zèbres et les planaires, qui suggèrent que l'exposition aux MPs peut induire des impacts significatifs sur le microbiote intestinal (Lu *et al.*, 2018 ; Qiao *et al.*, 2019 ; Han *et al.*, 2022). Dans notre étude, les résultats de l'analyse post-hoc suggèrent que les effets des MPs sur le microbiote des copépodes par rapport au contrôle étaient indépendants du type de MPs (PBAT ou LDPE). En outre, la comparaison par paire (post-hoc de l'ADONIS) entre ces deux traitements a montré une différence non significative entre eux. Également, la différence entre le contrôle et la condition exposé au PBAT était plus importante que la différence entre le contrôle et la condition exposé au LDPE, car la valeur p de "Contrôle vs PBAT" était environ 10 fois plus faible. Par conséquent, l'interaction entre le facteur "génération" et le PBAT a également été identifiée comme ayant un effet significatif sur la structure de la communauté microbienne.

Pour enquêter sur les raisons possibles de l'effet plus important de l'exposition au PBAT que de l'exposition au LDPE sur le microbiote des copépodes, nous avons analysé les communautés de biofilm attachées au PBAT et au LDPE (Chapitre III). D'un point de vue global, les communautés bactériennes présentes à la surface du PBAT et du LDPE étaient très proches pour une même date de vieillissement, n'impliquant pas de différence significative entre les communautés bactériennes entre ces deux types de plastique par analyse PERMANOVA. Cependant, certaines espèces indicatrices de chaque type de plastiques ont pu être mises en lumière (Chapitre III), pouvant expliquer cette p-value plus élevée du PBAT, si l'une de ces espèces a pu interagir spécifiquement avec le microbiote d'*E. affinis*. Une observation similaire a été rapportée par Delacuvellerie *et al.* (2021), qui ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans les communautés bactériennes entre le PBAT et le LDPE après 82 jours d'immersion en mer Méditerranée. Les raisons possibles de l'observation d'un plus grand effet de l'exposition au PBAT pourraient impliquer l'interaction entre les copépodes et le PBAT. Par exemple, en tant que plastiques biodégradables, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les MPs de PBAT puissent être dégradés (même partiellement) par les enzymes digestives des copépodes après ingestion. Les produits de la digestion/dégradation du PBAT pourraient ensuite influencer davantage le microbiote intestinal des copépodes. Dans l'ensemble, nous pouvons suggérer que les MPs de PBAT et de LDPE pourraient potentiellement avoir un impact sur le microbiote des

copépodes dans un environnement naturel avec des effets possibles sur les traits de vie, même si le PBAT est généralement considéré comme plus "respectueux de l'environnement". À l'inverse, une étude récente sur le mérou marin (*Oryzias melastigma*) suggérait que le polylactide (PLA), un polymère biosourcé et biodégradable, était moins impactant par rapport aux plastiques non biodégradables (c'est-à-dire le polyéthylène téréphtalate et le polystyrène) en ce qui concerne les indices de diversité alpha (Shannon et Chao 1) et la complexité des réseaux de microbiote intestinal (Zhang *et al.*, 2023).

Toujours selon les résultats de l'analyse PERMANOVA, aucune différence significative de composition et structuration du microbiote des copépodes n'a été observée entre les conditions exposées aux MPs vierges et celles exposées aux MPs vieillis. Ce résultat est en contradiction avec l'étude précédente de Li L.-L. *et al.*, (2020), qui a montré des impacts nettement plus importants des MPs vieillis sur le microbiote intestinal de la moule bleue comparativement aux MPs vierges. Une explication possible de cette différence d'observation pourrait résider dans le design expérimental. Pour Li L.-L. *et al.*, (2020), les réservoirs de culture des moules étaient nettoyés un jour sur deux, remplis d'eau de mer propre et alimentés en MPs vierges ou vieillis à chaque changement d'eau. Pour les cultures de copépodes dans notre étude, l'eau et les MPs étaient renouvelés au début de chaque génération. Par conséquent, au cours de chaque génération (10 à 15 jours), les MPs vierges pouvaient avoir des biofilms se développant à leurs surfaces et être assimilés à des MPs « vieillis ». Enfin, le résultat de la PERMANOVA sur la génération de détoxification suggère qu'il n'y a pas de différences statistiques significatives entre les conditions contrôles et les conditions précédemment exposées aux MPs. Ce résultat laisse entendre une résilience relativement rapide du microbiote des copépodes même après plusieurs générations d'exposition aux MPs.

Selon nos résultats de l'analyse taxonomique, les phylums bactériens abondants trouvés dans le microbiote des copépodes (Proteobacteria, Bacteroidota et Actinobacteria) étaient similaires à ceux documentés pour d'autres espèces de copépodes dans des environnements naturels de la mer du Nord et de l'océan Atlantique (Brandt *et al.*, 2010 ; Cregeen, 2016). À ce niveau taxonomique, nous n'avons pas été en mesure de trouver de différences entre le microbiote des copépodes exposés et celui des témoins. À une résolution taxonomique plus élevée, les résultats du test de Wilcoxon ont suggéré que 34 OTUs étaient significativement ($p < 0,05$) affectées par l'exposition aux MPs. En général, le nombre d'OTUs impactées semblait diminuer lentement de la première à la troisième génération et était proche de zéro pour les deux dernières générations. Parmi ces 34 OTUs, l'OTU 941 ("*Microbacterium*") a été identifié à la fois sur le PBAT vieilli et sur le LDPE vieilli lors de la première génération. Il convient de noter que l'OTU 941, ainsi que tous les autres au sein de ces 34 OTUs, étaient représentés par un faible nombre de séquences (≤ 3 lectures). De même, nous avons constaté lors de la troisième génération que l'OTU 2602 (*Labrenzia alba*) était absente dans le PBAT

vierge et le LDPE vieilli par rapport au contrôle. Bien que cette OTU n'ait été présente qu'en faible nombre de séquences, il est possible que les MPs aient altéré la relation symbiotique entre les copépodes et *Labrenzia alba*. En effet, il a été démontré que le génome de cette espèce possède des facteurs de symbiose entre les microbes et les hôtes invertébrés marins (Couceiro *et al.*, 2021). Cependant, même si le test de Wilcoxon a révélé plusieurs OTUs significativement impactées par l'exposition aux MPs, étant donné que ces OTUs étaient uniquement étayées par un faible nombre de séquences, nous suggérons de considérer ces résultats avec prudence.

Il convient de mentionner que deux espèces de *Vibrio* (*Vibrio splendidus* et *Vibrio tasmaniensis*) ont été détectées dans un réplica de copépodes exposés au PBAT vierge pour la deuxième, troisième et quatrième générations. Ces deux espèces de *Vibrio* sont connues pour être des agents pathogènes des mollusques : *Vibrio tasmaniensis* a été associée à des épisodes de mortalité massive chez les huîtres d'élevage (Roux *et al.*, 2002 ; Lopez-Joven *et al.*, 2018), tandis que *Vibrio splendidus* a été détectée chez des poissons nettoyeurs utilisés pour éliminer les poux de mer des saumons dans les fermes piscicoles (Gulla *et al.*, 2015). Des relations particulières entre le zooplancton à cuticule chitineuse tels que les copépodes et le genre *Vibrio* ont déjà été décrites (Tamplin *et al.*, 1990 ; Heidelberg *et al.*, 2002 ; Brandt *et al.*, 2010). Cependant, les deux espèces de *Vibrio* n'ont été détectées que dans un seul échantillon des deuxième, troisième et quatrième générations, mais elles n'ont pas été détectées dans la génération suivante après la décontamination ni dans les échantillons d'eau utilisés pour démarrer chaque génération. Ces 2 espèces n'ont pas non plus été séquencées dans les communautés bactériennes lors de l'expérimentation de vieillissement du PBAT et du LDPE (Chapitre III). Dans le cadre de notre étude, nos résultats suggèrent que le PBAT pourrait ne pas être l'alternative idéale afin de remplacer certains plastiques comme le LDPE, provoquant des effets similaires sur le microbiote d'*E. affinis*, et possiblement d'autres espèces ou d'autres modèles d'étude.

**Chapitre III. Expérimentation
de vieillissement de plastique
biodégradable (polybutylène
adipate téréphtalate – PBAT)
et non biodégradable
(polyéthylène basse densité –
LDPE) sous forme de
Microplastiques : étude de la
dégradation chimique et de la
plastisphère durant 120 jours
en conditions contrôlées**

Résumé

Afin de contrer la pollution des déchets plastiques sur les biotopes et les biocénoses à l'échelle mondiale, de nouveaux plastiques considérés comme biodégradables, tels que le polybutylène adipate téréphtalate (PBAT), remplacent progressivement les plastiques conventionnels persistants dans l'environnement connus depuis des décennies comme le polyéthylène basse densité (LDPE). Bien que ces nouveaux plastiques soient biodégradables dans des conditions industrielles contrôlées, leur seuil de biodégradabilité dans les environnements naturels, notamment marins, reste incertain, encore plus sous forme de microplastiques. Afin de mieux comprendre la biodégradabilité et l'impact des communautés microbiennes sur ces plastiques, ils ont été vieillis en laboratoire pendant 120 jours dans des conditions simulant les conditions estuariennes, avec ou sans apport bactérien. Une approche analytique a été utilisée afin de mesurer les caractéristiques chimiques avant, pendant et après vieillissement des MPs de PBAT et de LDPE. De plus, la dynamique des communautés microbiennes à leurs surfaces a été étudiée. Nos résultats ont montré que les communautés microbiennes étaient uniquement dirigées par le temps de vieillissement et non par la nature du polymère sur lequel elles se développaient. D'un point de vue chimique, seule une diminution de la cristallinité a été observée pour le LDPE vieilli en présence de bactéries. Nos découvertes ont également révélé que certaines espèces bactériennes ne se développaient que sur un type de MPs. Parmi ces espèces certaines pourraient potentiellement être capables d'interagir préférentiellement avec le PBAT ou le LDPE, notamment en étant capable de dégrader l'un deux.

1. Introduction

En raison de leurs propriétés intéressantes et de leurs multiples usages dans notre quotidien, la production de plastiques augmente chaque année depuis quelques décennies et a atteint 390,7 millions de tonnes à la fin de 2021 dans le monde (Plastics Europe, 2022). Parmi les applications des plastiques, l'emballage en représente 44% et demeure de loin la principale utilisation des plastiques sur les marchés (Plastics Europe, 2022). Même si la gestion des déchets plastiques (c.-à-d. le recyclage et l'utilisation comme combustible) s'améliore, une grande partie des déchets plastiques, principalement les emballages, s'accumule toujours dans les décharges (Geyer *et al.*, 2017). Les plastiques utilisés pour l'emballage sont légers et ont fatalement la possibilité de contaminer les écosystèmes, et particulièrement les milieux marins. Actuellement, les chercheurs travaillant sur cette problématique ont relativement bien documenté l'impact écologique des débris plastiques sur de nombreux animaux tels que les poissons (Romeo *et al.*, 2015), les oiseaux de mer (Tanaka *et al.*,

2013), les tortues de mer (Campani *et al.*, 2013) ou les mammifères marins (Laist, 1997 ; Lusher *et al.*, 2015).

Dans l'océan, les débris plastiques sont soumis à des contraintes physiques et mécaniques telles que la photodégradation, l'oxydation, l'abrasion (Andrady, 2011) et le biofouling (Sheavly et Register, 2007 ; Lobelle et Cunliffe, 2011) qui les fragmentent en particules plus petites jusqu'à rentrer dans la catégorie des MPs (<5mm). Afin de prévenir la contamination plastique, la solution actuelle appliquée est le remplacement partiel des plastiques non biodégradables les plus utilisés, tels que le polyéthylène basse et haute densité (LDPE / HDPE), le polypropylène (PP), le chlorure de polyvinyle (PVC) et le polyéthylène téréphtalate (PET) (Plastics Europe, 2022), par des plastiques biodégradables. Parmi eux, le polybutylène adipate téréphtalate (PBAT) est décrit comme une bonne alternative au LDPE en raison de ses propriétés intéressantes comme sa flexibilité, ou sa haute élongation avant rupture (Weng *et al.*, 2013). Par définition, les plastiques biodégradables sont considérés comme tels lorsqu'ils peuvent être dégradés dans des installations de compostage industriel avec des déchets organiques, conformément à la certification spécifique NF EN 13432 (Afnor, 2000). La dégradation des plastiques va être dirigée par des facteurs abiotiques et biotiques (activité microbienne) (Andrady, 2011). Toutefois, il est admis que les conditions environnementales réalistes sont moins favorables à la dégradation des plastiques comparativement aux conditions industrielles (Ruggero *et al.*, 2021), notamment en milieu marin (Deroiné *et al.*, 2014). Quelques études ont montré que la colonisation des macroplastiques par les bactéries, appelée biofouling, est irrémédiable et se produit en quelques heures pour les colonisateurs primaires (Sheavly et Register, 2007). Zettler *et al.* (2013) ont rapporté que les communautés microbiennes vivant sur les plastiques, appelées "Plastisphère", sont spécifiques à ce support et donc distinctes de l'eau environnante et de bien d'autres supports flottants, tels que les macroalgues ou le bois sur le long terme. L'hypothèse expliquant cela serait la persistance de ce support dans le milieu marin qui permet l'installation de communautés généralistes lors des premières phases de colonisation mais devenant spécifiques à ce type de support en ce qui concerne les biofilms matures (Wallbank *et al.*, 2022). En ce qui concerne la dynamique de colonisation bactérienne, des études rapportent que les débris plastiques sont rapidement colonisés par les Gamma- et Alpha-proteobacteria, puis par les Bacteroidetes, respectivement décrits dans la littérature comme colonisateurs primaires et secondaires (Lee *et al.*, 2008 ; Oberbeckmann *et al.*, 2015 ; De Tender *et al.*, 2015 ; Delacuvellerie *et al.*, 2021). Cependant, les facteurs influençant la colonisation bactérienne sur les plastiques font toujours l'objet de débats. Peu d'études portant sur la cinétique de colonisation bactérienne sur les plastiques immergés dans l'environnement marin existent et ont rapporté de conclusions différentes. Certaines études ont rapporté que la composition de la plastisphère était principalement influencée par les caractéristiques spatiales et saisonnières de l'environnement proximal, mais que le type de plastique influençait également de manière significative les

compositions bactériennes (Amaral-Zettler *et al.*, 2015 ; Oberbeckmann *et al.*, 2018). Ce dernier résultat a été également confirmé par Delacuvellerie *et al.* (2023) lors d'une immersion à long terme (jusqu'à 260 jours) de macroplastiques de PBAT, PLA (semi cristallin et amorphe) et PS en aquarium mimant les conditions marines. Malgré une structure de communauté bactérienne commune entre les différents plastiques, les chercheurs ont démontré qu'une part de la composition était spécifique pour le PBAT. Les auteurs ont également démontré une perte en masse du PBAT (<2,5%) significativement supérieure aux autres plastiques testés (Delacuvellerie *et al.*, 2023). A contrario, une étude ultérieure de ce groupe n'a rapporté aucune différence significative dans la composition bactérienne après 82 jours d'immersion dans la mer Méditerranée (Delacuvellerie *et al.*, 2021) entre le PBAT et le LDPE. Enfin, les capacités de biodégradation des communautés bactériennes ont également été étudiées. Jacquin *et al.* (2019) ont même proposé une liste de souches de microorganismes ayant des capacités de biodégradation dans des conditions contrôlées en laboratoire. Bien que quelques espèces aient été décrites dans des conditions de culture optimales, les taux de dégradation des macroplastiques, biodégradables ou non, tendent à être extrêmement faibles, comme dans l'environnement marin. En effet, une grande disponibilité de sources de carbone dans le milieu marin environnant n'influence pas les microorganismes à cibler les plastiques comme source de carbone (Jacquin *et al.*, 2019 ; Delacuvellerie *et al.*, 2021).

Pour le moment, les études ayant travaillé sur la biodégradabilité de plastiques en conditions marines ont utilisé des macroéchantillons. Cependant, il est admis que la dégradation des plastiques entraîne une fragmentation de ceux-ci et donc l'émission de MPs dans le milieu (Wei *et al.*, 2021). A l'instar des nanoparticules, le ratio surface/volume des MPs est extrêmement élevé (Brennecke *et al.*, 2016). Il se pourrait donc que cette caractéristique promeuve une dégradation plus rapide des plastiques sous forme de MPs. Eu égard à la faible quantité de données disponibles sur la thématique de la dégradation des bioplastiques dans les écosystèmes mais aussi à la demande forte pour ces plastiques, il est primordial d'étudier cette thématique pour un large panel d'environnements. De ce fait, nous avons immergé nos MPs en eau simulant le milieu estuarien, un compartiment environnemental pour lequel aucune donnée de dégradation de plastique considéré comme biodégradable n'existe.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

Pour cette étude, le LDPE a été sélectionné pour représenter la catégorie des plastiques pétrosourcés non biodégradables. D'un autre côté, la catégorie des bioplastiques biodégradables a été représentée par le PBAT. Les deux types de plastiques ont été fournis sous forme de granulés. Le LDPE a été fourni par EXXONMOBIL (code produit : BM50) et le PBAT par BASF SE, distribué par B-Plast

2000 (code produit : Ecoflex F blend C 1200). Les caractéristiques de chaque plastique sont disponibles dans le Tableau 3.1.

2.2. Préparation des échantillons de MPs

Les granulés ont d'abord été fragmentés en fragments grossiers en les écrasant sur une grille de 4 mm, puis une grille de 2 mm. Durant les opérations, de l'azote liquide a été régulièrement ajouté sur la grille de broyage afin d'éviter l'échauffement des fragments de plastique. Juste après, chaque plastique a été cryobroyé (CRYOMILL, RETSCH®, Hann, Allemagne) en utilisant quatre fois d'affilée un programme spécifique qualibré afin d'obtenir une taille de MPs conforme à la gamme de taille de 1-10 μm souhaitée (Tableau 3.1). Finalement, la gamme de tailles de chaque type de plastique a été confirmée par diffusion dynamique de la lumière (Mastersizer 2000, Malvern Panalytical, Malvern, Royaume-Uni). Les mesures ont été réalisées avec une agitation constante pour éviter la sédimentation des MPs. En raison des densités respectives du PBAT et du LDPE, de l'eau distillée a été utilisée comme solvant pour le PBAT et de l'éthanol ultra pur à 99% a été nécessaire pour le LDPE afin d'éviter la flottaison des MPs.

Tableau 3.1 : Caractéristiques des échantillons de MPs de PBAT et LDPE préparés pour l'expérimentation de vieillissement.

Type de plastique	Gamme de taille	Densité	Température de fusion	Cristallinité
PBAT	1.78 - 4.20 μm	1.26 g/cm^3	125°C	7%
LDPE	2.28 - 5.62 μm	0.95 g/cm^3	111°C	44%

2.3. Design expérimental

Le design expérimental décrit ci-dessous avait deux objectifs majeurs. Le premier était d'appliquer un processus de vieillissement conforme aux paramètres utilisés pour une autre publication rendant compte des effets de l'exposition à des MPs vieillis sur le microbiote d'un modèle de copépode estuarien (Thery *et al.*, 2023 ; Chapitre II). Le second visait à documenter la modification des paramètres chimiques mais également la dynamique microbienne à la surface de chaque type de plastique sous forme de MPs pendant 120 jours de vieillissement dans de l'eau estuarienne synthétique, composée d'eau de la Manche Orientale et d'eau déminéralisée, utilisée comme eau de maintenance pour les cultures massives de copépodes par notre groupe (Thery *et al.*, 2023 ; Chapitre II). Enfin, chaque type de plastique a été vieilli dans de l'eau avec ou sans communautés bactériennes naturelles en stérilisant ou non l'eau par autoclavage afin de mesurer l'impact potentiel de la

colonisation et du développement bactérien sur chaque type de plastique. L'expérimentation de vieillissement comprenait 6 dates de suivi (15 – 30 – 45 – 75 – 105 – 120 jours) pour suivre l'évolution des caractéristiques chimiques de chaque type de plastique par rapport à leurs caractéristiques initiales et des communautés bactériennes à leur surface. Durant toute l'expérience, les échantillons étaient disposés sur un agitateur rotatif à 200 tr/min à une température ambiante contrôlée de 19°C avec une photopériode de 12:12. Pour prévenir au maximum la contamination externe et l'évaporation tout en permettant les échanges d'air, les échantillons étaient couverts avec des couvercles en aluminium percés. Pour le suivi des communautés bactériennes de chaque type de plastique, 2 réplicats de 540 µg/L (conformément à la concentration utilisée pour l'exposition des MPs aux copépodes) (They *et al.*, 2023 ; Chapitre II) ont été mis dans des piluliers et remplis de 10 mL d'eau estuarienne non autoclavée. Pour le suivi des propriétés chimiques, un réplicat de 50 mg de chaque type de plastique a été placé dans des béchers de 100 mL avec 80 mL d'eau estuarienne d'intérêt (c.-à-d. autoclavée ou non).

2.4. Isolement des communautés bactériennes à la surface des MPs

Pour chaque date de prélèvement, les deux échantillons étaient collectés à travers des unités de filtre Sterivex de pore 0,22 µm (Millipore, Burlington, MA, USA) à l'aide d'une seringue stérile. Les filtres étaient finalement recouverts de Parafilm et stockés à -20°C jusqu'à la fin de l'expérience. Durant la préparation de l'eau utilisée pour débiter l'expérience de vieillissement, 800 mL d'eau ont été échantillonnés à l'aide d'un filtre Sterivex pour l'analyse du pool de communautés bactériennes initialement présent dans cette eau pour étudier la colonisation des MPs.

2.5. Isolement des MPs pour la caractérisation chimique

Les échantillons de MPs ont d'abord été isolés de l'eau par filtration sous vide sur un filtre membrane polycarbonate Nuclepore™ noir de 0,2µm (Whatman International LTD, Springfield, UK) dans des conditions stériles en utilisant une enceinte à flux laminaire (Airstream® PCR Cabinet, Esco Micro Private Limited, Singapour). Les filtres ont ensuite été disposés individuellement dans des boîtes de Pétri et ont été conservés dans un dessiccateur en verre à l'abri de la lumière jusqu'à la fin de l'expérience. Pour extraire les MPs des filtres, ceux-ci ont été remis en suspension à partir du filtre dans des bouteilles en plastique propres de 500 mL avec de l'éthanol ultrapure à 99%. Ensuite, les bouteilles ont été centrifugées à 10 000 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante. Juste après, les bouteilles ont été laissées pendant 30 minutes pour permettre une sédimentation complète des MPs. Un maximum d'éthanol a été retiré des bouteilles à l'aide d'une seringue avec une aiguille,

en évitant les MPs sédimentés. Les bouteilles ont finalement été placées dans une étuve à vide à 30°C pendant deux heures pour permettre l'évaporation de l'éthanol restant. Pendant le processus, des feuilles d'aluminium percées ont été utilisées pour couvrir le haut des bouteilles afin de prévenir une évaporation brutale. Enfin, les MPs ont été collectés et disposés dans des boîtes de Pétri avec du Parafilm pour analyses ultérieures.

2.6.Extraction des ADN, préparation des bibliothèques des ADNr 16S, séquençage et analyse des séquences

Les filtres contenus dans les unités Sterivex ont été sortis à l'aide de cisailles manuelles. Les filtres ont ensuite été découpés de leur support en plastique et placés dans des microtubes de 1,5 mL. L'ADN total de tous les échantillons a été extrait en utilisant le kit QIAmp Powerfecal Pro DNA (Qiagen, Hilden, Allemagne), en suivant les instructions du fabricant. La préparation de la bibliothèque d'ADNr 16S, le séquençage et le traitement des séquences ont été réalisés conformément à une publication précédente du groupe (Thery *et al.*, 2023, Chapitre II).

2.7.Caractérisation des propriétés chimiques des MPs durant le processus de vieillissement

La caractérisation chimique de chaque échantillon de MPs a été effectuée avant le début de l'expérience de vieillissement et pour toutes les dates de suivi décrites précédemment. Les altérations potentielles des deux différents processus de vieillissement sur les échantillons de MPs ont été estimées en utilisant des techniques pertinentes utilisées sur les films plastiques tels que la Réflectance Totale Atténuée-Transformée de Fourier en Infrarouge (ATR-FTIR), la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC) (Benali *et al.*, 2015; Delacuvellerie *et al.*, 2021), ou sur les microplastiques telle que l'Analyse Thermogravimétrique (TGA) (Mansa et Zou, 2021).

2.7.1. Spectroscopie ATR-FTIR

Les spectres de surface des MPs ont été acquis à l'aide du Tensor 27 IR (Bruker, Massachusetts, USA) avec le logiciel OPUS 7.2. Les spectres ont été obtenus sur une gamme de longueur d'ondes suivant des publications précédentes (Delacuvellerie *et al.*, 2021 ; Delacuvellerie *et al.*, 2023 ; Mahoney *et al.*, 2013) avec 32 balayages spectraux.

2.7.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Pour effectuer les analyses DSC, environ 5mg ($\pm 1,0$ mg) d'échantillons ont été scellés dans des micro-godets standardisés en aluminium. L'analyse a été réalisée en utilisant un DSC Q2000 (TA Instruments®, New Castle, USA) en chauffant les échantillons de MPs de -80°C à 200°C avec une rampe de chauffage de $10,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sous une atmosphère d'azote (Delacuvellerie *et al.*, 2021). La calibration de l'enthalpie et de la température a été réalisée à l'aide d'un étalon en indium. La température de fusion (T_m), la température de transition vitreuse (T_g), la cristallisation à froid (ΔH_c) et l'enthalpie de fusion (ΔH_m) ont été mesurées. Les températures d'enthalpie ont été utilisées pour calculer le pourcentage de cristallinité selon Benali *et al.* (2015) :

$$\chi_c (\%) = \frac{[\Delta H_m(t) - \Delta H_c(t)]}{\Delta H_m0} \times 100$$

Dans cette équation, χ_c représente le pourcentage de cristallinité du plastique échantillonné. $\Delta H_m(t)$ et $\Delta H_c(t)$ sont respectivement les enthalpies de fusion et de cristallisation pour le même échantillon. Enfin, ΔH_m0 est l'enthalpie de fusion caractéristique pour le polymère 100% cristallin et est de $114,0 \text{ Jg}^{-1}$ pour le PBAT (Bastarrachea *et al.*, 2010) et $293,0 \text{ Jg}^{-1}$ pour le LDPE (Morawiec *et al.*, 2005).

2.7.3. Analyse thermogravitationnelle (TGA)

La température de décomposition des MPs a été analysée en utilisant un TGA Q5000 (TA Instruments®, New Castle, USA). Pour chaque échantillon, environ 10 mg de microplastique ont été placés dans des micro-godets en aluminium. Les mesures ont ensuite été prises sous azote. La température maximale atteinte pour réaliser la dégradation complète de l'échantillon étudié (T_{peak}) a ensuite été notée afin d'évaluer l'évolution de cette température sur les différentes dates d'échantillonnage lors du vieillissement. Ceci a été fait pour les différentes conditions expérimentales (vieillissement dans de l'eau stérile ou non stérile) et pour chaque type de microplastique (LDPE ou PBAT). Étant donné qu'aucun changement de " T_{peak} " n'a été observé lors de notre expérimentation, aucune analyse supplémentaire n'a été conduite concernant la TGA.

2.8. Analyses statistiques et représentations graphiques

Les données ATR-FTIR ont d'abord été analysées à l'aide du logiciel R Studio avec le package "ChemoSpec" (Hanson, 2023). Les représentations graphiques ont ensuite été créées en utilisant les packages "ggplot2" et "cowplot". En ce qui concerne les analyses DSC, la différence entre $\Delta H_m(t)$ et $\Delta H_c(t)$ a été calculée graphiquement en utilisant le logiciel TA Universal Analysis. Les valeurs ont été transférées vers le logiciel Excel et le pourcentage de cristallinité a été calculé pour chaque

échantillon. Pour la TGA, les valeurs de Tpeak ont été transférées vers Excel et l'évolution graphique du Tpeak durant les 120 jours a été tracée pour chaque condition expérimentale pour les deux types de MPs.

En ce qui concerne les analyses des communautés microbiennes, les "estimateurs de diversité alpha" ont été calculés en utilisant le logiciel Past 4.03. Les résultats ont ensuite été tracés en utilisant le package "ggplot2" du logiciel R Studio. D'éventuelles différences significatives dans les estimateurs de diversité alpha entre les conditions expérimentales de la même date d'échantillonnage ont été évaluées avec le test de Student ou le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, en fonction des résultats de la normalité et de l'homocédasticité des variances avec le logiciel R. Un histogramme compilé des classes bactériennes les plus abondantes a été réalisé à l'aide du logiciel Excel. Les autres analyses portant sur la diversité Béta ont été réalisées en utilisant le logiciel R. Brièvement, les indices de dissimilarité des assemblages microbiens ont été calculés en utilisant la méthode Bray-Curtis comme indice de dissimilarité avec le package "vegan". Une analyse de clustering hiérarchique a été réalisée avec la méthode Ward en utilisant le package Cluster (Maechler *et al.*, 2013) et les résultats ont été tracés dans un dendrogramme en utilisant "factoextra" (Kassambara et Mundt, 2017) et "RcolorBrewer" (Neuwirth et Neuwirth, 2011). Le "Scaling" multidimensionnel non métrique (NMDS), l'analyse de la variance par permutations (PERMANOVA-Adonis) ont été réalisés en utilisant le package "vegan" (Dixon, 2003). Les espèces indicatrices potentielles d'un type de MPs ont été étudiées en utilisant le package "indicspecies" (Darvand et Esmailzadeh, 2023). Enfin, une heatmap de corrélation des 64 espèces bactériennes les plus abondantes durant l'expérience (taux de couverture > 75% de l'ensemble des séquences obtenues) a été générée en utilisant les packages "pheatmap" et "viridis". Les indices de dissimilarité (en utilisant la méthode Bray-Curtis) ont été calculés avec le package "vegan", et une clusterisation hiérarchique a été effectuée avec le package "Cluster", également en utilisant la méthode Bray-Curtis. Pour toutes les analyses statistiques, une valeur p inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1. Evolution des propriétés chimiques des MPs durant le vieillissement

Tableau 3.2 : Récapitulatif des mesures de cristallinité obtenues par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) lors de la seconde analyse thermique des MPs de PBAT et de LDPE vierges, puis vieillis durant différentes périodes (15 à 120 jours) en eau autoclavée (sans bactéries) et en eau synthétique estuarienne (composée d'eau de mer de la Manche Orientale et d'eau déminéralisée) riche en bactéries.

Type de MPs	Type d'eau	Durée de vieillissement (jours)	T _m (°C)	χ _c (%)
PBAT	Eau autoclavée	0	125	7
		15	127	7
		30	126	6
		45	126	7
		75	127	7
		105	126	6
		120	128	6
	Eau synthétique estuarienne	0	125	8
		15	126	7
		30	126	7
		45	126	7
		75	126	6
		105	126	7
		120	126	7
LDPE	Eau autoclavée	0	110,5	44
		15	111	41
		30	110	42
		45	110	45
		75	110	44
		105	110	44
		120	110	44
	Eau synthétique estuarienne	0	111	44
		15	111	42
		30	110	44
		45	111	48
		75	110	41
		105	110	41
		120	110	41

Concernant le PBAT, aucune altération dans les paramètres chimiques n'a été observée, que ce soit à travers les analyses ATR-FTIR (Annexe 3.1), DSC (Tableau 3.2) ou TGA (Annexe 3.2), et ce aussi bien durant le vieillissement en eau autoclavée qu'en eau synthétique estuarienne. Les résultats ont été similaires pour le LDPE concernant les analyses ATR-FTIR (Annexe 3.1) et TGA (Annexe 3.2). Cependant, nos résultats ont montré des changements dans la cristallinité des MPs du LDPE. En effet, pour l'échantillon de LDPE vieilli dans de l'eau autoclavée, il y a eu une diminution de la cristallinité de 44% à 41% et 42% après respectivement 15 et 30 jours de vieillissement (Tableau 3.2). Cependant, ces valeurs ne représentaient pas une tendance puisque la cristallinité tendait à rester la même qu'initialement après 75 jours et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Concernant le LDPE vieilli dans

de l'eau synthétique estuarienne, il semblait y avoir une dynamique plus significative de la cristallinité. Elle était plus élevée après 45 jours de vieillissement (48% par rapport à 44% initialement) (Tableau 3.2). Par la suite, elle a diminué et s'est stabilisée à 41% (Tableau 3.2). Cette valeur indiquait donc une cristallinité inférieure à celle initiale mesurée pour l'échantillon vierge de LDPE.

3.2. Analyse des séquences ARNr 16S

Considérant l'intégralité de l'expérience, et après normalisation et exclusion des singletons, un total de 232 995 séquences de haute qualité ($9\ 668 \pm 335$ séquences par échantillon) correspondant à 3 553 OTUs ont été identifiées. Dans l'eau estuarienne synthétique utilisée pour le vieillissement, 836 espèces bactériennes (représentées par 8 594 séquences) ont été identifiées. Après seulement 15 jours de vieillissement, les OTUs identifiées sur les microplastiques étaient majoritairement propres à cette matrice, que ce soit pour le PBAT ou le LDPE (Figure 3.1).



Figure 3.1 : Diagramme de Venn des OTUs partagées entre les communautés bactériennes du PBAT et du LDPE durant les 6 dates de vieillissement. Pour la première date d'analyse (T15), les résultats ont été comparés avec l'eau utilisée pour débuter le vieillissement. Eau vieillissement : eau utilisée pour débuter le vieillissement ; PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE. T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours).

À l'échelle des OTU, la dynamique du nombre d'OTUs était généralement la même cinétique d'évolution le PBAT et le LDPE, bien que non synchrone au niveau des dates d'études. Pour

synthétiser, nos résultats ont montré une augmentation du nombre d'OTUs à la surface des microplastiques pour le PBAT jusqu'à 45 jours après le début du vieillissement. Cela a été suivi d'une diminution (75 jours après le début) puis d'un plateau pour les deux dernières dates d'échantillonnage (Figure 3.1). Quant au LDPE, il y a eu une augmentation du nombre d'OTUs jusqu'à 30 jours après le début du vieillissement. Après 45 jours, le nombre d'OTUs a diminué, pour remonter après 75 jours et rester stable pour les deux dernières dates d'échantillonnage (Figure 3.1). Enfin, le nombre d'OTUs communes aux deux plastiques a augmenté jusqu'à 75 jours après le début de l'expérience. Par la suite, ce nombre semblait diminuer progressivement pour les deux dernières dates d'échantillonnage (Figure 3.1).

3.3. Variations des indices de diversité alpha durant l'expérience

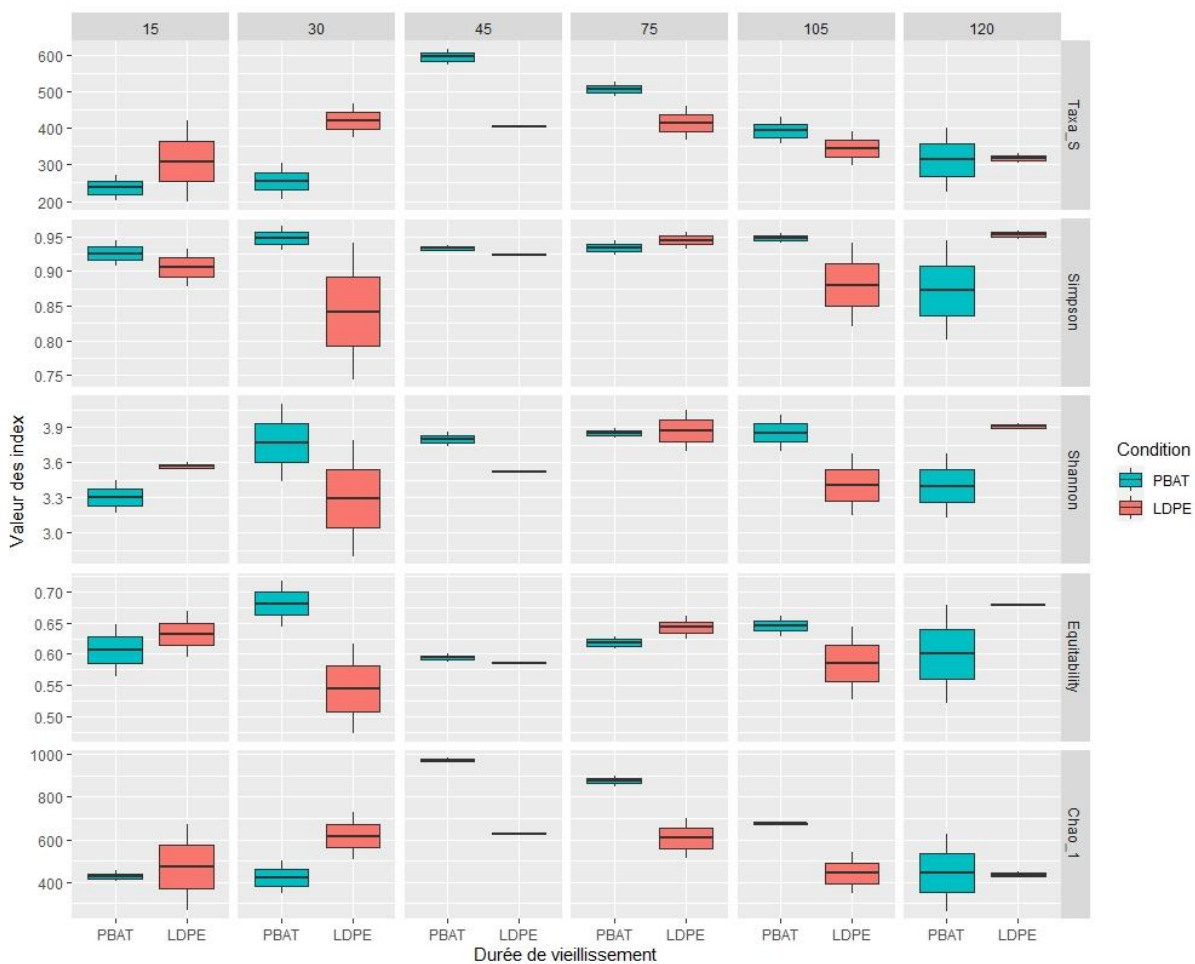


Figure 3.2 : Représentation graphique des indices de diversité alpha des taxa. Les boîtes à moustache représentent la distribution des valeurs des indices de diversity (Simpson et Shannon), de richesse (Chao 1) et de dominance (Equitabilité) pour les communautés bactériennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE aux différentes dates de vieillissement. La durée de vieillissement est exprimée en jours. PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE.

Pour chaque date de vieillissement des deux types de microplastiques (PBAT et LDPE), nos résultats n'ont démontré aucune différence statistique significative en termes de nombre de taxons (Taxa_S)

(Figure 3.2) et pour les indices de diversité alpha (Simpson, Shannon, Équitabilité, Chao 1) étudiés dans notre expérience (Figure 3.2). Cependant, il est important de noter que seul un échantillon de LDPE vieilli 45 jours était utilisable. En conséquence, aucune analyse comparative statistique avec le PBAT n'a été réalisée pour cette date d'échantillonnage.

3.4. Analyse de la structure des communautés microbiennes et effet du type de polymère

Durant l'intégralité de l'expérimentation de vieillissement mais également dans l'eau utilisée pour débiter celui-ci, les classes des Alphaproteobacteria et Gammaproteobacteria ont été prédominantes correspondant à respectivement 39,9 et 32,9% de l'ensemble des séquences (Figure 3.3).

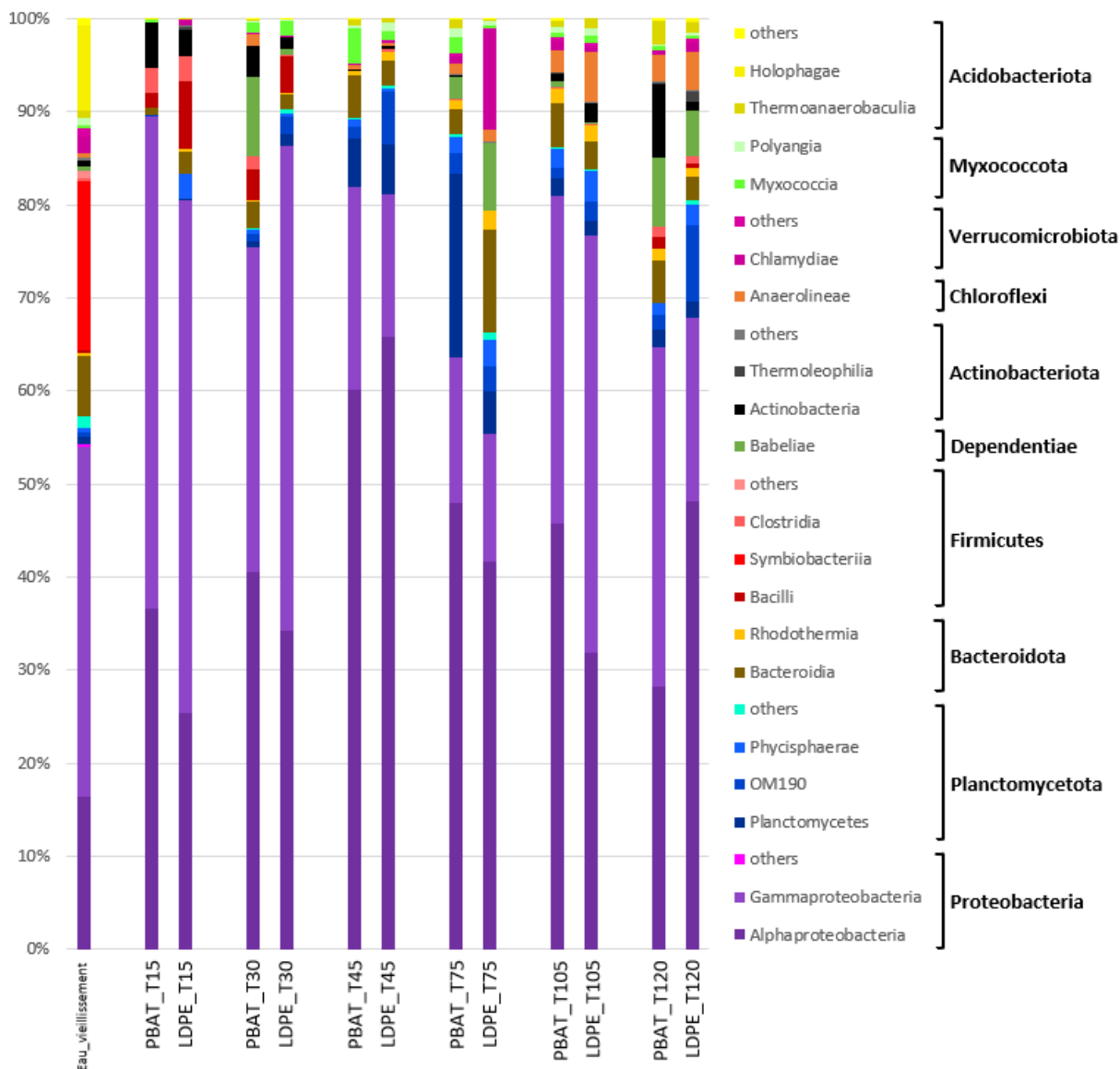


Figure 3.3 : Composition des communautés microbiennes de l'eau utilisée pour le vieillissement, du PBAT et du LDPE durant les différentes dates de vieillissement, à l'échelle de la classe phylogénétique. Les classes bactériennes ont ensuite été groupées par phylum. Les Protéobacteria ont été représentés en nuances de mauve. Les Planctomycetota en nuances de bleu, les Bacteroidota en nuances de marron, les Firmicutes en nuances de rouge, les Actinobacteriota en nuances de gris, les Verrucomicrobiota en nuances de rose, les Myxococcota en nuances de vert clair et les Acidobacteriota en nuances de jaune. Les chloroflexi et les Dependientiae sont respectivement en orange et vert. Les groupes taxonomiques représentés correspondent à 98,5% de l'ensemble des séquences du jeu de données. Eau vieillissement : eau utilisée pour débuter le vieillissement ; PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE. T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours).

Le phylum des Planctomycetota, représenté par les classes des Planctomycetes, OM190, Phycisphaerae et d'autres classes d'abondances faibles était le second phylum le plus abondant durant l'expérimentation (Figure 3.3). Ce Phylum était notamment bien représenté à partir de 45 jours de vieillissement que ce soit pour le PBAT ou le LDPE. Il en était de même pour le phylum des Bacteroidota, mais qui de plus, représentait plus de 5% de l'abondance bactérienne totale initialement présente dans l'eau (Figure 3.3). A contrario, le phylum des Firmicutes était le second phylum le plus abondant dans l'eau (20%) mais tendait à diminuer durant les différentes dates de vieillissement. Le

phylum des Dependuntiae était le 5^{ème} plus abondant durant l'expérimentation (2,5% de l'abondance totale). Son abondance était ponctuelle durant l'expérimentation. En effet, il était présent sur le PBAT après 30 jours de vieillissement, et sur les 2 types de plastique après 75 et 120 jours de vieillissement (Figure 3.3). Le phylum des Actinobacteria (2,1%) était majoritairement présent après 15 jours de vieillissement, puis tendait à diminuer jusqu'à 105 jours. Après 120 jours de vieillissement, il était de nouveau abondant, notamment sur le PBAT. Les phylums des Chloroflexi, Verrucomicrobiota, Myxococcota et Acidobacteriota étaient les phylums les moins représentés avec respectivement 1,6% ; 1,5%, 1,4% et 1,4% de l'abondance totale (Figure 3.3).

Les résultats de la classification hiérarchique (basés sur les distances de Bray-Curtis) ont révélé que les communautés microbiennes étaient principalement regroupées par date de vieillissement plutôt que par le type de microplastique (Figure 3.4). Cependant, nous avons observé que pour les deux dernières dates d'échantillonnage, le PBAT vieilli pendant 105 jours et le LDPE vieilli pendant 105 et 120 jours avaient des distances de Bray-Curtis plus faibles comparativement au PBAT vieilli pendant 120 jours, formant ainsi un seul cluster, tandis que le PBAT vieilli pendant 120 jours formait un groupe distinct à lui seul (Figure 3.4).

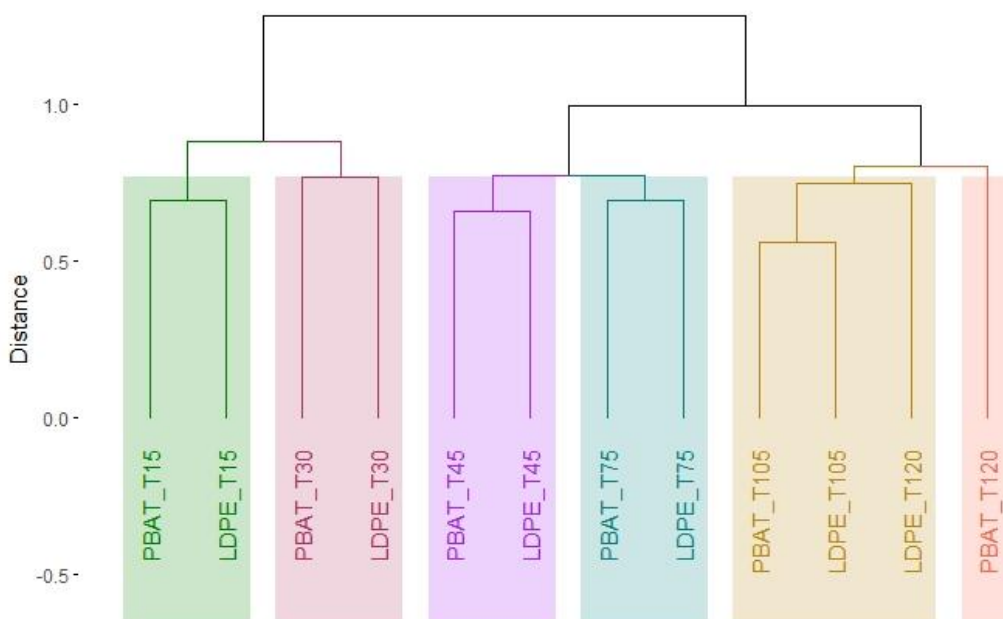


Figure 3.4 : Cluster hiérarchique des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE durant les différentes de vieillissement. La matrice de distance a été calculée par indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Les rectangles de couleur correspondent à la séparation arbitraire des différents clusters. PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE. T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours).

Pour compléter les informations fournies par le clustering hiérarchique, un graphique nMDS a également été généré avec les communautés microbiennes initialement présentes dans l'eau utilisée pour le processus de vieillissement, et à la surface des deux types de microplastiques aux différentes

dates d'échantillonnage (Figure 3.5). Premièrement, cette représentation graphique a montré une différence significative dans la structure des communautés microbiennes entre l'eau et les MPs, indépendamment du type de MPs et de la durée du vieillissement (Figure 3.5).

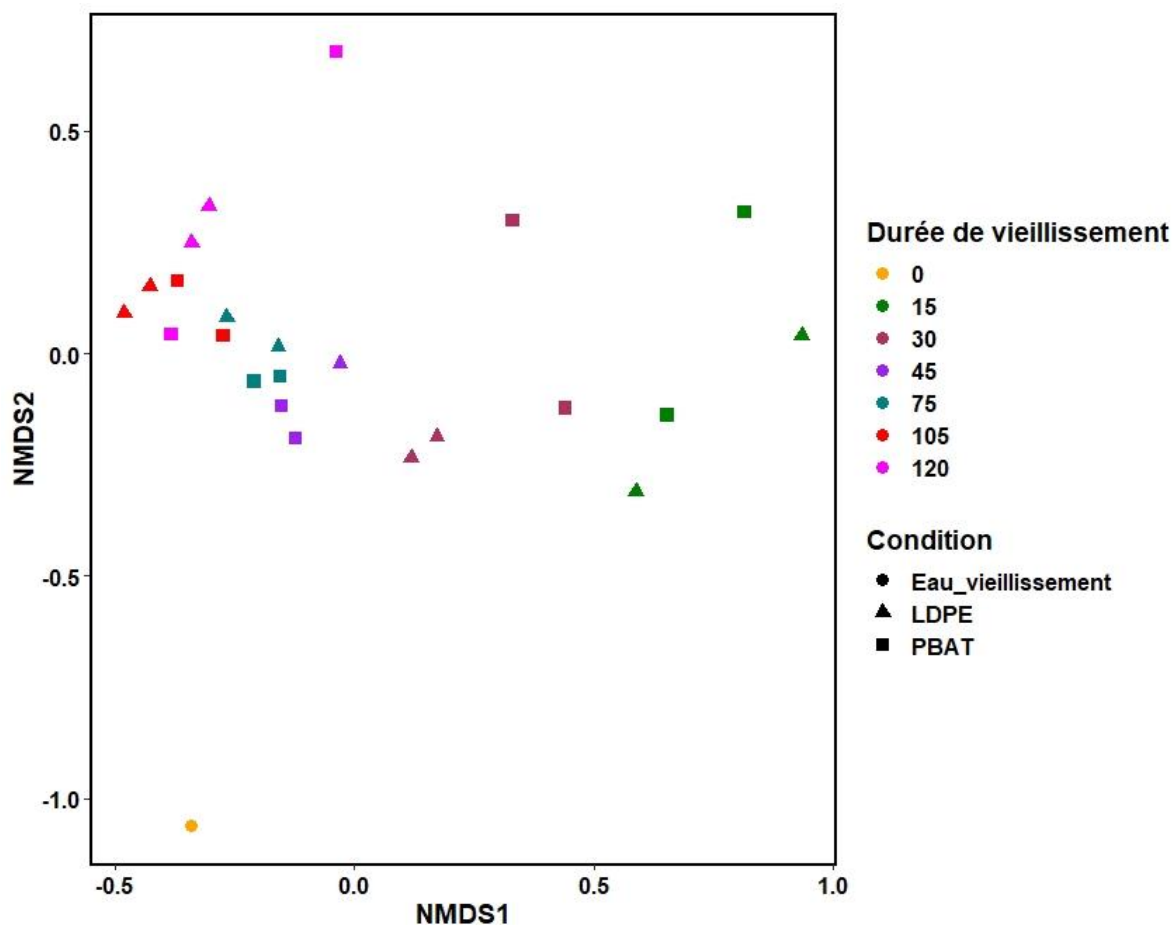


Figure 3.5 : Représentation NMDS (« Nonmetric multidimensional scaling ») des communautés microbiennes présentes initialement dans l'eau utilisée pour le vieillissement et sur les MPs de PBAT et de LDPE pour les différentes durées de vieillissement. Les couleurs de symboles correspondent aux différentes durées de vieillissement et les symboles correspondent aux conditions. Eau vieillissement : Eau utilisée pour débiter l'expérimentation de vieillissement des MPs ; LDPE : MPs de LDPE ; PBAT : MPs de PBAT ; 0/15/30/45/75/105/120 : correspondent aux différentes durées de vieillissement (en jours). La durée de vieillissement 0 fait référence au démarrage de l'expérimentation et n'est donc valable que pour l'eau.

Comme pour le clustering hiérarchique, les communautés microbiennes présentes à la surface des MPs semblaient être regroupées en fonction de la durée du vieillissement, indépendamment du type de plastique (Figure 3.5). De plus, Cette dernière représentation graphique semblait indiquer que la différence observée dans la structure de la communauté, indépendamment du type de plastique, tendait à diminuer après 45 jours de vieillissement et pour le reste de l'expérience (Figure 3.5). Afin de confirmer statistiquement les tendances rapportées par les deux représentations graphiques précédentes, des analyses PERMANOVA ont été menées. Une première PERMANOVA, basée sur toutes les dates de vieillissement des MPs, a démontré que seul le temps de vieillissement avait un impact statistique ($p < 0,0001$) sur la structuration des communautés bactériennes à la surface des

MPs. De plus, le type de MPs (LDPE ou PBAT) n'avait pas d'influence significative sur cette structuration (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE à l'échelle de l'OTU calculée par les distances de Bray-Curtis sur l'intégralité de l'expérimentation de vieillissement. Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques

	Degrés de Liberté	Somme des Carrés	Statistique-F	R ²	Valeur-p
Effets principaux					
Type de plastique	1	0.2176	0.9921	0.03561	0.3937
Durée de vieillissement	1	1.5580	7.1023	0.25494	0.0001***
Type de plastique x Durée de vieillissement	1	0.1677	0.7643	0.02743	0.6843
Résidus	19	4.1679		0.68201	
Total	22	6.1112			1

*valeur-p <0,05, **valeur-p<0,01, ***valeur-p<0,001 – seuils de significativité statistique. Permutations n = 9999

Comme il semblait y avoir un changement dans les communautés microbiennes à partir de la durée de vieillissement de 45 jours, comme observé dans le graphique nMDS, nous avons également mené une PERMANOVA avec seulement les deux premières dates de vieillissement (c.-à-d. après 15 et 30 jours de vieillissement) (Tableau 3.4) et les dates après 45 jours (c.-à-d., 45, 75, 105 et 120 jours) (Tableau 3.5).

Tableau 3.4 : résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE à l'échelle de l'OTU calculée par les distances de Bray-Curtis sur les deux premières dates de vieillissement (15 et 30 jours). Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.

	Degrés de Liberté	Somme des Carrés	Statistique-F	R ²	Valeur-p
Effets principaux					
Type de plastique	1	0.20163	1.1974	0.12908	0.2585
Durée de vieillissement	1	0.48708	2.8924	0.31181	0.0099**
Type de plastique x Durée de vieillissement	1	0.19979	1.1864	0.12790	0.2720
Résidus	4	0.67360		0.43121	
Total	7	1.56210			1

*valeur-p <0,05, **valeur-p<0,01, ***valeur-p<0,001 – seuils de significativité statistique. Permutations n = 9999

Étonnamment, pour les deux premières dates d'échantillonnage, seule la date de vieillissement avait un impact significatif ($p < 0,01$) sur les communautés bactériennes (Tableau 3.4). Il en allait de même pour les dates d'échantillonnage après 45 jours ($p < 0,001$) (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : résultats de la PERMANOVA (ADONIS) réalisée sur la structure des communautés microbiennes présentes à la surface des MPs de PBAT et de LDPE à l'échelle de l'OTU calculée par les distances de Bray-Curtis sur les dates de vieillissement ultérieures à 30 jours (45, 75, 105 et 120 jours). Les seuils de significativité sont indiqués par les astérisques.

	Degrés de Liberté	Sommes des Carrés	Statistique-F	R ²	Valeur-p
Effets principaux					
Type de plastique	1	0.19777	1.05554	0.06711	0.3762
Durée de vieillissement	1	0.55449	2.9592	0.18816	0.0004***
Type de plastique x Durée de vieillissement	1	0.13344	0.7121	0.04528	0.7876
Résidus	11	2.06118		0.69945	
Total	14	2.94688			1

*valeur-p <0,05, **valeur-p<0,01, ***valeur-p<0,001 – seuils de significativité statistique. Permutations n = 9999

Afin d'obtenir une compréhension plus précise des communautés bactériennes à l'échelle des espèces, une heatmap mettant en vedette les 64 espèces bactériennes les plus abondantes en termes de séquence (correspondant au total à > 75% de l'ensemble des séquences de toutes les OTUs) durant l'expérience a été générée (Figure 3.6).

D'une vue globale, la classification hiérarchique (basée sur les distances de Bray-Curtis) des abondances relatives des principales espèces bactériennes semblait mettre visuellement en évidence trois groupes majeurs eu égard aux abondances relatives des espèces bactériennes durant l'expérimentation. Le premier était unique à l'eau utilisée pour le vieillissement des MPs (rectangle vert – Figure 3.6) et était composé de 7 espèces fortement abondantes, principalement issues des Gammaproteobacteria (3 espèces non répertoriées et *Gammaproteobacterium DH-1645*), des Bacteroidia (*Flexibacteraceae bacterium DG1232*), des Holophagae, et des Symbiobacter (Figure 3.6). Ensuite, nous avons observé un second groupe (rectangle rouge – Figure 3.6) au sein duquel nous avons trouvé plusieurs espèces qui étaient prédominantes, échantillonnées sur le PBAT et le LDPE après 15 et 30 jours de vieillissement. Pour le PBAT vieilli de 15 jours, nous avons identifié 3 genres bactériens abondants : *Motiliproteus*, *Paracoccus*, et *Finegoldia* (Figure 3.6), qui appartiennent respectivement aux classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, et Clostridia. Pour le LDPE vieilli 15 jours, nous avons également trouvé le genre *Motiliproteus*, hautement abondant, ainsi que l'espèce bactérienne *Bacterium CWISO21* (Gammaproteobacteria), suivie par le genre *Corynebacterium* (Actinobacteria) (Figure 3.6). Après 30 jours de vieillissement, pour le

PBAT, nous avons détecté dans ce groupe les genres abondants *Candidatus*, *Endoecteinascidia* (Gammaproteobacteria) et *Bacillus* (Bacilli). Nous avons également observé que le genre le plus abondant se trouvait dans le 3ème groupe (rectangle orange – Figure 3.6), dont nous discuterons juste après, avec *UBA12409* (Babeliae). Pour le LDPE, *Candidatus Endoecteinascidia* était également abondant, juste après le genre *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria). Après 45 jours de vieillissement, indépendamment du type de plastique, il semblait y avoir un basculement durant lequel les abondances des principales espèces bactériennes semblaient relativement égales entre celles des 2ème et 3ème groupe. Cependant, nous avons noté que le genre *Ulviabacter* (Bacteroidia) était légèrement plus dominant par rapport aux autres espèces (Figure 3.6). Pour le LDPE, la classe bactérienne OM190 (Planctomycetota non répertorié) du 2ème groupe et le genre *Methylobacterium* (Alphaproteobacteria) du troisième groupe restaient les plus abondants à cette date de vieillissement. Enfin, à partir de 75 jours de vieillissement des MPs, nous pouvions voir que les espèces bactériennes les plus abondantes appartenaient exclusivement au 3ème groupe (Figure 3.6).

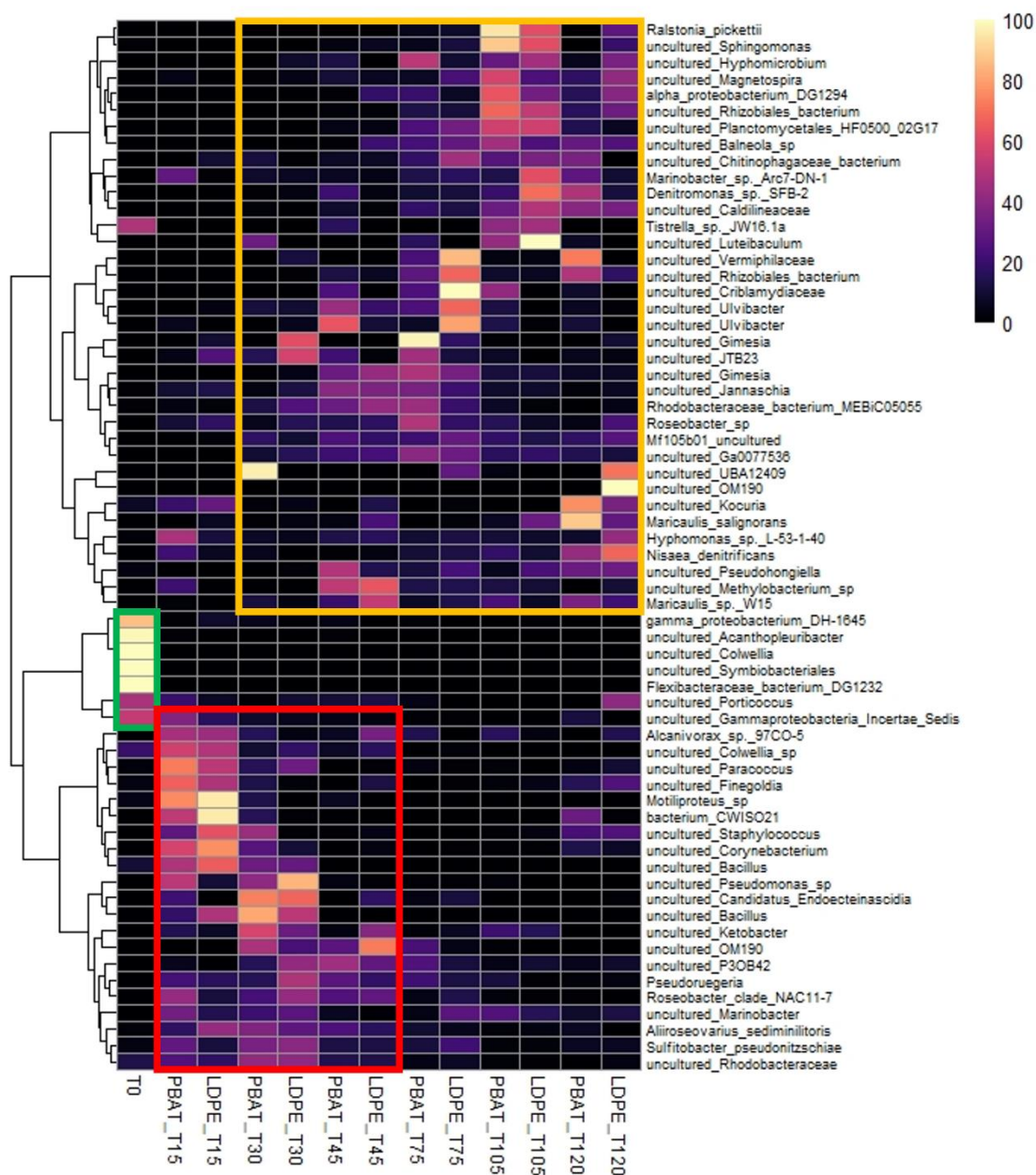


Figure 3.6 : Heatmap des 64 espèces les plus abondantes (recouvrement > 75%) échantillonnées et séquencées dans l'eau utilisée pour débuter le vieillissement et à la surface des MPs de PBAT et de LDPE durant l'intégralité de l'expérimentation de vieillissement. Les rectangles de couleur correspondent à la séparation arbitraire des différents groupes logiques d'espèces eu égard à leurs abondances durant l'expérimentation. T0 : Eau utilisée pour débuter le vieillissement ; PBAT : MPs de PBAT ; LDPE : MPs de LDPE ; T15/30/45/75/105/120 correspondent aux différentes durées de vieillissement des MPs (en jours).

Le genre *Gimesia* (Planctomycetota) était massivement dominant sur le PBAT après 75 jours de vieillissement. Pour le LDPE, nous avons d'abord trouvé que la famille Criblamydiaeae (Chlamydia) était la plus abondante, suivie par la famille Vermiphilaceae (Babeliae) et le genre *Ulvibacter* (Bacteroidia) (Figure 3.6). Après 105 jours, nous avons remarqué que les espèces bactériennes les plus abondantes étaient relativement similaires. Cependant, nous pouvons conclure que l'espèce *Ralstonia pickettii* (Betaproteobacteria) et le genre bactérien *Sphingomonas* (Alphaproteobacteria) étaient prédominants (Figure 3.6). Pour le LDPE, le genre *Luteibaculum*

(Bacteroidia) était prédominant. À la dernière date d'échantillonnage, le PBAT était principalement composé de l'espèce *Maricaulis salignorans* (Alphaproteobacteria) et du genre *Kocuria* (Actinobacteria). Pour le LDPE, une deuxième espèce de la classe bactérienne OM190 (Planctomycetota non répertorié) et le genre *UBA 12409* (Babeliae) étaient les plus abondants (Figure 3.6).

Afin de déterminer les espèces potentiellement spécifiques à chaque type de MPs durant l'expérience de vieillissement, nous avons conduit une analyse des espèces indicatrices présentes sur le PBAT et le LDPE en utilisant le package "Indicspecies" du logiciel R Studio. En combinant toutes les dates de vieillissement (de 15 jours à 120 jours), cette analyse a identifié 25 espèces dont l'abondance était statistiquement différente entre le PBAT et le LDPE. Parmi ces 25 espèces, 10 étaient caractéristiques du PBAT et 15 du LDPE. Concernant le PBAT, la majorité des espèces appartenaient à la classe des Alphaproteobacteria (5 espèces), suivies par la classe des Gammaproteobacteria (3 espèces), et une espèce chacune pour les classes Sumerlaeia et Thermoanaerobaculia. Six espèces de ces classes sont inconnues. Cependant, *Aliiroseovarius sediminilitoris*, *Sulfitobacter pseudonitzschiae*, et la bactérie *CSR-58*, toutes trois de la classe des Alphaproteobacteria, ainsi que *Marinobacter sp. Arc7-DN-1* (Gammaproteobacteria), ont été identifiées comme espèces indicatrices se fixant préférentiellement sur ce type de plastique. Parmi les 15 espèces spécifiques au LDPE, 5 appartiennent à la classe phylogénétique des Alphaproteobacteria, 3 aux Bacilli, 2 aux Bacteroidia et Gammaproteobacteria, puis une espèce aux Phycisphaerae, 1 aux BD7-11 (phylum des Planctomycetota), et 1 à une classe inconnue (phylum des WPS-2). Les espèces bactériennes sont majoritairement (12 sur 15 espèces) inconnues. Cependant, nous avons trouvé *Thioclava dalianensis* issue des Alphaproteobacteria, *Lactococcus lactis* (Bacilli), et la bactérie *Flexibacteraceae DG1392* issue des Bacteroidia.

4. Discussion

Ces dernières années, notamment avec l'introduction des polymères "biodégradables" sur le marché, des études ont été menées sur la dégradation des plastiques dans les conditions marines (Delacuvellerie *et al.*, 2021 ; Liao et Chen, 2021 ; Royer *et al.*, 2023). Ces études se sont concentrées sur des échantillons macroscopiques de plastiques. Cependant, certaines études ont démontré que certaines caractéristiques des plastiques (taille, forme) (frère *et al.*, 2018) ainsi que la nature chimique du plastique (Dussud *et al.*, 2018) influencent la nature de la plastisphère présente à leur surface (diversité, abondance, activité). Elles affectent donc potentiellement le taux de biodégradation (Jacquin *et al.*, 2019). Au vu de ces éléments, nous avons établi dans cet article une première étape afin de mieux évaluer l'évolution des paramètres chimiques du PBAT et du LDPE, notamment via l'utilisation de ces deux plastiques sous forme de MPs de quelques micromètres. De plus, nous avons

examiné les communautés microbiennes sur leurs surfaces respectives dans des conditions mimant les conditions estuariennes. Concernant l'évolution des paramètres chimiques, il a été observé pour le PBAT qu'après 120 jours de vieillissement, aucune différence n'a pu être détectée par DSC, ATR FTIR, et TGA. Delacuvellerie *et al.* (2021) ont rapporté des résultats similaires (TGA non testé) après immersion de macro-disques de PBAT pendant 82 jours dans la zone euphotique de la colonne d'eau méditerranéenne. Cependant, une légère détérioration de ce plastique a été décrite par les auteurs en utilisant des mesures de perte de poids et de poids moléculaire. Les chercheurs de ce groupe ont attribué ces légères modifications probablement à la photooxydation des échantillons (Delacuvellerie *et al.*, 2021). A contrario, une publication récente de ce même groupe a rapporté une dégradation significative du PBAT après une longue immersion (260 jours) en conditions marines comparativement à deux types de PLA et au PS (Delacuvellerie *et al.*, 2023).

Concernant le LDPE, seules les analyses DSC ont révélé des résultats différents et un effet potentiel des communautés bactériennes sur la surface du LDPE. En effet, une diminution de la cristallinité (de 44 % à 41 %) a été observée dans les MPs de LDPE vieillis 120 jours dans l'eau non autoclavée par rapport au LDPE vierge. Ce résultat semble surprenant. En effet, des études précédentes qui ont examiné les paramètres DSC du LDPE soumis au vieillissement ont montré le phénomène inverse : la dégradation de la région amorphe conduisant à une augmentation de la cristallinité du plastique (Delacuvellerie *et al.*, 2021 ; Miranda *et al.*, 2021). Afin de mieux comprendre le potentiel des communautés bactériennes à dégrader les plastiques biodégradables (PBAT) ou non biodégradables (LDPE) lorsqu'ils sont sous forme de MPs, nous avons étudié ces communautés présentes à la surface de chaque type de MP à différentes dates de vieillissement en utilisant le séquençage des amplicons de l'ARNr 16S. Pour les indices de diversité alpha (Simpson et Shannon), l'équitabilité et la dominance (Chao 1), notre étude comparative entre PBAT et LDPE n'a révélé aucune différence statistique pour les différentes dates de vieillissement. Il est à noter que les indices n'ont pas été testés statistiquement pour 45 jours de vieillissement en raison de la perte d'un échantillon de LDPE. Ce résultat s'aligne une fois de plus avec l'étude de Delacuvellerie *et al.* (2021). En effet, aucune différence significative n'a été mise en évidence dans cette étude après vieillissement dans un environnement naturel durant 82 jours entre plusieurs plastiques, y compris le PBAT et le LDPE. Un résultat comme celui-ci n'est pas surprenant, car de tels estimateurs sont statistiquement sensibles uniquement aux grandes variations de l'abondance et de la diversité des communautés bactériennes. D'un point de vue global, nos résultats suggèrent que la diversité initialement présente dans l'eau synthétique estuarienne utilisée pour commencer le processus de vieillissement était supérieure à celle échantillonnée à la fois sur le PBAT et le LDPE après 15 jours de vieillissement. Ce résultat semble indiquer qu'à partir d'un "pool" de bactéries libres dans l'eau, seulement certaines auront la capacité de s'établir en tant que biofilms à la surface des particules de plastique. En effet, cette différence de

structure entre les communautés libres dans l'eau et à la surface des plastiques a déjà été démontrée dans les environnements aquatiques (Hoellein *et al.*, 2014) et dans les milieux marins (Dussud *et al.*, 2018). Ces espèces capables de s'établir à la surface des plastiques sont appelées colonisateurs primaires. Les classes phylogénétiques des Alphaproteobacteria et Gammaproteobacteria sont d'ailleurs extrêmement dominantes pour la première date de vieillissement étudiée et le demeurent jusqu'à la fin de l'expérimentation, sans surprise eu égard à leur réputation de colonisateurs primaires (De Tender *et al.*, 2015) qui a été confirmé par plusieurs études indépendamment de la nature du polymère colonisé (Oberbeckmann *et al.*, 2015 ; Cheng *et al.*, 2021 ; Delacuvellerie *et al.*, 2021, Delacuvellerie *et al.*, 2023). Pour les premières dates de vieillissement, la dynamique du phylum des Firmicutes est intéressante. L'histogramme de composition des communautés bactériennes nous a permis de conclure que cette classe était relativement abondante (environ 20%) dans l'eau utilisée pour le vieillissement, s'établissait sur les 2 types de plastiques après 15 jours de vieillissement malgré une diminution de l'abondance puis se trouvait en très faible abondance pour les durées de vieillissement ultérieures. Dans leur étude, Delacuvellerie *et al.* (2021) avaient trouvé une abondance importante de ce phylum sur les échantillons de plastiques vieillis en milieu naturel sur le sédiment comparativement aux échantillons vieillis dans la colonne d'eau. Ceci pourrait s'expliquer par une sensibilité plus élevée de ce phylum bactérien aux UV émis par la rampe led utilisée durant l'expérimentation afin de simuler le rythme jour nuit. De plus le système de pompage et stockage d'eau de la Manche Orientale utilisé afin d'obtenir l'eau utilisée pour le vieillissement préserve l'eau majoritairement en absence de lumière, ce qui expliquerai son abondance importante dans l'eau échantillonnée et sa diminution brutale. Également, il se pourrait que la température calibrée pour l'expérimentation soit également un facteur ne correspondant pas aux préférences des Firmicutes, rendant ce phylum moins compétitif que d'autres phylums bactériens et donc son éviction quasi totale durant l'expérimentation. Ces hypothèses pourraient également expliquer la dynamique d'abondance du phylum des Actinobacteriota qui suit la même cinétique. Le phylum des Bacteroidota (anciennement Bacteroidetes), décrit comme renfermant des espèces colonisatrices secondaires (De Tender *et al.*, 2015) suit également une dynamique logique pour notre expérimentation eu égard à la littérature (Cheng *et al.*, 2021 ; Delacuvellerie *et al.*, 2021). Bien que moins décrite comme colonisatrice secondaire, le phylum des Planctomycetota apparait en abondance relativement importante après 45 jours de vieillissement par rapport aux dates ultérieures. Un résultat similaire a été décrit par Cheng *et al.* (2021), pour lequel ce phylum est très représenté après 30 jours de vieillissement comparativement à 3 et 10 jours. Comparativement aux études précédentes s'étant intéressé au sujet de la dynamique des communautés bactériennes s'établissant à la surface des plastiques, certaines classes identifiées durant notre expérimentation n'ont pas été décrites dans ces études. Parmi elles, nous avons détecté la classe Babeliae. Cette classe fait partie du phylum

Dependentiae, peu connu encore aujourd'hui. Il est cependant admis que les bactéries de ce phylum sont dépendantes d'un hôte protiste (Weisse *et al.*, 2022). Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence de protistes dans nos échantillons, provenant de l'eau de la Manche Orientale utilisée comme eau de vieillissement. La classe des Anaerolineae (Chloroflexi) semble s'établir en tant que colonisateur secondaire de manière pérenne sur les 2 types de plastiques malgré une très faible abondance dans l'eau initiale. Cette classe semble réaliser le même mécanisme de sélection d'un support pour s'établir avec d'autres classes sous forme de biofilm. En effet, une étude comparative entre l'eau de deux rivières et des MPs échantillonnés dans ces rivières a permis de démontrer que les MPs servaient comme « hotspot » de la diversité microbienne avec, entre autres, une surreprésentation d'Anaerolineae comparativement à l'eau (Wang *et al.*, 2020). Cette hypothèse semble également robuste concernant le phylum des Myxococcota.

En ce qui concerne l'organisation de ces communautés bactériennes, et notamment les facteurs influençant leur dynamique, la représentation nMDS et le regroupement hiérarchique ont montré que la dynamique de ces communautés est globalement drivée par le temps de vieillissement plutôt que par le type de MPs sur lesquels elles sont établies. De plus, Cette représentation graphique semble indiquer que les différences de composition des communautés bactériennes tendent à devenir de plus en plus faibles au fur et à mesure du vieillissement. Les analyses statistiques par PERMANOVA nous ont permis de conclure que seul le temps de vieillissement avait un impact significatif sur ces communautés bactériennes. Plus surprenant, cette conclusion était également vraie pour les dates de vieillissement les plus précoces. L'influence de la nature du polymère sur les communautés microbiennes ne fait toujours pas consensus. En effet, certaines études ont signalé des différences significatives de composition de communautés bactériennes entre différents types de plastiques en utilisant un même protocole de vieillissement. Par exemple, Dussud *et al.* (2018) ont observé des différences taxonomiques entre les plastiques biodégradables (AA-OXO, PHBV) et les plastiques non biodégradables (PE, OXO) après 6 semaines de vieillissement, avec une richesse taxonomique notablement supérieure pour les plastiques biodégradables. Un résultat similaire a été décrit dans une étude récente se concentrant sur le vieillissement à long terme dans des conditions simulant l'environnement marin pour plusieurs plastiques, y compris le PBAT. De plus, les auteurs ont démontré un impact statistiquement significatif du type de polymère sur les communautés microbiennes pour un temps de vieillissement s'étendant jusqu'à 260 jours (Delacuvellerie *et al.*, 2023). Contrairement à ces études, Delacuvellerie *et al.* (2021) n'ont observé aucune différence significative au sein des communautés microbiennes induite par le type de plastique. Dans notre étude plus spécifiquement, nous avons mis en évidence des espèces bactériennes qui étaient considérées comme des espèces indicatrices pour le PBAT ou le LDPE pendant le vieillissement. En ce qui concerne le PBAT, la moitié d'entre elles étaient des espèces inconnues appartenant à la classe

bactérienne des Alphaprotéobacteria, mais aussi des Gammaproteobactéria. Ce résultat n'est pas surprenant, car ces deux classes bactériennes sont considérées comme les principaux colonisateurs primaires des plastiques (De Tender *et al.*, 2015 ; Oberbeckmann *et al.*, 2015). Au sein de la première classe bactérienne mentionnée, les espèces *Bacterium CSR-58*, *Aliiroseovarius sediminilitoris*, et *Sulfitobacter pseudonitzschiae* ont été formellement identifiées par séquençage. Aucune donnée bibliographique n'était utilisable pour les deux premières espèces mentionnées pour notre étude. Cependant, *Sulfitobacter pseudonitzschiae* est une bactérie à Gram négatif qui a été isolée de la diatomée marine toxique *Pseudo-nitzschia* (Hong *et al.*, 2015). L'hypothèse de la présence de cette espèce dans nos échantillons pourrait être liée à l'eau utilisée pour le vieillissement (composée d'eau de la Manche orientale). En effet, cette diatomée a déjà été échantillonnée sur ces côtes (Klein *et al.*, 2010). Ce résultat est à prendre avec précaution. En outre, notre méthode d'isolement des MPs pourrait expliquer que cette bactérie associée à *Pseudo-nitzschia* était trivialement présente dans l'eau de vieillissement. Cependant, il se pourrait également, comme cette espèce semble indicatrice du PBAT dans nos résultats, que les légères différences de communautés bactériennes entre LDPE et PBAT, promeut sur ce dernier un développement plus important de la diatomée *Pseudo-nitzschia* ce qui expliquerait la présence de cette bactérie associée. Lors d'une expérimentation en conditions marines, Cheng *et al.* (2021) ont reporté un bloom de cette diatomée toxique sur des échantillons de plastiques de PE et de PLA mais pas dans l'eau après 66 jours de vieillissement. Ils en ont conclu que cette diatomée ne s'installait et se développait, seulement qu'en présence d'un biofilm mature (Cheng *et al.*, 2021). La dernière espèce bactérienne identifiée comme une espèce indicatrice sur le PBAT était *Marinobacter sp. Arc7-DN-1*. Cette espèce appartient à la classe des Gammaproteobacteria. Elle a été décrite comme dénitrifiante, capable de se développer sur une large gamme de températures (0-30°C) et de salinités (15-90%) (Meng *et al.*, 2019). Il est intéressant de trouver cette espèce comme indicatrice du PBAT. En effet, Li *et al.* (2023) ont démontré lors d'expérimentations que l'ajout de MPs de PBAT dans le sol avait pour effet de diminuer la concentration de NO_3^- et de NH_4^+ dans le milieu. Ceci pourrait indiquer que des espèces dénitrifiantes sont capables de se fixer préférentiellement sur le PBAT et ainsi modifier le cycle de l'azote du milieu environnant (Li *et al.*, 2023). Les mécanismes favorisant cette liaison sont cependant inconnus.

Concernant le LDPE, 15 espèces ont été considérées comme indicatrices sur ce type de plastique. Les classes les plus présentes étaient celles des Alphaproteobacteria, des Bacilli, des Bacteroidia, des Gammaproteobacteria, des Phycisphaerae, des BD7-11 et d'une classe non répertoriée avec respectivement cinq, trois, deux, deux, et une espèce chacune pour les 3 dernières classes citées. Comme pour le PBAT, les espèces non cultivées étaient prédominantes avec un total de 12 espèces. Nous avons cependant détecté l'espèce *Thioclava dalianensis*. Même si les recherches sur les mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation du PE n'en sont qu'à leur début, cette

espèce marine a été décrite de par sa faculté à exprimer des hydrolases, des oxydoréductases mais également d'autres enzymes encore inconnues capables de dégrader le polyéthylène téréphtalate (PET) (Wright *et al.*, 2021). En outre, des publications ont identifié *Rhodococcus ruber* (Santo *et al.*, 2013) et *Rhodococcus opacus* (Zampolli *et al.*, 2021), 2 espèces marines capables de synthétiser des laccases et alcane hydroxylase pouvant dégrader le PE (Santo *et al.*, 2013 ; Zampolli *et al.*, 2021). Comme ces 2 espèces décrites dans la littérature, mais aussi *Thioclava dalianensis* synthétisent des oxydoréductases, il se pourrait que cette dernière espèce soit capable de dégrader le PE et pourrait ainsi compléter la courte liste actuelle des espèces capables de dégrader ce polymère (Lee *et al.*, 2023).

Chapitre IV. Conclusions et perspectives

Résultats principaux et limites des études.

Durant la première partie de cette thèse, nous avons mis en place des méthodes permettant une identification rapide d'une large gamme de MPs ingérés chez l'espèce *Eurytemora affinis* en laboratoire mais aussi chez cette espèce de copépode prélevée en milieu naturel. Concernant la partie en laboratoire, la confirmation de l'ingestion de MPs < 10µm grâce au marquage au Nile Red était un élément « clé » pour notre expérimentation d'exposition de MPs de cet ordre de taille chez *E. affinis*. En effet, cette interaction nous a permis de conclure que les effets observés des MPs sur le microbiote d'*E. affinis* pouvaient provenir d'une interaction externe entre les 2 matrices mais également interne par la voie de l'ingestion. Malgré une rapidité d'identification des MPs marqués au Nile Red indéniable dans certaines conditions, nous avons démontré que cette méthode n'était pas utilisable chez la matrice copépode prélevée in situ, qui plus est lorsque les MPs ingérés sont de l'ordre de taille de quelques micromètres. A ce titre, nous avons construit et validé une seconde méthode utilisable pour quantifier l'imprégnation en MPs d'*E. affinis* en milieu naturel même lorsque ceux-ci sont inférieurs à 10µm. Concernant cette dernière, nos résultats préliminaires semblent suggérer une sous-estimation du nombre de MPs ingérés par le modèle copépode dans d'autres écosystèmes bien plus impactés par la contamination en MPs du milieu que le point d'échantillonnage dans l'estuaire de la Seine d'où provenaient les individus analysés dans nos travaux. La limite de détection des autres méthodologies appliquées pour répondre à cette question pourrait en être la cause. Également, nous avons employé un protocole de digestion enzymatique des copépodes, plus respectueux des MPs sensibles aux pH faibles, comparativement aux digestions par attaques acides décrites dans la littérature. Il est cependant important de notifier qu'en l'état, cette méthode ne permet pas d'estimer l'imprégnation en MPs de PLA. Pour rappel, l'attaque enzymatique utilisée pour digérer la matière organique digère également le PLA. Comme ce bioplastique est l'un des plus utilisés sur ce marché, il est indispensable de trouver une solution permettant son identification lors d'échantillonnage de copépodes du milieu naturel. L'une des pistes à prioriser, eu égard aux avantages de la protéinase K par rapport à d'autres agents actifs sur les plastiques sensibles aux pH bas, serait de potentiellement diminuer la durée d'incubation de l'étape de digestion enzymatique afin de diminuer l'action de la protéinase K sur le PLA. Également, ce protocole pourrait être testé sur d'autres bioplastiques et ainsi anticiper la détection possible de ces nouveaux plastiques pouvant atteindre le milieu naturel et l'impacter dans le futur.

Lors de l'exposition multigénérationnelle comparative entre le PBAT, représentant des bioplastiques et le LDPE, représentant des plastiques persistants, nous avons tout d'abord démontré que le microbiote peut également être utilisé pour décrire l'impact des MPs sur le modèle copépode, et ce, afin de toujours mieux comprendre l'interaction entre ce modèle d'étude et ce contaminant. Nos

résultats nous ont permis de conclure que dans nos conditions, non seulement le PBAT a affecté le microbiote d'*E. affinis*, mais également que les modifications de ce microbiote étaient statistiquement les mêmes que celles induites par le LDPE. L'hypothèse mise en valeur par ces résultats serait que quelque soit la nature polymérique des MPs, leur stress physique sur le copépode est l'élément majeur provoquant l'impact à l'échelle du microbiote. En prolongeant ce raisonnement, nous pourrions donc émettre l'hypothèse que l'utilisation du PBAT dans l'optique de remplacer le LDPE n'aurait potentiellement aucun bénéfice en milieu naturel pour ce copépode. Il y a cependant une limite à prendre en compte. En effet, même si nos résultats nous ont permis de conclure que le PBAT n'avait pas d'effets moindres comparativement au LDPE lors d'une hypothétique exposition sur le microbiote d'*E. affinis*, il est primordial de mettre en perspective cette conclusion. En outre, nos essais ont été réalisés dans des conditions contrôlés en laboratoire, notamment concernant le vieillissement des lots de plastiques. Or, même si les recherches n'en sont qu'à leur début sur la thématique de la Plastisphère, il est clair qu'une seule espèce bactérienne pathogène ou toxique pouvant se développer préférentiellement sur un type de plastique persistant plutôt qu'un bioplastique pourrait totalement modifier l'équilibre de la balance risque-bénéfice des bioplastiques. Eu égard aux très faibles différences de Plastisphères entre le LDPE et le PBAT décrites durant l'expérimentation de vieillissement, nous ne pouvons pas émettre de conclusion quant à cette hypothèse. Dans le même esprit, il ne faut pas généraliser les résultats obtenus sur le PBAT, bioplastique d'intérêt dans notre étude, avec les autres alternatives possibles pour lesquels la recherche doit encore progresser.

Enfin, lors de l'expérimentation de vieillissement du PBAT et du LDPE en conditions estuariennes, nous avons démontré que même sous forme de MPs, aucune dégradation significative n'a été mise en lumière après 120 jours. Il est admis dans la littérature qu'à l'instar des plastiques persistants, la dégradation des plastiques biodégradables entraîne une fragmentation sous forme de MPs. Pour rappel, la notion de biodégradabilité pour qu'un plastique soit biodégradable est régit par la norme Afnor NF EN 13432, qui indique que plus de 90% du matériau doit être dégradé en moins de 6 mois en compost industriel. Même si notre expérimentation ne s'est pas étendue sur 6 mois comme imposé par cette norme, nos résultats tendent à indiquer pour le PBAT, comme de précédentes études réalisées sur des macroéchantillons de ce bioplastique, qu'il peut s'avérer être persistant dans l'environnement et impacter les premiers maillons des réseaux trophiques sous forme de MPs.

Sur le sujet des dynamiques microbiennes, nos résultats ont montré, à l'instar d'autres études, que cette dynamique était majoritairement drivée par le facteur temps et non pas par le type de plastique. Cependant, nos résultats ont mis en lumière certaines espèces bactériennes indicatrices du PBAT ou du LDPE. Parmi ces espèces, nous avons notamment mis en lumière dans nos conditions l'espèce *Thioclava dalianensis* sur le LDPE. Cette espèce possède des enzymes très proches d'autres bactéries pour lesquelles leur capacité à dégrader le LDPE a été démontrée. Un isolement de celle-ci et une

recherche plus approfondie pourrait permettre d'ajouter cette espèce à la liste de celles déjà décrites comme capables de dégrader ce plastique.

Dans un contexte dans lequel la recherche d'espèces bactériennes capables de dégrader les plastiques ou encore potentiellement dangereuses ou toxiques pour les biotopes et biocénoses est en vogue. Nos résultats peuvent donner une première indication d'espèces intéressantes pouvant interagir spécifiquement avec le PBAT ou le LDPE en conditions estuariennes.

Perspectives

Eu égard à la méthodologie de marquage au Nile Red des MPs avant ingestion par *E. affinis*, cette méthode pourrait s'avérer utile afin d'étudier l'écotoxicité de la gamme des bioplastiques proposés sur le marché sur le modèle copépode à l'instar des plastiques persistants connus. En effet, cette méthode rapide de marquage s'est avérée utilisable sur le PLA dans nos travaux. Dans la même logique, elle pourrait également l'être avec d'autres bioplastiques et ainsi donc permettre un suivi relativement aisé de l'interaction entre copépodes et MPs afin de répondre à certaines questions concernant l'adhésion sur les parties externes du copépode (appendices de nage, de nourrissage, cuticule) ou encore l'ingestion des MPs. En ce qui concerne la méthodologie permettant la caractérisation des MPs chez *E. affinis* échantillonné dans l'estuaire de la Seine, la perspective à court terme concerne l'analyse plus en détail de l'imprégnation de cette espèce dans l'estuaire. A ce titre, nous possédons au laboratoire des individus échantillonnés dans deux autres stations situées en aval de l'échantillon utilisé dans les travaux de cette thèse. En utilisant notre méthodologie sur un pool plus important de copépodes mais également aux autres stations d'échantillonnage, nous pourrions analyser de manière plus étendue et plus robuste statistiquement la contamination en MPs d'*E. affinis* dans sa zone de présence en estuaire de Seine

Il y a également nécessité d'évaluer l'impact de ces autres bioplastiques à l'échelle du microbiote afin de potentiellement évaluer une meilleure alternative que le PBAT sur ce point, compte tenu des premiers résultats décrits dans ce manuscrit sur ce polymère. Plus généralement, le protocole d'exposition multigénérationnel utilisé dans cette thèse pourrait également servir afin d'évaluer dans la même configuration, si les effets observés à l'échelle du microbiote impliquent des effets mesurables à l'échelle moléculaire ou des traits de vie d'*E. affinis*.

Concernant l'expérimentation de vieillissement, Cette première étape en laboratoire, obligatoire a permis de cerner certains mécanismes simples en s'affranchissant de la complexité du milieu naturel et de documenter une première idée de biodégradation du PBAT sous forme de MPs.

Il pourrait désormais être intéressant de réaliser une expérimentation de « caging » d'une large gamme de bioplastiques, toujours sous forme de MPs, en milieu naturel estuarien afin de se rapprocher

aux mieux des contraintes de l'environnement naturel (biotiques et abiotiques) et d'estimer au mieux le taux de dégradabilité de ces bioplastiques. De plus, ces échantillons pourront également être exposés au modèle *E. affinis* afin d'étudier leur écotoxicité.

En effet, il est primordial de mettre en perspective les résultats des travaux de cette thèse et d'alerter, comme d'autres études, la communauté scientifique mais également les industriels et les affaires réglementaires sur ce que semble être le devenir réel des plastiques biodégradables en milieu naturel, notamment marin. Comme nous avons pu le décrire durant les différents chapitres de cette thèse et malgré les améliorations notables chaque année des filières de traitements des déchets, chaque année, une partie non négligeable de ces déchets plastique termine toujours sa course dans les écosystèmes naturels avec comme finalité le milieu marin. La majorité de ces déchets provient des emballages alimentaires qui sont fins, légers, avec un cycle d'utilisation court et donc transportables en grande quantité et facilement par le vent ou les courants aquatiques et marins. C'est donc sur le pôle de l'emballage que les plastiques biodégradables débouchent et tendent à remplacer les plastiques persistants, avec en tête de liste le PLA et le PBAT. Comme défini par la norme NF EN 13432, ces deux plastiques sont dégradés en des lapses de temps très courts en conditions contrôlées et optimales. Pour exemple, les temps finaux de dégradation rapportés par les industriels pour les références de PLA et de PBAT dans cette thèse sont de l'ordre de 83 jours et 61 respectivement. En ce qui concerne le milieu marin, les études précédentes ainsi que nos travaux tendent à démontrer une biodégradation quasi nulle, même sous forme micrométrique dans ces conditions naturelles pour la durée définie par la norme NF EN 13432 employée actuellement. Comme la problématique majeure induite par les déchets plastique est la contamination environnementale et l'impact sur le vivant, nous sommes donc en droit de nous interroger sur cette norme, qui intrinsèquement, implique dans l'inconscient collectif que les plastiques biodégradables seraient la solution aux impacts des déchets plastique en milieu naturel. La question peut donc se poser de savoir s'il ne serait pas préférable d'avoir une définition réglementaire de la biodégradabilité beaucoup plus réaliste eu égard aux conditions marines afin qu'uniquement les polymères ayant une persistance relativement faible dans ce milieu ne portent cette définition. Actuellement, les plastiques biodégradables ayant la vitesse de dégradation la plus élevée en conditions marines sont les polyhydroxyalcanoates (PHA). Les PHA sont des polyesters naturels produits par certaines bactéries sous certaines conditions bien spécifiques. La famille des PHA est beaucoup moins répandue en termes de quantité de production que le PBAT et le PLA en raison de la recherche relativement nouvelle sur cette famille de plastiques. Cette famille pourrait cependant s'avérer extrêmement intéressante en cas de modification des textes règlementaires. En effet, des résultats publiés demeurent encourageants et beaucoup plus en adéquation avec réelle biodégradation en milieu marin puisque des recherches ont démontré une dégradation complète de films de PHA entre 37 et 73 jours (Dilkes-Hoffman *et al.*, 2019).

Bibliographie

- Ali, W., Ali, H., Gillani, S., Zinck, P., and Souissi, S. (2023). Polylactic acid synthesis, biodegradability, conversion to microplastics and toxicity: a review. *Environ Chem Lett* 21, 1761–1786. doi: 10.1007/s10311-023-01564-8.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Slikas, B., Boyd, G. D., Melvin, D. W., Morrall, C. E., et al. (2015). The biogeography of the Plastisphere: implications for policy. *Frontiers in Ecology and the Environment* 13, 541–546. doi: 10.1890/150017.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1596–1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Andrady, A. L. (2015). Persistence of plastic litter in the oceans. *Marine anthropogenic litter*, 57-72.
- Arthur, C., Baker, J.E., Bamford, H.A. (2009) Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects, and fate of microplastic marine debris. [dissertation]. [Tacoma (WA)]: University of Washington.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F. (2017). Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research* 128, 2-11. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.012.
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S. S., Mah, J., Kang, D., Zhang, J., et al. (2010). Biodegradable Poly(butylene adipate-*co*-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science* 75. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01591.x.
- Behnke, A., Engel, M., Christen, R., Nebel, M., Klein, R. R., and Stoeck, T. (2011). Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions: Protistan community complexity. *Environmental Microbiology* 13, 340–349. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02332.x.

- Benali, S., Aouadi, S., Dechief, A.-L., Murariu, M., and Dubois, P. (2015). Key factors for tuning hydrolytic degradation of polylactide/zinc oxide nanocomposites. *Nanocomposites* 1, 51–61. doi: 10.1179/2055033214Y.0000000007.
- Blight, L.K., Burger, A.E. (1997). Occurrence of plastic particles in seabirds from the eastern North Pacific. *Marine Pollution Bulletin* 34 (5), 323-325. doi: 10.1016/S0025-326X(96)00095-1.
- Brandt, P., Gerdts, G., Boersma, M., Wiltshire, K. H., and Wichels, A. (2010). Comparison of different DNA-extraction techniques to investigate the bacterial community of marine copepods. *Helgol Mar Res* 64, 331–342. doi: 10.1007/s10152-010-0188-1.
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., and Canning-Clode, J. (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 178, 189–195. doi: 10.1016/j.ecss.2015.12.003.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., et al. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9175–9179. doi: 10.1021/es201811s.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., and Budzinski, H. (2009). Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution* 157, 64–71. doi: 10.1016/j.envpol.2008.07.026.
- Cailleaud, K., Budzinski, H., Lardy, S., Augagneur, S., Barka, S., Souissi, S., et al. (2011). Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environ Sci Pollut Res* 18, 226–236. doi: 10.1007/s11356-010-0355-6.
- Campani, T., Bainsi, M., Giannetti, M., Cancelli, F., Mancusi, C., Serena, F., et al. (2013). Presence of plastic debris in loggerhead turtle stranded along the Tuscany coasts of the Pelagos Sanctuary for Mediterranean Marine Mammals (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 74 (1), 225-230. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.06.053.
- Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B. (1972). Polystyrene spherules in Coastal Waters. *Science* 178 (4062), 749-750. doi: 10.1126/science.178.4062.749.
- Castel, J., and Veiga, J. (1990). Distribution and retention of the copepod *Eurytemora affinis* hirundoides in a turbid estuary. *Mar. Biol.* 107, 119–128. doi: 10.1007/BF01313249.

Cheng, J., Jacquin, J., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., George, M., et al. (2021). Relative Influence of Plastic Debris Size and Shape, Chemical Composition and Phytoplankton-Bacteria Interactions in Driving Seawater Plasticsphere Abundance, Diversity and Activity. *Frontiers in Microbiology* 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.610231> [Accessed October 20, 2022].

Chiffolleau, J.-F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, I., Ficht, A., et al. (2001). Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries* 24, 1029–1040. doi: 10.2307/1353015.

Choi, J. S., Hong, S. H., and Park, J.-W. (2020). Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine Environmental Research* 153, 104838. doi: 10.1016/j.marenvres.2019.104838.

Choi, B.-S., Kim, D.-H., Kim, M.-S., Park, J. C., Lee, Y. H., Kim, H.-J., et al. (2021). The genome of the European estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis*: Potential use in molecular ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 166, 112190. doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112190.

Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin* 70 (1-2), 227-233. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.03.009.

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Galloway, T.S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports* 4, 4528. doi: 10.1038/srep04528. doi: 10.1038/srep04528.

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2015). The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1130–1137. doi: 10.1021/es504525u.

Cole, M. (2016). A novel method for preparing microplastic fibers. *Scientific Reports* 6, 34519. doi: 10.1038/srep34519.

Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., et al. (2016). Microplastics Alter the Properties and Sinking Rates of Zooplankton Faecal Pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3239–3246. doi: 10.1021/acs.est.5b05905.

- Cole, M., Coppock, R., Lindeque, P.K., Altin, D., Reed, S., Pond, D.W., *et al.* (2019). Effects of Nylon Microplastic on Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod. *Environmental Science & Technology* 53 (12), 7075-7082. doi: 10.1021/acs.est.9b01853.
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queirós, A. M., and Lindeque, P. K. (2019). Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*. *Science of The Total Environment* 687, 780–789. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.009.
- Couceiro, J. F., Keller-Costa, T., Marques, M., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Whitman, W. B., *et al.* (2021). The *Roseibium album* (*Labrenzia alba*) Genome Possesses Multiple Symbiosis Factors Possibly Underpinning Host-Microbe Relationships in the Marine Benthos. *Microbiol Resour Announc* 10, e00320-21. doi: 10.1128/MRA.00320-21.
- Cregeen, S. J. J. (2016). Microbiota of dominant Atlantic copepods: *Pleuromamma* sp. as a host to a betaproteobacterial symbiont. Available at: <https://eprints.soton.ac.uk/403351/>
- Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. (2008). Cross-Ocean Distribution of Rhodobacterales Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters. *Appl Environ Microbiol* 74, 52–60. doi: 10.1128/AEM.01400-07.
- Darvand, R., and Esmailzadeh, O. (2023). Indicator species analysis by considering combinations of site groups. *Iranian Journal of Forest*. doi: 10.22034/ijf.2023.363038.1892.
- Das, S., Tseng, L.-C., Chou, C., Wang, L., Souissi, S., and Hwang, J.-S. (2019). Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinoergia edulis* (Crustacea: Decapoda). *Environ Sci Pollut Res* 26, 7752–7762. doi: 10.1007/s11356-018-04113-x.
- Das, S., Ouddane, B., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2020). Intergenerational effects of resuspended sediment and trace metal mixtures on life cycle traits of a pelagic copepod. *Environmental Pollution* 267, 115460. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115460.
- Das, S., Ouddane, B., and Souissi, S. (2022). Responses of the copepod *Eurytemora affinis* to trace metal exposure: A candidate for sentinel to marine sediment resuspension effects. *Marine Pollution Bulletin* 181, 113854. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113854.
- Dayras, P., Bialais, C., Sadovskaya, I., Lee, M.-C., Lee, J.-S., and Souissi, S. (2021). Microalgal Diet Influences the Nutritive Quality and Reproductive Investment of the Cyclopoid Copepod

Paracyclops nana. *Frontiers in Marine Science* 8. Available at:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.697561>.

Delacuvellerie, A., Benali, S., Cyriaque, V., Moins, S., Raquez, J.-M., Gobert, S., et al. (2021). Microbial biofilm composition and polymer degradation of compostable and non-compostable plastics immersed in the marine environment. *Journal of Hazardous Materials* 419, 126526. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126526.

Delacuvellerie, A., Brusselman, A., Cyriaque, V., Benali, S., Moins, S., Raquez, J.-M., et al. (2023). Long-term immersion of compostable plastics in marine aquarium: Microbial biofilm evolution and polymer degradation. *Marine Pollution Bulletin* 189, 114711. doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.114711.

Deroiné, M., Le Duigou, A., Corre, Y.-M., Le Gac, P.-Y., Davies, P., César, G., et al. (2014). Accelerated ageing of polylactide in aqueous environments: Comparative study between distilled water and seawater. *Polymer Degradation and Stability* 108, 319–329. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.020.

Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S. (2015). Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 69, 320-330. doi: 10.1007/s00244-015-0172-5.

de Steenhuijsen Piters, W. A. A., Watson, R. L., de Koff, E. M., Hasrat, R., Arp, K., Chu, M. L. J. N., et al. (2022). Early-life viral infections are associated with disadvantageous immune and microbiota profiles and recurrent respiratory infections. *Nat Microbiol* 7, 224–237. doi: 10.1038/s41564-021-01043-2.

De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., and Dawyndt, P. (2015). Bacterial Community Profiling of Plastic Litter in the Belgian Part of the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9629–9638. doi: 10.1021/acs.est.5b01093.

Devriese, L., Van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., et al. (2015). Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Marine Pollution Bulletin* 98 (1-2), 179-187. doi : 10.1016/j.marpolbul.2015.06.051.

- Dilkes-Hoffman, L. S., Lant, P. A., Laycock, B., and Pratt, S. (2019). The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. *Marine Pollution Bulletin* 142, 15–24. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.020.
- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science* 14, 927–930. doi: 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.
- Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B., et al. (2015). Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-)plastic particles. *Environ. Chem.* 12, 539–550. doi: 10.1071/EN14172.
- Dris, R., Tramoy, R., Alligant, S., Gasperi, J., and Tassin, B. (2020). “Plastic Debris Flowing from Rivers to Oceans: The Role of the Estuaries as a Complex and Poorly Understood Key Interface,” in *Handbook of Microplastics in the Environment*, eds. T. Rocha-Santos, M. Costa, and C. Mouneyrac (Cham: Springer International Publishing), 1–28. doi: 10.1007/978-3-030-10618-8_3-1.
- Dur, G., and Souissi, S. (2018). Ontogenetic optimal temperature and salinity envelopes of the copepod *Eurytemora affinis* in the Seine estuary (France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 200, 311–323. doi: 10.1016/j.ecss.2017.11.008.
- Dussud, C., Meistertzheim, A. L., Conan, P., Pujo-Pay, M., George, M., Fabre, P., et al. (2018). Evidence of niche partitioning among bacteria living on plastics, organic particles and surrounding seawaters. *Environmental Pollution* 236, 807–816. doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.027.
- European Bioplastics. (2018). Bioplastics market data report. https://www.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market-Data_2018.pdf [Accessed october 10, 2021].
- European Bioplastics. (2022). Bioplastics market data report. https://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/2022/Report_Bioplastics_Market_Data_2022_short_version.pdf [Accessed December 14, 2022].
- Fackelmann, G., and Sommer, S. (2019). Microplastics and the gut microbiome: How chronically exposed species may suffer from gut dysbiosis. *Marine Pollution Bulletin* 143, 193–203. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.030.
- Frère, L., Maignien, L., Chalopin, M., Huvet, A., Rinnert, E., Morrison, H., et al. (2018). Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size. *Environmental Pollution* 242, 614–625. doi: 10.1016/j.envpol.2018.07.023.

- Frias, J.P.G.L., Otero, V., Sobral, P. (2014). Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research* 95, 89-95. doi: 10.1016/j.marenvres.2014.01.001.
- Galgani, F., Leaute, J. P., Moguedet, P., Souplet, A., Verin, Y., Carpentier, A., et al. (2000). Litter on the Sea Floor Along European Coasts. *Marine Pollution Bulletin* 40, 516–527. doi: 10.1016/S0025-326X(99)00234-9.
- Gasperi, J., Cachot, J. (2021). Flux et impacts des microplastiques dans l'estuaire de la Seine. Rouen: GIP Seine-Aval.
- Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3, 1700782.
- Grigoras, A. G. (2021). Natural and synthetic polymeric antimicrobials with quaternary ammonium moieties: a review. *Environ Chem Lett* 19, 3009–3022. doi: 10.1007/s10311-021-01215-w.
- Gulla, S., Sørum, H., Vågnes, Ø., and Colquhoun, D. J. (2015). Phylogenetic analysis and serotyping of *Vibrio splendidus*-related bacteria isolated from salmon farm cleaner fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 117, 121–131. doi: 10.3354/dao02938.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Han, Y., Zhang, X., Liu, P., Xu, S., Chen, D., Liu, J. N., et al. (2022). Microplastics exposure causes oxidative stress and microbiota dysbiosis in planarian *Dugesia japonica*. *Environ Sci Pollut Res* 29, 28973–28983. doi: 10.1007/s11356-022-18547-x.
- Hanson, B. A. (2023). An introduction to ChemoSpec.
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B., and Colwell, R. R. (2002). Bacteria of the γ -Subclass Proteobacteria Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 68, 5498–5507. doi: 10.1128/AEM.68.11.5498-5507.2002.
- Heindler, F. M., Alajmi, F., Huerlimann, R., Zeng, C., Newman, S. J., Vamvounis, G., et al. (2017). Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di(2-ethylhexyl)phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141, 298–305. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.029.

- Hoellein, T., Rojas, M., Pink, A., Gasior, J., and Kelly, J. (2014). Anthropogenic Litter in Urban Freshwater Ecosystems: Distribution and Microbial Interactions. *PLOS ONE* 9, e98485. doi: 10.1371/journal.pone.0098485.
- Hong, Z., Lai, Q., Luo, Q., Jiang, S., Zhu, R., Liang, J., et al. (2015). *Sulfitobacter pseudonitzschiae* sp. nov., isolated from the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 95–100. doi: 10.1099/ijs.0.064972-0.
- Huq, A., Sack, R. B., Nizam, A., Longini, I. M., Nair, G. B., Ali, A., et al. (2005). Critical Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Environment of Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 71, 4645–4654. doi: 10.1128/AEM.71.8.4645-4654.2005.
- Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., et al. (2019). Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the “Plastisphere.” *Frontiers in Microbiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00865> [Accessed May 29, 2023].
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., et al. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Sci Rep* 7, 41323. doi: 10.1038/srep41323.
- Jian, J., Xiangbin, Z., and Xianbo, H. (2020). An overview on synthesis, properties and applications of poly(butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* 3, 19–26. doi: 10.1016/j.aiepr.2020.01.001.
- Kadiene, E. U., Ouddane, B., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2019). Bioaccumulation of metals in calanoid copepods by oral intake. *Sci Rep* 9, 9492. doi: 10.1038/s41598-019-45987-2.
- Käppler, A., Fisher, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.J., et al. (2016). Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 8377-8391. doi: 10.1007/s00216-016-9956-3.
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2017). Package ‘factoextra’. Extract and visualize the results of multivariate data analyses, 76(2).
- Kazour, M., Jemaa, S., Issa, C., Khalaf, G., Amara, R. (2019). Microplastics pollution along the Lebanese coast (Eastern Mediterranean Basin): Occurrence in surface water, sediments and biota samples. *Science of the Total Environment* 696, 133933. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.133933.

- Klein, C., Claquin, P., Bouchart, V., Le Roy, B., and Véron, B. (2010). Dynamics of Pseudo-nitzschia spp. and domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae* 9, 218–226. doi: 10.1016/j.hal.2009.10.004.
- Kowalski, N., Reichardt, A.M., Waniek, J.J. (2016). Sinking rates of microplastics and potential implications of their alteration by physical, biological, and chemical factors. *Marine Pollution Bulletin* 109 (1), 310-319. doi : 10.1016/j.marpolbul.2016.05.064.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., and Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl Environ Microbiol* 79, 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13.
- Kulkarni, D., Daniels, B., and Preuss, T. G. (2013). Life-stage-dependent sensitivity of the cyclopoid copepod *Mesocyclops leuckarti* to triphenyltin. *Chemosphere* 92, 1145–1153. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.076.
- Kwok, K. W. H., Souissi, S., Dur, G., Won, E.-J., and Lee, J.-S. (2015). “Chapter 12 - Copepods as Reference Species in Estuarine and Marine Waters,” in *Aquatic Ecotoxicology*, eds. C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, and C. Mouneyrac (Academic Press), 281–308. doi: 10.1016/B978-0-12-800949-9.00012-7.
- Laist, D. W. (1997). “Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records,” in *Marine Debris: Sources, Impacts, and Solutions Springer Series on Environmental Management.*, eds. J. M. Coe and D. B. Rogers (New York, NY: Springer), 99–139. doi: 10.1007/978-1-4613-8486-1_10.
- Lee, C. E., Messer, L. F., Holland, S. I., Gutierrez, T., Quilliam, R. S., and Matallana-Surget, S. (2023). The primary molecular influences of marine plastisphere formation and function: Novel insights into organism -organism and -co-pollutant interactions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1–24. doi: 10.1080/10643389.2023.2224182.
- Lee, C. E., and Petersen, C. H. (2003). Effects of Developmental Acclimation on Adult Salinity Tolerance in the Freshwater-Invading Copepod *Eurytemora affinis*. *Physiological and Biochemical Zoology* 76, 296–301. doi: 10.1086/375433.

- Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., and Lee, D.-H. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol.* 46, 174–182. doi: 10.1007/s12275-008-0032-3.
- Lee, K.-W., Shim, W. J., Kwon, O. Y., and Kang, J.-H. (2013). Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11278–11283. doi: 10.1021/es401932b.
- Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C.A., Mackenzie, D.M.A., Nielsen, T.G. (2015). A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine Pollution Bulletin* 100 (1), 82-91. doi : 10.1016/j.marpolbul.2015.09.026.
- Lerebours, A., Bathie, M., Kazour, M., Amara, R., Huet, V., and Thomas, H. (2022). Spatio-temporal contamination of microplastics in shellfish farming regions: A case study. *Marine Pollution Bulletin* 181, 113842. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113842.
- Li, C., Li, Z., Cui, Q., Hassan, A., Zhang, K., Lu, X., et al. (2023). Effect of different additions of low-density polyethylene and microplastics polyadipate/butylene terephthalate on soil bacterial community structure. *Environ Sci Pollut Res* 30, 55649–55661. doi: 10.1007/s11356-023-26159-2.
- Li, L.-L., Amara, R., Souissi, S., Dehaut, A., Duflos, G., and Monchy, S. (2020). Impacts of microplastics exposure on mussel (*Mytilus edulis*) gut microbiota. *Science of The Total Environment* 745, 141018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141018.
- Li, S., Tenon, M., Garreau, H., Braud ; C., Vert, M. (2000). Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from l-, dl- and meso-lactides. *Polymer Degradation and Stability* 67 (1), 85-90. doi: 10.1016/S0141-3910(99)00091-9.
- Li, S., Wang, P., Zhang, C., Zhou, X., Yin, Z., Hu, T., et al. (2020). Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment* 714, 136767. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136767.
- Liao, J., and Chen, Q. (2021). Biodegradable plastics in the air and soil environment: Low degradation rate and high microplastics formation. *Journal of Hazardous Materials* 418, 126329. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126329.
- Lindeque, P. K., Cole, M., Coppock, R. L., Lewis, C. N., Miller, R. Z., Watts, A. J. R., et al. (2020). Are we underestimating microplastic abundance in the marine environment? A comparison of

microplastic capture with nets of different mesh-size. *Environmental Pollution* 265, 114721. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114721.

Lobelle, D., and Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin* 62, 197–200. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.013.

Lopez-Joven, C., Rolland, J.-L., Haffner, P., Caro, A., Roques, C., Carré, C., et al. (2018). Oyster Farming, Temperature, and Plankton Influence the Dynamics of Pathogenic Vibrios in the Thau Lagoon. *Frontiers in Microbiology* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02530>

Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., and Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of The Total Environment* 631–632, 449–458. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.051.

Lusher, A. L., Burke, A., O'Connor, I., and Officer, R. (2014). Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: Validated and opportunistic sampling. *Marine Pollution Bulletin* 88, 325–333. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.08.023.

Lusher, A. (2015). Microplastics in the marine environment: distribution, interactions and effects. *Marine anthropogenic litter*, 245-307.

L. Lusher, A., A. Welden, N., Sobral, P., and Cole, M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods* 9, 1346–1360. doi: 10.1039/C6AY02415G.

Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K., Studer, M., ... & Gonzalez, J. (2013). Package 'cluster'. Dosegljivo na.

Maes, T., Jessop, J., Wellner, N., Haupt, K., Mayes, A.G. (2017). A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports* 7, 44501. doi: 10.1038/srep44501.

Mahoney, K. W., Talbert, J. N., and Goddard, J. M. (2013). Effect of polyethylene glycol tether size and chemistry on the attachment of lactase to polyethylene films. *J of Applied Polymer Sci* 127, 1203–1210. doi: 10.1002/app.37622.

- Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., and Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol* 15, 259–270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14.
- Mansa, R., and Zou, S. (2021). Thermogravimetric analysis of microplastics: A mini review. *Environmental Advances* 5, 100117. doi: 10.1016/j.envadv.2021.100117.
- Masutani, K., and Kimura, Y. (2014). “Chapter 1. PLA Synthesis. From the Monomer to the Polymer,” in *Polymer Chemistry Series*, eds. A. Jiménez, M. Peltzer, and R. Ruseckaite (Cambridge: Royal Society of Chemistry), 1–36. doi: 10.1039/9781782624806-00001.
- Mauchline, J. (1998). “The Biology of Calanoid Copepods”, in *Advances in Marine Biology*, ed. J. Mauchline (Academic Press, London, New York), 170 pp.
- Meng, Y., Zhang, Z., Li, J., Lv, Y., and Lin, X. (2019). The complete genome sequence of the denitrifying bacterium *Marinobacter* sp. Arc7-DN-1 isolated from Arctic Ocean sediment. *Marine Genomics* 45, 8–10. doi: 10.1016/j.margen.2018.10.008.
- Md Amin, R., Sohaimi, E.S., Anuar, S.T., Bachok, Z. (2020). Microplastic ingestion by zooplankton in Terengganu coastal waters, southern South China Sea. *Marine Pollution Bulletin* 150, 110616. doi : 10.1016/j.marpolbul.2019.110616.
- Michalec, F.-G., Holzner, M., Barras, A., Lacoste, A.-S., Brunet, L., Lee, J.-S., et al. (2017). Short-term exposure to gold nanoparticle suspension impairs swimming behavior in a widespread calanoid copepod. *Environmental Pollution* 228, 102–110. doi: 10.1016/j.envpol.2017.04.084.
- Miranda, M. N., Sampaio, M. J., Tavares, P. B., Silva, A. M. T., and Pereira, M. F. R. (2021). Aging assessment of microplastics (LDPE, PET and uPVC) under urban environment stressors. *Science of The Total Environment* 796, 148914. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148914.
- Moore, C.J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research* 108 (2), 131-139. doi: 10.1016/j.envres.2008.07.025.
- Morawiec, J., Pawlak, A., Slouf, M., Galeski, A., Piorkowska, E., and Krasnikowa, N. (2005). Preparation and properties of compatibilized LDPE/organo-modified montmorillonite nanocomposites. *European Polymer Journal* 41, 1115–1122. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2004.11.011.

- Morgan, C. A., Cordell, J. R., and Simenstad, C. A. (1997). Sink or swim? Copepod population maintenance in the Columbia River estuarine turbidity-maxima region. *Marine Biology* 129, 309–317. doi: 10.1007/s002270050171.
- Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., and Quinn, B. (2016). Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 5800–5808. doi: 10.1021/acs.est.5b05416.
- Muthukumar, T., Aravinthan, A., Lakshmi, K., Venkatesan, R., Vedaprakash, L., and Doble, M. (2011). Fouling and stability of polymers and composites in marine environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 276–284. doi: 10.1016/j.ibiod.2010.11.012.
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., and Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin* 99, 178–185. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.029.
- Napper, I. E., and Thompson, R. C. (2016). Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Marine Pollution Bulletin* 112, 39–45. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.025.
- Navon, G., Kaplan, A., Avisar, D., and Shenkar, N. (2020). Assessing pharmaceutical contamination along the Mediterranean and Red Sea coasts of Israel: Ascidians (Chordata, Ascidiacea) as bioindicators. *Marine Pollution Bulletin* 160, 111510. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111510.
- Neuwirth, E., & Neuwirth, M. E. (2011). Package ‘RColorBrewer’. *Phys. Rev. D—Part. Fields Gravit. Cosmol.* 84, 1-5.
- Newton, R. J., VandeWalle, J. L., Borchardt, M. A., Gorelick, M. H., and McLellan, S. L. (2011). Lachnospiraceae and Bacteroidales Alternative Fecal Indicators Reveal Chronic Human Sewage Contamination in an Urban Harbor. *Appl Environ Microbiol* 77, 6972–6981. doi: 10.1128/AEM.05480-11.
- NF EN 13432 -Exigences relatives aux emballages valorisables par compostage et biodégradation - Programme d’essai et critères d’évaluation de l’acceptation finale des emballages.” Afnor, 2000.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., et al. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* 336, 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813.

Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., Labrenz, M., Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., and Labrenz, M. (2015). Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environ. Chem.* 12, 551–562. doi: 10.1071/EN15069.

Oberbeckmann, S., Kreikemeyer, B., and Labrenz, M. (2018). Environmental Factors Support the Formation of Specific Bacterial Assemblages on Microplastics. *Frontiers in Microbiology* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02709> [Accessed October 20, 2023].

Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., et al. (2018). Constraints and Priorities for Conducting Experimental Exposures of Marine Organisms to Microplastics. *Front. Mar. Sci.* 5, 252. doi: 10.3389/fmars.2018.00252.

Powell, G. V. N., and Powell, A. H. (1986). Reproduction by great white herons *Ardea herodias* in Florida Bay as an indicator of habitat quality. *Biological Conservation* 36, 101–113. doi: 10.1016/0006-3207(86)90001-7.

-Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamara, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., et al. (2018). Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 6135-6144. doi: 10.1007/s11356-017-8862-3.

Plastics, the facts, 2021. European Plastics. (Brussels: Plastics Europe).

Plastics, the facts, 2022. European Plastics. (Brussels: Plastics Europe).

Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C. Q., Yu, H., and Ge, C. (2020). Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Science of The Total Environment* 698, 134254. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134254.

Powell, M. D., and Berry, A. J. (1990). Ingestion and regurgitation of living and inert materials by the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe) and the influence of salinity. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 31, 763–773. doi: 10.1016/0272-7714(90)90081-2.

Qiao, R., Deng, Y., Zhang, S., Wolosker, M. B., Zhu, Q., Ren, H., et al. (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere* 236, 124334. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.065.

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219.
- Quilliam, R. S., Jamieson, J., and Oliver, D. M. (2014). Seaweeds and plastic debris can influence the survival of faecal indicator organisms in beach environments. *Marine Pollution Bulletin* 84, 201–207. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.05.011.
- Renner, G., Schmidt, T.C., Schram, J. (2018). Analytical methodologies for monitoring micro(nano)plastics: Which are fit for purpose ?. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 1, 55-61. doi: 10.1016/j.coesh.2017.11.001.
- Rochman, C., Tahir, A., Williams, S. *et al.* Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Sci Rep* 5, 14340 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep14340>.
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., and Fossi, M. C. (2015). First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 95, 358–361. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.048.
- Roux, F. L., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., et al. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* 15, 251–258. doi: 10.1016/S0990-7440(02)01176-2.
- Royer, S.-J., Greco, F., Kogler, M., and Deheyn, D. D. (2023). Not so biodegradable: Polylactic acid and cellulose/plastic blend textiles lack fast biodegradation in marine waters. *PLOS ONE* 18, e0284681. doi: 10.1371/journal.pone.0284681.
- Ruggero, F., Onderwater, R. C. A., Carretti, E., Roosa, S., Benali, S., Raquez, J.-M., et al. (2021). Degradation of Film and Rigid Bioplastics During the Thermophilic Phase and the Maturation Phase of Simulated Composting. *J Polym Environ* 29, 3015–3028. doi: 10.1007/s10924-021-02098-2.
- Santo, M., Weitsman, R., and Sivan, A. (2013). The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 204–210. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.03.001.

- Schloss, P. D., Gevers, D., and Westcott, S. L. (2011). Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLOS ONE* 6, e27310. doi: 10.1371/journal.pone.0027310.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environmental Pollution* 185, 77-83. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.013.
- Sheavly, S. B., and Register, K. M. (2007). Marine Debris & Plastics: Environmental Concerns, Sources, Impacts and Solutions. *J Polym Environ* 15, 301–305. doi: 10.1007/s10924-007-0074-3.
- Shim, W.J., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin* 113 (1-2), 469-476. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.049.
- Snoussi, M., Noumi, E., Hajlaoui, H., Usai, D., Sechi, L. A., Zanetti, S., et al. (2009). High potential of adhesion to abiotic and biotic materials in fish aquaculture facility by *Vibrio alginolyticus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1591–1599. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04126.x.
- Song, Y.S., Won, Y.J., Kim, D.Y. (2015). Time-lapse in situ fluorescence lifetime imaging of lipid droplets in differentiating 3T3-L1 preadipocytes with Nile Red. *Current Applied Physics* 15 (12), 1634-1640. doi: 10.1016/j.cap.2015.09.006.
- Souissi, A., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2021). Reproductive trade-offs of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* under different thermal and haline regimes. *Sci Rep* 11, 20139. doi: 10.1038/s41598-021-99703-0.
- Souissi, A., Souissi, S., Devreker, D., and Hwang, J.-S. (2010). Occurrence of intersexuality in a laboratory culture of the copepod *Eurytemora affinis* from the Seine estuary (France). *Mar Biol* 157, 851–861. doi: 10.1007/s00227-009-1368-x.
- Souissi, A., Souissi, S., and Hwang, J.-S. (2016). Evaluation of the Copepod *Eurytemora affinis* Life History Response to Temperature and Salinity Increases. *Zool Stud* 55, e4. doi: 10.6620/ZS.2016.55-04.
- Steer, M., Cole, M., Thompson, R. C., and Lindeque, P. K. (2017). Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. *Environmental Pollution* 226, 250–259. doi: 10.1016/j.envpol.2017.03.062.

- Strickler, J.R. (1982). Calanoid Copepods, Feeding Currents, and the Role of Gravity. *Science* 218 (4568), 158-160. doi : 10.1126/science.218.4568.158.
- Sun, X., Li, Q., Zhu, M., Liang, J., Zheng, S., Zhao, Y. (2017). Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea. *Marine Pollution Bulletin* 115, 217-224. doi : 10.1016/j.marpolbul.2016.12.004.
- Sun, X., Liu, T., Zhu, M., Liang, J., Zhao, Y., Zhang, B. (2018a). Retention and characteristics of microplastics in natural zooplankton taxa from the East China Sea. *Science of the Total Environment* 640-641, 232-242. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.308.
- Sun, X., Liang, J., Zhu, M., Zhao, Y., Zhang, B. (2018b). Microplastics in seawater and zooplankton from the Yellow Sea. *Environmental Pollution* 242, 585-595. doi: 10.1016/j.envpol.2018.07.014.
- Tackx, M. L. M., Herman, P. J. M., Gasparini, S., Irigoien, X., Billiones, R., and Daro, M. H. (2003). Selective feeding of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in temperate estuaries: model and field observations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56, 305–311. doi: 10.1016/S0272-7714(02)00182-8.
- Tamplin, M. L., Gauzens, A. L., Huq, A., Sack, D. A., and Colwell, R. R. (1990). Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl Environ Microbiol* 56, 1977–1980. doi: 10.1128/aem.56.6.1977-1980.1990.
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M., and Watanuki, Y. (2013). Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Marine Pollution Bulletin* 69, 219–222. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.12.010.
- Teng, F., Darveekaran Nair, S. S., Zhu, P., Li, S., Huang, S., Li, X., et al. (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci Rep* 8, 16321. doi: 10.1038/s41598-018-34294-x.
- They, J., Bialais, C., Kazour, M., Moreau, M., Dufour, D., Benali, S., et al. (2022). A New Method for Microplastics Identification in Copepods. *Frontiers in Environmental Chemistry* 3. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvc.2022.905303>.
- They, J., Li, L.-L., Das, S., Dufour, D., Benali, S., Raquez, J.-M., et al. (2023). Multigenerational exposure of microplastics on the microbiota of *E. affinis* (copepod): a comparative study between

biodegradable and nonbiodegradable microplastics. *Frontiers in Ecology and Evolution* 11. doi: 10.3389/fevo.2023.1231346.

Tramoy, R., Colasse, L., Gasperi, J., Tassin, B. (2019). Plastic debris dataset on the Seine river banks: Plastic pellets, unidentified plastic fragments and plastic sticks are the Top 3 items in a historical accumulation of plastics. *Data in Brief* 23, 103697. doi: 10.1016/j.dib.2019.01.045.

Turner, J. T. (2004). The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zool. Stud.*, 43(2), 255-266.

U. Iyare, P., K. Ouki, S., and Bond, T. (2020). Microplastics removal in wastewater treatment plants: a critical review. *Environmental Science: Water Research & Technology* 6, 2664–2675. doi: 10.1039/D0EW00397B.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., and Köhler, A. (2012). Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327–11335. doi: 10.1021/es302332w.

-Vroom, R.J.E., Koelmans, A.A., Besseling, E., Halsband, C. (2017). Aging of microplastics promotes their ingestion by marine zooplankton. *Environmental Pollution* 231 (1), 987-996. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.088.

Wagner, M., Engwall, M., and Hollert, H. (2014). Editorial: (Micro)Plastics and the environment. *Environmental Sciences Europe* 26, 16. doi: 10.1186/s12302-014-0016-3.

Wallbank, J. A., Lear, G., Kingsbury, J. M., Weaver, L., Doake, F., Smith, D. A., et al. (2022). Into the Plastisphere, Where Only the Generalists Thrive: Early Insights in Plastisphere Microbial Community Succession. *Frontiers in Marine Science* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.841142> [Accessed October 20, 2023].

Wang, J., Qin, X., Guo, J., Jia, W., Wang, Q., Zhang, M., et al. (2020). Evidence of selective enrichment of bacterial assemblages and antibiotic resistant genes by microplastics in urban rivers. *Water Research* 183, 116113. doi: 10.1016/j.watres.2020.116113.

Wei, X.-F., Bohlén, M., Lindblad, C., Hedenqvist, M., and Hakonen, A. (2021). Microplastics generated from a biodegradable plastic in freshwater and seawater. *Water Research* 198, 117123. doi: 10.1016/j.watres.2021.117123.

- Weisse, L., Héchard, Y., Moumen, B., and Delafont, V. (2023). Here, there and everywhere: Ecology and biology of the Dependientiae phylum. *Environmental Microbiology* 25, 597–605. doi: 10.1111/1462-2920.16307.
- Weng, Y.-X., Jin, Y.-J., Meng, Q.-Y., Wang, L., Zhang, M., and Wang, Y.-Z. (2013). Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing* 32, 918–926. doi: 10.1016/j.polymertesting.2013.05.001.
- Wright, S. L., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution* 178, 483–492. doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- Wright, R. J., Bosch, R., Langille, M. G. I., Gibson, M. I., and Christie-Oleza, J. A. (2021). A multi-OMIC characterisation of biodegradation and microbial community succession within the PET plastisphere. *Microbiome* 9, 141. doi: 10.1186/s40168-021-01054-5.
- Zampolli, J., Orro, A., Manconi, A., Ami, D., Natalello, A., and Di Gennaro, P. (2021). Transcriptomic analysis of *Rhodococcus opacus* R7 grown on polyethylene by RNA-seq. *Sci Rep* 11, 21311. doi: 10.1038/s41598-021-00525-x.
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. doi: 10.1021/es401288x.
- Zhang, C., Jeong, C.-B., Lee, J.-S., Wang, D., and Wang, M. (2019). Transgenerational Proteome Plasticity in Resilience of a Marine Copepod in Response to Environmentally Relevant Concentrations of Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 53, 8426–8436. doi: 10.1021/acs.est.9b02525.
- Zhang, C., Li, F., Liu, X., Xie, L., Zhang, Y. T., and Mu, J. (2023). Polylactic acid (PLA), polyethylene terephthalate (PET), and polystyrene (PS) microplastics differently affect the gut microbiota of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after individual and combined exposure with sulfamethazine. *Aquatic Toxicology* 259, 106522. doi: 10.1016/j.aquatox.2023.106522.
- Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., et al. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 4, 232–241. doi: 10.1038/ismej.2009.112.

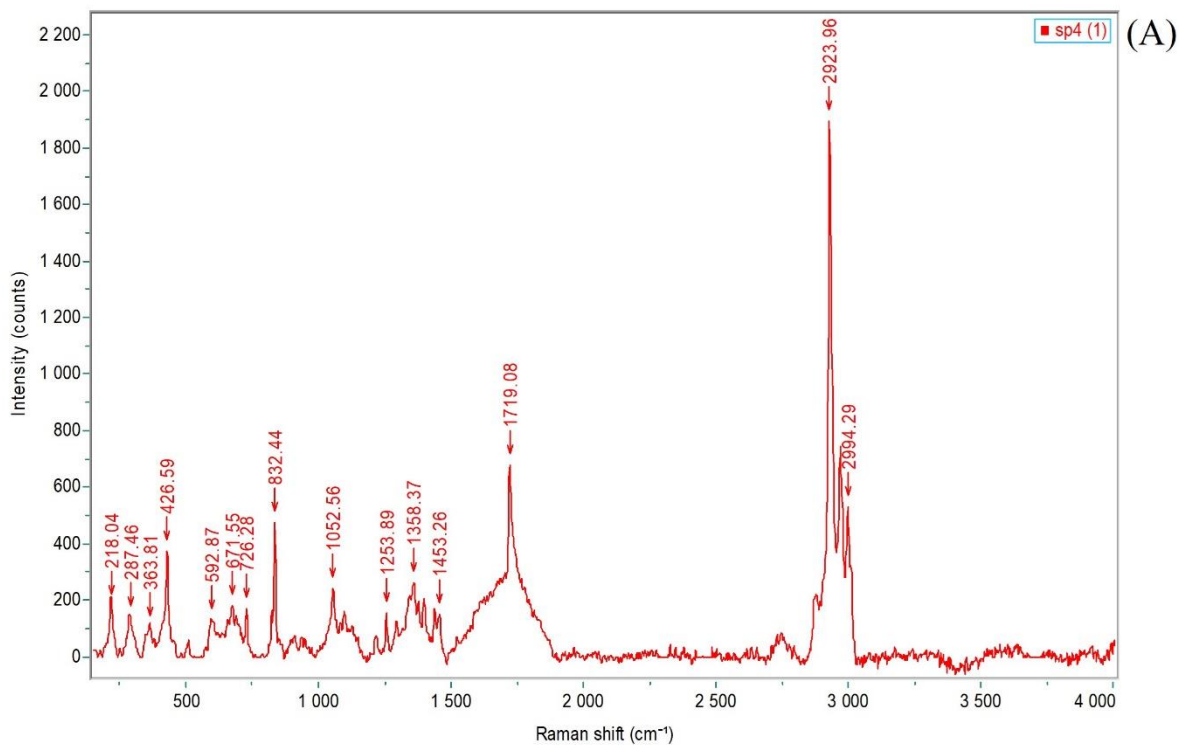
Zheng, S., Zhao, Y., Liu, T., Liang, J., Zhu, M., Sun, X. (2021). Seasonal characteristics of microplastics ingested by copepods in Jiaozhou Bay, the Yellow Sea. *Science of the Total Environment* 776, 145936. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145936.

Zhu, B.-K., Fang, Y.-M., Zhu, D., Christie, P., Ke, X., and Zhu, Y.-G. (2018). Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Pollution* 239, 408–415. doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.017.

Ziajahromi, S., Neale, P. A., and Leusch, F. D. L. (2016). Wastewater treatment plant effluent as a source of microplastics: review of the fate, chemical interactions and potential risks to aquatic organisms. *Water Science and Technology* 74, 2253–2269. doi: 10.2166/wst.2016.414.

Zidour, M., Boubechiche, Z., Pan, Y.-J., Bialais, C., Cudennec, B., Grard, T., et al. (2019). Population response of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* to its bioaccumulation of trace metals. *Chemosphere* 220, 505–513. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.148.

Annexes

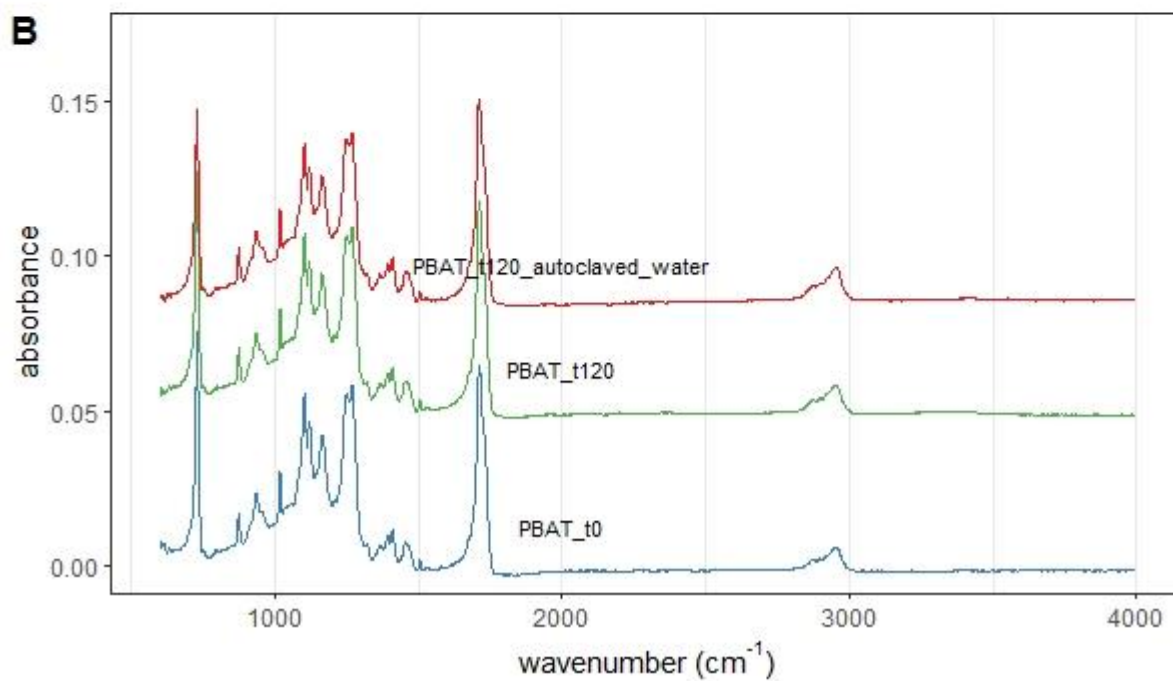
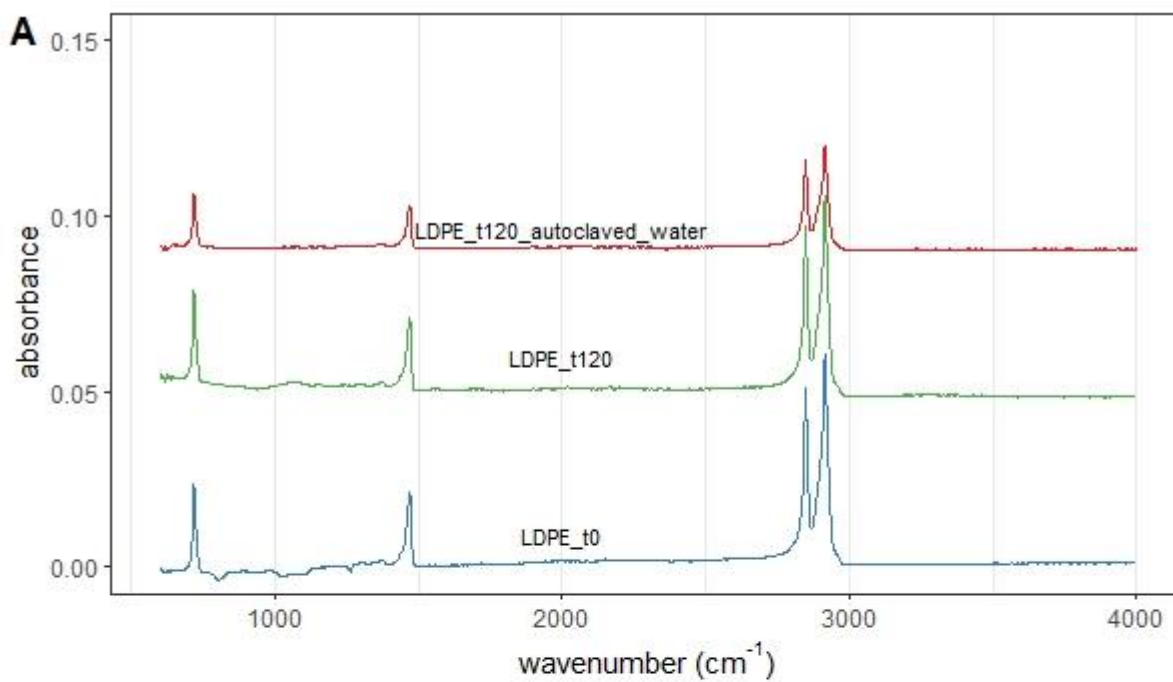


HQI	Poids	Exclure	Cor	DB	ID	Nom	Structure chimique
82.30	S.O.		ⓘ			Spectre composite	
	0.52		ⓘ			20180330 PA-12 532 nm	
	0.48	●	ⓘ	RHX	554	p-(Vinyl acetate)	
	S.O.		ⓘ			Spectre résiduel	

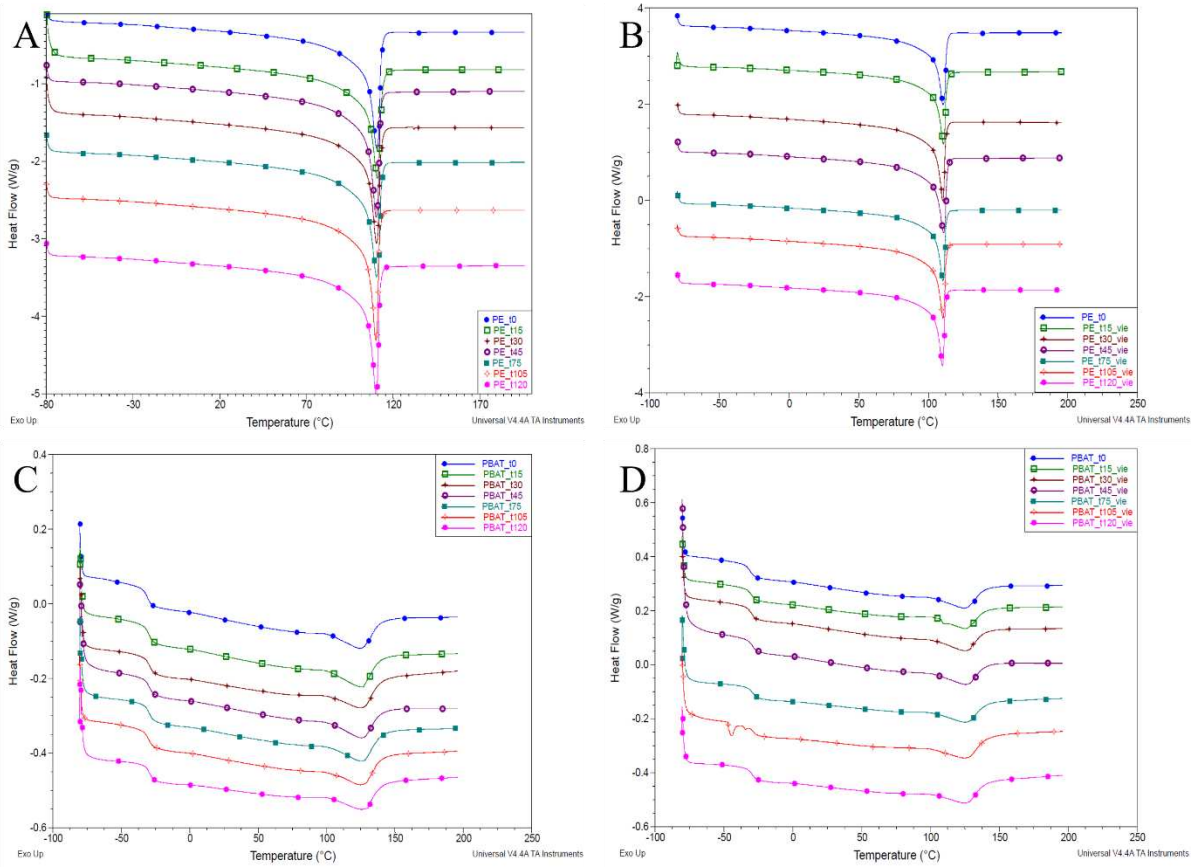
Annexe 1.1 : Spectre Raman d'un microplastique de 2.1µm ingéré par un individu d'*E. affinis* échantillonné dans l'estuaire de la Seine (A) et comparaison de ce spectre avec la banque de données (B) KnowItAll, Biorad®. Dans le cas présent, le MP identifié était un copolymère composé de polyamide et de polyvinyl acétate.

Annexe 2.1 : Nombre d'OTUs qui ont un changement statistiquement significatif d'abondance (augmentation ou diminution) après exposition aux MPs (PBAT ou LDPE), vieillis ou non durant l'intégralité de l'exposition multigénérationnelle (G1-G5).

	PBAT vierge		PBAT vieilli		LDPE vierge		LDPE vieilli	
	#OTU avec augmentation de l'abondance	#OTU avec diminution de l'abondance	#OTU avec augmentation de l'abondance	#OTU avec diminution de l'abondance	#OTU avec augmentation de l'abondance	#OTU avec diminution de l'abondance	#OTU avec augmentation de l'abondance	#OTU avec diminution de l'abondance
Generation 1	1	0	7	1	0	0	2	1
Generation 2	2	1	3	0	2	0	2	1
Generation 3	0	1	1	0	2	0	3	1
Generation 4	0	0	0	0	0	0	0	0
Generation 5	0	0	1	0	2	0	1	0



Annexe 3.1 : spectres ATR-FTIR des microplastiques de LDPE (A) et de PBAT (B) vierges (t0), après 120 jours de vieillissement en eau estuarienne autoclavée (« t120 autoclaved water ») et après 120 jours de vieillissement en eau estuarienne non autoclavée (« t120 »).



Annexe 3.2 : DSC lors de la seconde analyse thermique des MPs de LDPE (A-B) et de PBAT (C-D) vieillis en eau estuarienne autoclavée (A-C) et non autoclavée (B-D). t₀ : échantillons initiaux de MPs vierges ; 15/30/45/75/105/120 : durée de vieillissement des MPs (en jours).

Articles publiés



A New Method for Microplastics Identification in Copepods

Jérémy Thery^{1,2}, Capucine Bialais¹, Maria Kazour¹, Myriam Moreau³, Dylan Dufour¹, Samira Benali², Rachid Amara¹, Sébastien Monchy¹, Jean-Marie Raquez² and Sami Souissi^{1*}

¹Univ. Lille, CNRS, Univ. Littoral Côte D'Opale, IRD, UMR 8187—LOG—Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Wimereux, France, ²Centre d'Innovation et de Recherche des Matériaux et Polymères (CIRMAP), Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC), Université de Mons, France, Belgium, ³UMR 8516, CNRS, LASIRE—Laboratoire de Spectroscopie pour les interactions, la Réactivité et l'Environnement, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Javier Jimenez-Lamana,
Institut des Sciences Analytiques et de
Physico-Chimie pour l'Environnement
et les Matériaux (IPREM), France

Reviewed by:

Kyari Yates,
Robert Gordon University,
United Kingdom
Song Cui,
Northeast Agricultural University,
China

*Correspondence:

Sami Souissi
sami.souissi@univ-lille.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Environmental Analytical Methods,
a section of the journal
Frontiers in Environmental Chemistry

Received: 26 March 2022

Accepted: 22 April 2022

Published: 11 May 2022

Citation:

Thery J, Bialais C, Kazour M,
Moreau M, Dufour D, Benali S,
Amara R, Monchy S, Raquez J-M and
Souissi S (2022) A New Method for
Microplastics Identification
in Copepods.
Front. Environ. Chem. 3:905303.
doi: 10.3389/fenvc.2022.905303

This study investigates several methods to identify microplastics (MPs) of small size ranges (<10 μm) in the copepod *Eurytemora affinis* collected in the Seine estuary (France) and identified using epifluorescence microscopy and Raman microspectroscopy. In order to calibrate the methodology, copepods obtained from cultures were used. Firstly, we labelled three types of MPs (i.e., Polystyrene, Polyethylene, and Polylactic acid) with Nile Red and confirmed their ingestion by *E. affinis* with epifluorescence microscopy. Considering the convenient detection of Nile Red labelled MPs using epifluorescence observation, we tried to pair this method with Raman microspectroscopy. For this, we developed an enzymatic digestion method consisting of copepods digestion using Proteinase K followed by sonication in order to fragment their cuticle. The lysate was then vacuum filtered on black polycarbonate membrane filters that were the most appropriate for epifluorescence microscopy. Potential MPs were dyed with Nile Red directly on the filter, which allowed a relatively rapid visual detection. However, results showed that black polycarbonate membrane filters induced a significant background fluorescence during Raman identification of MPs and hence particles smaller than 10 μm could not be characterized. In this case, we were not able to link staining method with micro-Raman for the size range of MPs targeted in this study. Thus, aluminum oxide filters were tested, and staining method was replaced by a classical observation with stereomicroscopic magnifier to delimit areas of observation for Raman microscopic identification. Aluminum oxide filters induced less fluorescence, allowing the detection of MPs (as small as 1 μm diameter) on copepods from laboratory cultures exposed with MPs. We applied this method on copepods collected in the natural environment. Within a pool of 20 copepods of three replicates, we identified 17 MPs (average of 0.28 MPs/copepod) composed of eight different polymer types and six colors. These MPs corresponded to 59% of fibres with 14.1 ± 9.4 μm diameter and 391.6 ± 600.4 μm length along with 41% of fragments with an average diameter of $13.2 \mu\text{m} \pm 9.5 \mu\text{m}$. This study reports a novel approach to detect the presence of small particles of MPs ingested by copepods in the natural environment.

Keywords: copepods, *Eurytemora affinis*, microplastics, digestion protocol, Nile Red staining, Raman spectroscopy

1 INTRODUCTION

The first sampling of plastic polymers in the marine environment was performed in 1972 (Carpenter et al., 1972). In the decades following this discovery, several researchers have warned about the ecological impact of macroscale plastic pollution on several higher trophic levels of marine animals like sea-birds (Blight and Burger, 1997; Tanaka et al., 2013), marine turtles (Campani et al., 2013), fishes (Romeo et al., 2015) or marine mammals (Laist, 1997). Studying the impact of small size fragments of plastics on almost all components of marine food-webs has been recently documented (Jeong et al., 2017; Li et al., 2020). A significant fraction of plastic debris is channeled by rivers and estuaries to marine environments. For example, in the Seine River, plastic pollution is observed in environmental samples since 1965 on sites under tidal influence (Tramoy et al., 2019). Whereas, the large size of plastic debris is visible in aquatic habitats and called macro-plastic, the smallest fraction called microplastic, arbitrary defined as plastic fragments of less than 5 mm in size represent the hidden part (Arthur et al., 2008) and majority (Lindeque et al., 2020) of plastic pollution. MPs can originate from the degradation of larger plastic debris by physical and chemical mechanisms during their migration in ecosystems (Andrady, 2011). Thus, when the size of MPs decreases, their number inevitably increases (Maes et al., 2017). In addition, a significant part of microplastics is also directly released in the environment through synthetic fibers from textile unleashed by domestic washing machines (Napper and Thompson, 2016) or from cosmetic products like facial cleansers (Napper et al., 2015).

Because of their small size range and diverse properties (abundance, variety of density, and colors), MPs have a great bioavailability for a large variety of vertebrates and invertebrates at lower trophic levels (Wright et al., 2013). Researchers focusing on MPs topic used wide methodologies to detect and characterize this xenobiotic in different environmental compartments (Renner et al., 2018). Even if most studies used visual microscope examination, this method used alone, remains controversial (Song Y. K. et al., 2015) because of the wide variations between observers that can exist and so lead to overestimation or underestimation of MPs (Prata et al., 2019). To remedy this problem, more analytical methods tend to be used to obtain more accurate chemical characterization. Among them, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Frias et al., 2014) and Raman spectroscopy (Lenz et al., 2015) are popular methods. According to literature, FTIR represent a good alternative to visual analysis as it is less time-consuming compared to Raman spectroscopy. However, FTIR could lead to underestimation of MPs < 20 μm compared to Raman spectroscopy because of the diffraction limit of IR spectroscopy (Käppler et al., 2016) and detection limit is fixed to 10 μm (Sun et al., 2018a).

Copepods is a widely distributed group in all aquatic ecosystems (Mauchline, 1998). Several studies showed that both large sized copepods, such as the calanoid *Calanus*

helgolandicus, and the small cyclopoid *Paracyclops nana* have the ability to ingest MPs in the size range of their natural preys, using fluorescent beads of one single polymer, generally Polystyrene (Cole et al., 2014; Cole et al., 2015; Cole et al., 2016; Jeong et al., 2017). Ingestion of non-metabolizable particles induce stresses measurable at individual scale including energetic lack for development, decrease of reproductive success and lipid reserves (Cole et al., 2015) but also at molecular levels with induction of oxidative stress (Jeong et al., 2017). The ingestion rate of MPs depends on the food selectivity of individuals which itself depends on the capacity to distinguish natural preys from MPs (Setälä et al., 2014). Furthermore, copepods have mechano- and chemoreceptors that allow them to handle properly their environment and discriminate non-food from food items (Strickler, 1982). However, in the environment, MPs can be really similar to food items and confuse copepods because they: have different shapes like fibers or fragments, come from different polymers, and are generally biofouled. In fact, some studies showed that ingestion rates varied with polymer nature and shape (Desforges et al., 2015; Coppock et al., 2019) and also if MPs are biofouled compared to virgin and pristine ones (Vroom et al., 2017).

Although important, studies showing the interaction between fluorescent pristine MPs and copepods are difficult to extrapolate to field situation since most *in situ* MPs are not fluorescent and have large variety of shapes. Consequently, investigation of copepods and non-fluorescent MPs interactions remains limited and needs adequate methodological development. To circumvent this issue, some studies used visual detection using Nile Red staining of MPs and observation of whole copepods with epifluorescence microscopy when trying to observe the non-fluorescent MPs in digestive tract of copepods (Cole et al., 2019; Coppock et al., 2019). Although effective, staining of MPs were performed before ingestion of MPs by copepods. Therefore, we don't know if this method is suitable to study MPs impregnation of environmental samples of copepods. Another bottleneck when trying to detect and characterize the non-fluorescent MPs ingested by copepods is the elaboration of new methods able to « expel » MPs from copepod matrix, notably cuticle, and minimize their alteration. Studies focus on MPs contamination of natural environment copepods used acid digestion of copepods based on a previous work (Desforges et al., 2015). However, this method could lead to digestion of low pH tolerance polymers and underestimate MPs contamination in individuals. For MPs characterization, visual detection and μ -FTIR were the two methods used with a lower limit of 7 μm for MPs characterization (Sun et al., 2018a).

To our knowledge, there is no published study that developed an adequate analytical method for the identification and chemical characterization of small-size MPs (~1–10 μm) ingested by copepods in the field. Thus, we developed a complete methodology using mass culture adults of *Eurytemora affinis* to correctly digest copepods without altering low pH tolerance polymers by using an enzymatic digestion with Proteinase K and reached characterization limit of MPs to 1 μm with Raman

microspectroscopy using aluminum oxide filters. Once robust methodology was validated, it was applied to adult copepods of the same species collected from the Seine estuary allowing a better quantification of MPs ingested by copepods. MPs contamination of these copepods showed greater MPs contamination levels compared to literature which could be indicative of an underestimation of MPs levels in copepod model in literature because of previous MPs detection limit.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Microplastics Tested on Experimental Copepods

Firstly, three types of commercial plastics were, separately, considered during this study: 1) two non-compostable petro-based plastics (i.e., polystyrene (PS) ($d < 1 \text{ g cm}^{-3}$) and polyethylene (PE) ($d < 1 \text{ g cm}^{-3}$); 2) a compostable bio-based plastics (i.e., polylactic acid (PLA) ($d > 1 \text{ g cm}^{-3}$)). PS beads were supplied by Polysciences Inc., United States. This Polybead Microspheres are monodispersed polystyrene microspheres with $6 \mu\text{m}$ of diameter. PE were prepared by Prof. J. Cachot (University of Bordeaux, France) using crushing and cryogenic grinding protocol leading to MPs with $4\text{--}6 \mu\text{m}$ of diameter. PLA MPs, with $3\text{--}9 \mu\text{m}$ of diameter, were prepared by Resinex (Belgium) from Ingeo™ Biopolymer 4043D provided by NatureWorks LLC (United States).

To test our methods on a combination of polymers, we used a mixture of macroplastics collected from the Seine estuary, that was crushed and cryo-grinded into microplastics used for studies within the French Plastic-Seine project. Samples were composed in weight of 65% of PE (40% LDPE and 25% HDPE), 25% of Polypropylene (PP) and 10% of PS. These three polymers are representative of global contamination by MPs because they are massively produced every year and are common in marine environment (Avio et al., 2017). Overall, 7% of MPs in this sample had a size in our targeted size range $< 10 \mu\text{m}$.

2.2 Copepods

2.2.1 Experimental Copepods

The culture of the copepod *E. affinis* used in our experiments comes from wild individuals sampled in September 2014 from the oligohaline zone of the Seine estuary and maintained since that date at the Marine Station of Wimereux at a constant temperature of 19°C with 12:12 photoperiod at salinity 15 PSU (seawater from the English Channel adjusted to salinity with deionized water) (Michalec et al., 2017) using the multi-generations protocol developed by our group (Souissi et al., 2016; Das et al., 2020). This mass culture provides standardized individuals for ecotoxicological studies. In this work, we focused on adult stages by using both genders for the MPs exposures.

Copepods were fed with the *Rhodomonas* sp. microalga which is a good nutritional source for copepods, allowing high performance of the culture (Dayras et al., 2021). Copepods were starved for 1 week before exposure to MPs, both to render MPs more attractive for feeding but also to facilitate observation with fluorescence microscope because of the relative auto-fluorescence of *Rhodomonas* sp. cells.

2.2.2 Copepods Sampled From the Field

To validate our methods on environmental samples, 60 adults of *E. affinis* were isolated from “La Bouille” (GPS coordinates: 49.35407849415815, 0.9293737816503634) station by the laboratory of Functional ecology and Environment of Toulouse (EcoLab-UMR CNRS-UPS-INPT 5245) using a plankton net in the context of SENTINELLES project (<https://www.seine-aval.fr/projet/sentinelles/>). Copepods were sampled at two different points by filtering 50 L of water on a $50 \mu\text{m}$ net. Next, each zooplankton sample was maintained in 200 ml formaldehyde 4% solution. This station is located in the upstream zone of the Seine estuary.

Adult individuals of *E. affinis*, were sorted to study their MPs contamination. Zooplankton samples were first sieved and rinsed abundantly to remove formaldehyde and then placed in ethanol in a homogenous way with a Motoda box. *E. affinis* individuals were then isolated with Pasteur pipette and put in a closed glass jar with 70% ethanol solution for future studies of polymers potentially ingested.

During copepod isolation, an open glassware filled with MilliQ water was placed near the operator during all handling in order to be used as control for airborne MPs contamination. This MilliQ water was then vacuum filtered and MPs were counted to evaluate the airborne contamination that could affect filters with digested copepods.

2.3 Ingestion Treatment on Experimental Copepods

For the tested MPs (i.e., PS, PE, PLA, and *in situ* MPs) in cultured copepods, the ingestion protocol was the same. One control and triplicates of 20 adults of *E. affinis* were isolated by using Pasteur pipette under binocular magnifier (Olympus SZX2-ILLK, Olympus, Japan) and then maintained in a 80 ml beaker with 15 PSU water (estuarine salinity) under constant aeration. Estuarine salinity was obtained by mixing MilliQ water with $0.2 \mu\text{m}$ filtered sea water from English Channel.

For each sample of MPs above-mentioned, a concentration of 3 mg/L of MPs (size range described in Section 2.1) was added in each beaker for 12 h in the dark to keep fluorescence of MPs when they were stained with Nile Red. For these conditions, the quantity of Nile Red adsorbed on MPs was low enough to avoid any negative effect on copepods during exposure.

2.4 Microplastics Identification Methods on Cultured Copepods

2.4.1 Staining of Microplastics

For the three staining methods described below, a stock solution of $500 \mu\text{g/ml}$ of Nile Red was prepared in acetone and stored at 4°C in the dark for future needs of the experiments.

2.4.1.1 Staining of Microplastics Before Exposure

This first staining method was performed as preliminary work. The aim of this experiment was to demonstrate the capacity of adults of *E. affinis* from mass culture to ingest MPs samples in a size range in accordance with our targeted objective for MPs ($< 10 \mu\text{m}$) from wild individuals. MPs were placed in a micro-tube

with few drops of Nile Red stock solution for 10 min in the dark. After that, stained microplastics were vacuum filtered on a Whatman™ Nuclepore polycarbonate membrane (0.2 μm, 47 mm), briefly rinsed with acetone to remove excess dye then abundantly rinsed with MilliQ water. Finally, MPs were re-suspended for the ingestion experiment previously described (Section 2.3).

2.4.1.2 Staining of Microplastics After Exposure Without Digestion Step

Staining of MPs before ingestion is not applicable for wild copepods. Thus, in order to study the possibility of detecting MPs on whole copepods using epifluorescence microscopy, we tried different staining protocols. First, we stained MPs in digestive tract after copepods ingestion without digesting organisms. To make sure individuals had MPs in the digestive tract, a total of 20 copepods for which MPs were detected in the digestive tract by using Nile Red before ingestion were left for 2 h on daylight in a Petri dish to halt the staining from the colorant. Next, copepods were put in a beaker with 20 ml of MilliQ water and then 10 μl of the Nile Red stock solution was added. Copepods were left in the dark for 10 min before the observation with epifluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon, Japan).

2.4.1.3 Staining of Microplastics After Exposure and Digestion of Individuals

After testing the possibilities offered by staining with Nile Red of MPs on whole copepods, the same techniques were directly applied to a filter, after digestion of individuals contaminated by MPs and vacuum filtration. The hypothesis of this method was to still use the advantage of staining with Nile Red and making applicable a Raman microspectroscopy identification. As Polycarbonate filters were used, a second solution of Nile Red (5 μg/ml) in n-hexane solvent was prepared by diluting the stock solution made in acetone. N-hexane was used to not modify Polycarbonate filter properties following a previous study (Shim et al., 2016). This lowest concentration of Nile Red was used to still stain MPs without inducing too much background fluorescence.

After digestion of individuals and vacuum filtration of the lysate, the solution was briefly vortexed and 1 ml was added on filter and then left for 10 min to induce total evaporation of the solvent. The same staining protocol was performed for our tests on aluminum oxide filters.

2.4.2 Preparation of Copepods for Microplastics Identification

For the mass cultured copepods, at the end of the ingestion protocol, individuals were sieved, fixed with ethanol 70% and then gently rinsed with MilliQ water to remove MPs on external parts of copepods like cuticle and appendices.

Then, the next step for the copepods preparation depended on the final analytical method used:

For the two first staining protocols, that did not require digestion of copepods as previously described, individuals were

directly placed on microscopy glass slides and observed with the epifluorescence microscope.

For the tests on digested copepods, a pool of 20 individuals contaminated with MPs was placed in a 100 ml Erlenmeyer flask with 20 ml MilliQ water and 160 μl (0.2 mg/ml) of Proteinase K solution (AppliChem GmbH, Germany). Digestion of copepods was performed overnight at 50°C (optimum temperature for Proteinase K activity) under agitation, followed by 20 min sonication. Lysate was vacuum filtered on Whatman™ Nuclepore polycarbonate black membrane (0.2 μm, 47 mm) or Whatman™ Anodisc™ aluminum oxide filter (0.2 μm, 47 mm) depending on the experiments.

Cellulose filters were not used because of the high Raman signal emitted by cellulose (Wright et al., 2019). Paper, and fiberglass were used in our preliminary tests but quickly eliminated from our final protocol because of their relative thickness that don't allow to easily identify MPs on the filter.

Filters were finally placed in Petri dishes covered with Parafilm applied to minimize external contamination by airborne MPs, and then placed in a desiccator with silica gel until future analysis.

For Raman microspectroscopy analysis, the same digestion protocol was followed.

2.4.3 Identification of Microplastics With Epifluorescence Microscopy

Samples were analyzed with an epifluorescence microscope at an excitation wavelength of 455 nm and an emission wavelength of 494 nm with objectives ×10, ×20, and ×40 (Olympus, Japan), when necessary. For the digested samples, during observation, zones of potential presence of MPs were delimited with a pencil to take less observation time for the micro-Raman manual detection and identification.

2.4.4 Identification With Raman Microspectroscopy

Filters were analyzed using a micro-Raman Xplora Plus (HORIBA Scientific®, France) equipped with a closing chamber that prevent filters from external airborne contamination. Zones of presence of potential MPs marked previously were observed with an objective ×10 and then ×100 by using a microscope (Olympus, France). Particles detected were analyzed with two lasers with a wavelength of 532 nm and 785 nm depending on particle on the range of 200–3,300 cm⁻¹ to obtain spectra of main polymers (Käppler et al., 2016). For each suspected MP, Raman spectrum was compared to a polymer identification database (KnowItAll, BioRad®) and a personal library made with standard polymers obtained from Goodfellow (France). For the samples prepared from copepods collected in the Seine estuary, photos of items were taken using Labspec 6 software (Horiba Scientific, Japan). Moreover, their size, shape and color were recorded.

2.5 Application of Validated Method to Copepods Collected From the Field

A pool of 60 individuals sampled from the Seine estuary was analyzed by using the most effective method develop from our

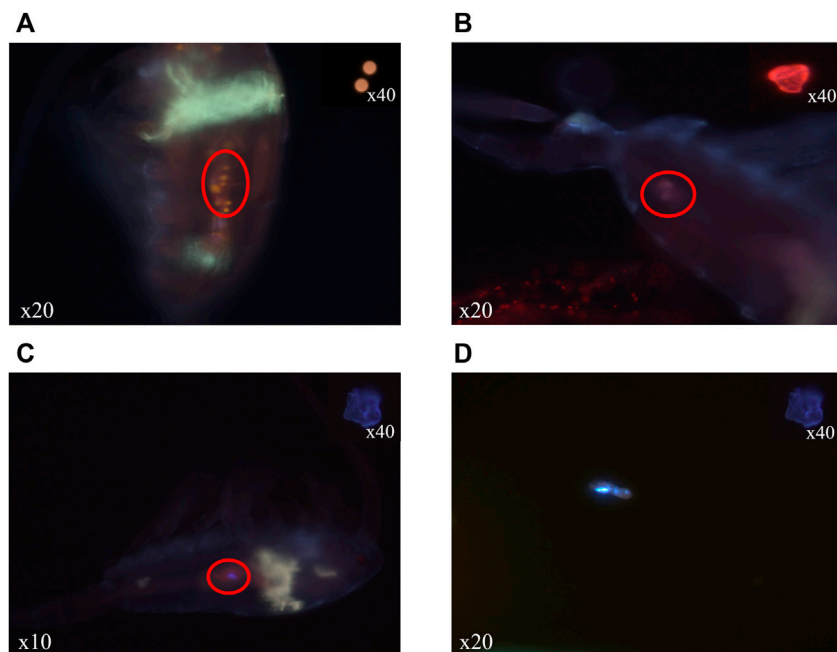


FIGURE 1 | Microplastics of PS (A), PLA (B) and PE (C), (D) stained with Nile Red and detected (red circles) in digestive tracts (A–C) and faeces (D) after ingestion treatment of individuals of *E. affinis* with epifluorescence microscope (crime light: 455–494 nm).

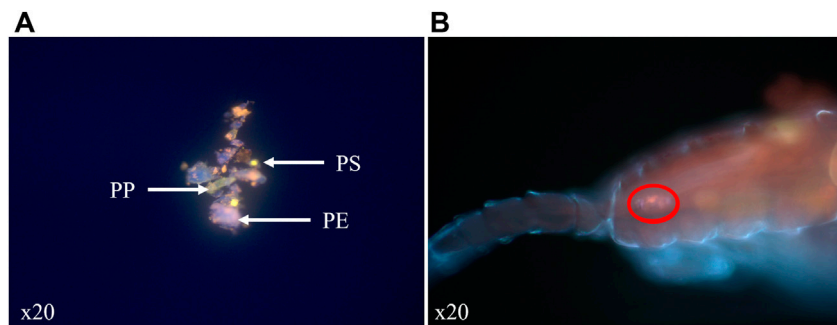


FIGURE 2 | Sample of *in situ* MPs mixture stained with Nile Red and observed with epifluorescence microscope (crime light: 455–494 nm) (A). (B) Observation of *in situ* MPs ingested and visible (red circle) as a compact orange orb in the digestive tract of an adult copepod of *E. affinis*.

conclusions on cultured copepods. Briefly, individuals were digested and then filtered on Whatman™ aluminum oxide filters. Furthermore, our results on experimental copepods showed the need to use aluminum oxide filter for chemical identification of small MPs (<10 μm) with Raman microspectroscopy. However, staining method was impossible with this filter type. In order to minimize the observation time of potential MPs on filter during Raman analysis, staining of MPs and epifluorescence observation was replaced by preliminary binocular magnifier observation (Olympus SZX10, Olympus, Japan) during which zones of potential MPs presence were delimited with a pencil and then particles were analyzed with Raman microspectroscopy as described above.

3 RESULTS

3.1 Staining Methods of Microplastics on Whole Copepods

Our preliminary tests of staining with Nile Red MPs before ingestion allowed us to stain and observe monomeric polymers (Figure 1) and *in situ* MPs using fluorescence microscopy. Thanks to the solvatochromic nature of Nile Red, the different observed polymers had a different staining pattern depending on their surface polarity characteristics (Maes et al., 2017). This characteristic allowed the detection of each polymer type separately (PS, PE or PLA) in the digestive tract of the individuals of *E. affinis* and also in their feces.

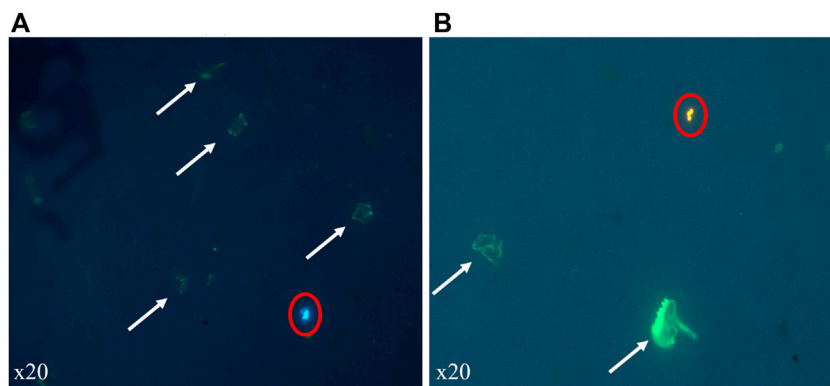


FIGURE 3 | Observation of experimental copepods contaminated with MPs (red circles) of LDPE (A) and PS (B) and digested on black polycarbonate membrane filters. Filters were stained with Nile Red and observed with epifluorescence microscopy (crime light: 455–494 nm). Residual's cuticle fragments are present as green translucent particles (white arrows).

For the *in situ* MPs mixture, we compared the relative abundance of each staining color with the sample to determine which polymer matches which each color (Figure 2A) and confirmed the results with micro-Raman. Contrary to PS and PP, particles surfaces of PE were composed in variable proportions of two staining colors. This characteristic arises because polyethylene was an assembly of HDPE and LDPE which changes the solvatochromic nature of Nile Red. This quick staining method confirmed that *E. affinis* adults are able to ingest MPs fragments and beads in the size range targeted to calibrate our methods and similar to their common food items. We noted that when ingested and visible in the digestive tract of the copepods, only the major staining color of the sample, given by most PE particles in the *in situ* MPs mixture, is visible with epifluorescence microscope (Figure 2B). For all the studied MPs types, we noted that this method, based on epifluorescence microscopy observation of stained with Nile Red MPs before ingestion, is limited by the natural fluorescence of copepods, notably the cuticles and the lipid droplets. The consequences are that MPs can be missed and quantification is difficult.

After ingestion by copepods, MPs were stained using Nile Red. This approach could have led to a methodology applicable for environmental samples of copepods with no digestion step. But, during observation, we noticed that staining with Nile Red was not applicable because it only stained lipid droplets of copepods and did not interact with the MPs in the digestive tract. At this point, digestion of individuals was a mandatory step to find a method based on fluorescence microscopy and Raman microspectroscopy operable on wild copepods.

3.2 Digestion of Copepods and Fluorescence Observations of the Stained Microplastics on Filters Resulting From Vacuum Filtration of the Lysate

By visual inspection, we noted that digestion method was effective to digest all organic materials of the copepod and break down chitin materials into small pieces recognizable as remaining translucent green fragments (Figures 3A,B), after staining with Nile Red and

epifluorescence microscopy on black polycarbonate membrane filter. During epifluorescence observation, we detected that PE (Figure 3A) and PS (Figure 3B) had the same colorations as showed by our previous method when MPs were stained before ingestion without digestion of individuals.

Regarding staining method on aluminum oxide filters, much more background noise was observed probably due to the interaction between Nile Red and nature of the filter. Particles on the filter were much less noticeable (Figure 4). No critical differences were observed between MPs and cuticle fragments that permit to distinguish them.

3.3 Raman Microspectroscopy on Experimental Copepods

The first hypothesis was to couple the staining method that permit a quick detection of MPs on filter with a chemical

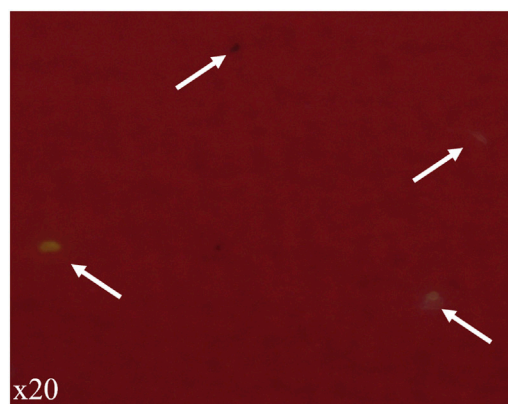


FIGURE 4 | Observation of experimental copepods contaminated with MPs of LDPE and digested on aluminum oxide filter. Filter was stained with Nile Red and observed with epifluorescence microscopy (crime light: 455–494 nm). Ingested MPs and cuticle fragments were present on filter but undistinguishable.

TABLE 1 | Summary table of all tested filters (except for Cellulose) and possibilities it offers for Nile Red staining with epifluorescence microscopy and Raman spectroscopy to detect and characterize MPs ingested by copepods from the natural environment.

Material of the Filter	Ease of visual detection of MPs	Possibility of coupling epifluorescence and spectroscopy Raman	Limit of chemical characterization of MPs with Raman spectroscopy
Cellulose	Not tested ^a		
Paper	No		
Glass fiber	No		
PC Black	Yes	Yes	> 10 μm
Aluminum oxide	Yes	No	> 1 μm

^aMaterial was excluded because of the high Raman signal of cellulose.

identification with Raman microspectroscopy. But, over these advantages, we had a limit of polymer identification with micro-Raman relatively high (>10 μm) for polycarbonate black membrane filter compared to aluminum oxide one for which several ingested MPs of 1 μm were successfully characterized. Furthermore, the Raman background emitted by the polycarbonate filter didn't allow to analyze plastic particle in the target size of 1–10 μm we fixed. Consequently, aluminum oxide filter was selected for the detection of MPs on *in situ* collected individuals (Table 1).

3.4 First Impression of Microplastics Contamination of *Eurytemora affinis* in the Seine Estuary

In total, 17 microplastics for an average of 0.28 MPs/individuals were found from the 60 (3 replicates of 20 individuals) analyzed copepods (Table 2). Eight different types of polymers were identified except for the polymer nature of one fiber due to the intensity of the fluorescence that masked the Raman signal. Polystyrene (PS) was the most common polymer found with five items, followed by High-density Polyethylene (HDPE), polypropylene (PP), polycarbonate (PC), Polyethylene terephthalate (PET) with two particles for each type. Finally, we found one particle for a copolymer composed of Polyamide (PA) and Polyvinyl acetate (PVAc) (Supplementary Figure S1), and also one particle for Polyamide and Low-density Polyethylene (LDPE). Regarding to the shape of items, no microbeads were observed. Fiber was the predominant shape (59%) followed by the fragment one (41%). Blue, black, and pink were the most identified colors with respectively six, five and three particles, followed by red, orange and translucent with one particle for each.

TABLE 2 | Average (\pm SD), minimum and maximum of size of ingested MPs found in the copepod *Eurytemora affinis* collected in the area "La Bouille" in the French Seine estuary.

Shape	Mean (μm)	SD (μm)	Min. (μm)	Max. (μm)
Fragment	13.3	9.6	2.1	33.3
Fiber (length)	391.6	600.4	21.9	1726.0
Fiber (diameter)	14.1	9.5	2.1	21.8

4 DISCUSSION

4.1 Detection of Microplastics on Cultured Copepods Using Nile Red Staining

The staining method using Nile Red in acetone, previously developed in the literature (Cole, 2016), allowed us to stain and observe with blue light polymers when they were alone or in mixture in the digestive tract of adult individuals of *E. affinis*. This showed the physiological capacity of this species to ingest MPs of size ranged between 1 and 10 μm . Our observations confirmed the solvatochromic nature of Nile Red that allowed us to discriminate the most common polymers (PE, PS, and PP) as well as the PLA based on surface polarity characteristics (Maes et al., 2017). This method of staining MPs before ingestion treatment on copepods gave crucial information like lipid accumulation, feeding, food selectivity or fecal density when individuals from other species interact with MPs (Cole et al., 2019; Coppock et al., 2019) and could be clearly applied in the future to *E. affinis* (or other similar species) to better quantify the interaction between MPs and this species in the aquatic environment. Moreover, we demonstrate the capacity of Nile Red to stain a biobased polymer (PLA) and detect it in copepods gut. This could lead to the study of other biobased or biodegradable polymers impacts on copepods life traits.

However, our results highlighted that staining MPs with Nile Red cannot be used to accurately quantify the plastic fragments in the gut of copepods. In addition, staining of MPs after ingestion by copepods was not effective due to the high affinity of Nile Red for copepod's lipid droplets (Song Y. S. et al., 2015) and so couldn't be applied directly on whole copepods from the natural environment. Thus, we suggest that digestion of copepod is a necessary step when quantitative results or chemical characterization of polymers are needed like for wild sampled individuals.

4.2 Digestion Efficacy and Special Case of Polylactic Acid

Regarding to studies on biotic or abiotic compartments, there is no standardized protocol for the digestion of organic material and the isolation of MPs. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and KOH have

been the most used chemical treatments for this purpose (Renner et al., 2018; Kazour et al., 2019). In case of copepods, most studies used a digestion treatment with nitric acid (HNO₃) developed by Desforges et al. (2015). In this study, we used an enzymatic digestion with Proteinase K because of its capacity to mineralize biological tissues without causing damages on small microplastics (Cole et al., 2014). Furthermore, Claessens et al. (2013) showed that strong mineral acids as HNO₃ can oxidize and damage or destroy MPs from polymers with a low pH tolerance as PS or Polyamide (PA) and so can lead to an under estimation of MPs.

After heated incubation of samples with Proteinase K, 100% of the organic material of copepod was digested. Despite the constant agitation during this step, cuticles appeared intact for 90% of individuals and engendered an additional difficulty to detect the MPs released from the gut of the copepods. However, the additional step of sonication for 20 min solved this problem and cuticles were present as small fragments on filter after vacuum filtration that permitted to identify MPs directly on it with fluorescence microscopy or Raman microspectrometry.

It is important to keep in mind that our experiments for digesting copepods contaminated with PLA microplastics showed complete digestion of particles of this polymer. Previous study on copolymer's films (10 mm × 10 mm × 0.4 mm) showed the capacity of proteinase K to degrade L-lactyl units compared to D-lactyl ones (Li et al., 2000). Because PLA represents one of the best alternatives to replace non-biodegradable plastics, particularly polypropylene (European Bioplastics, 2018), future research is needed to correctly study the fate of this plastic on wild biota samples.

4.3 Polycarbonate Black Membrane Filter and Microplastics Identification Possibilities

This type of filter coupled with Nile Red staining in n-hexane has been used in the past to detect microplastics in water and sand samples collected from the field (Shim et al., 2016). Authors reported the relative facility of detection during epifluorescence observation because of the flat surface and the black background of this filter. In our study, this method was effective to detect MPs of contaminated copepods. Contrary to the tests done before on Amphipod carapace (Shim et al., 2016), the cuticles fragments in our study were stained, which showed a clear green fluorescence pattern during the microscopic observation. In the case of remaining chitin fragments that could represent an issue for future identifications, chitinase enzyme can be used (Cole et al., 2014).

This first step of microplastics detection cannot precisely give the polymeric nature of microplastics. It can be considered as a useful and simple visual method to quickly detect suspected microplastics and directly target areas of their presence for further chemical identification with Raman microspectroscopy. Indeed, our results showed that polycarbonate black membrane filter can represent a good option for coupling Nile Red staining, epifluorescence microscopy and Raman spectroscopy but this filter is limited by the relatively high limit of detection of MPs. Nevertheless, in our case the use of black polycarbonate filter led

to a lower micro-Raman identification limit of 10 μm due to high fluorescence emitted by filter material that didn't meet our main objective.

4.4 Aluminum Oxide Filter: Lowering the Detection Limit of Microplastics for Micro-Raman Spectroscopy Identification

Aluminum oxide filter was tested in the past on pristine microplastics (4–50 μm) to detect airborne contamination. It showed a globally low intensity Raman signal, a clear visual detection of suspected microplastics on filter but didn't permit authors to map microplastics using Streamline mode, contrary to silver membrane and mixed cellulose filters (Wright et al., 2019) with a 785 nm laser. Contrary to this last conclusion, we were able to identify pristine microplastics of PS and PE of 1–10 μm size range with this filter. This could be due to the relatively high wavelength used in this study. In fact, during our analysis, we saw that lowering the wavelength from 785 nm to 532 nm generally leads to an identifiable spectrum result with much less background noise for MPs of few microns.

Wright et al. (2019) also reported weaker intensity bands of PS microplastics due to interference when cellulose filters are used. This can lead to an under estimation of PS microplastics when Raman microspectroscopy is used to identify them, especially to detect microplastics ingested by copepods in the field (Sun et al., 2018a).

4.5 Validation of Full Method on Copepods From the Natural Environment

Our results on mass cultured copepods showed that despite the technical impossibility to detect MPs with staining and epifluorescence microscopy with aluminum oxide filter, this method represented the best option to identify microplastics of few microns with Raman microspectroscopy as a final method. To try to save analysis time, fluorescence method was replaced by a visual inspection with a stereomicroscope magnifier.

To validate our methodology on wild copepods, 60 individuals were digested and studied. With 94.1% of microplastics for which polymer was clearly identified with a minimum size of 2.1 μm, we can assume that aluminum oxide filter represents a robust solution for manual Raman microspectroscopy MPs identification proposing a methodology that lowers the restraint of detecting microplastics ingested by copepods observed in the literature (7 μm) (Sun et al., 2018a).

Gasperi and Cachot (2021) studied the levels of MPs contamination of the Seine estuary in the same sampling station of copepods studied in this paper. Even though they focused their research on the fraction >50 μm, they reported in the sampled station studied a concentration of 5 MP/m³ with three shapes: predominantly fragments, microbeads, and fibers. In our study, we showed that fibers were the most ingested shape followed by fragments, respectively 59% and 41%. The difference of abundance of fiber shape in abiotic compartment compared to our results on biota can be explained by the relatively high mesh size of 300 μm

used that don't permit to capture small fibers properly. Furthermore, punctual sampling with an 80 μm mesh size showed higher density of fiber shape MPs in this study. Additionally, most studies on MPs contamination of field copepods also reported fiber shape as the predominant ingested one (Sun et al., 2017; Sun et al., 2018a; Sun et al., 2018b; Zheng et al., 2021).

About identified polymers, our results are consistent regarding polymers identified in the Seine estuary (Gasperi and Cachot, 2021). Furthermore, this study and ours demonstrated a dominance of Polyethylene, Polystyrene, Polypropylene, and Polyethylene terephthalate to other polymers.

With an average retention of 0.28 MPs per individual, our results showed higher concentration of ingested MPs in copepods from Seine estuary compared to other similar studies where the concentrations ranged from 0.03 MPs/individual in northeast Pacific Ocean (Desforges et al., 2015) to 0.26 MPs/individual in Jiaozhou Bay — Yellow Sea (Zheng et al., 2021). For these two studies, MPs contamination of water column was not studied, so it is difficult to conclude if this difference can be explained by the level of MPs impregnation of water column or by the limit of detection of MPs. Nevertheless, Md Amin et al. (2020), performed MPs contamination analysis in both water with sampling conditions close to Gasperi and Cachot (2021) and copepods. Results of MPs in water ranged from 0.3 to 1.45 MPs/L and a mean of 0.13 MPs/individual were found in calanoid copepods with a limit of detection of 100 μm with FTIR. We can make the hypothesis that with concentrations between 60–290 times higher in water, ingested MPs concentration could have been higher as measurements were also on calanoid species.

In conclusion, we developed in this study a new methodology to identify MPs ingested by copepods with a new size limit of detection of 1 μm . Enzymatic digestion was the first critical point developed to ensure a correct degradation of organisms without a doubt to degrade potential polymers. Our results on cultured and wild copepods indicate the ability of Proteinase K coupled with ultra-sonification to correctly digest copepods for MPs characterization without causing damages on low pH tolerance classic polymers. However, the use of this enzyme led to a total digestion of PLA fragments in our conditions. Future studies should be achieved to better know the tolerance of other biobased or biodegradable polymers to chemical or enzymatic digestion protocols used to study MPs biota or environmental contamination.

We demonstrate that using aluminum oxide filter for Raman microspectroscopy analysis allow reaching a size limit for MPs detection in copepods down to 1 μm , which is far lower than found in current literature. Our approach is promising to better estimate MPs impregnation in key organisms, like copepods.

REFERENCES

- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (8), 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
- Arthur, C., Baker, J. E., and Bamford, H. A. (2008). *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris*. Dissertation. Tacoma, WA: University of Washington.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SS, SM, SB, MK, J-MR, and RA helped in drafting the manuscript and approved the current version. JT conceived and performed the experiments. CB and DD contributed to experiments. MK and MM helped for Raman microspectroscopy analyses. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study is a part of the Ph.D. thesis of JT from the University of Mons and University of Littoral Côte d'Opale, funded in equal parts by the two Universities. This work is also a contribution to the CPER MARCO 2014-2020 and CPER 2021-2027 IDEAL projects funded by the region Hauts-de France, the French government, Europe (FEDER) and IFREMER. This study is also a contribution to the Plastic-Seine project funded by GIP Seine-Aval and to the International Associated Laboratory between the Université de Lille and the National Taiwan Ocean University (IAL MULTIFAQUA).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Michele Tackx from EcoLab laboratory for the environmental samples of copepods and Jérôme Cachot from EPOC laboratory for the samples of microplastics. We also thank Urania Christaki from LOG laboratory to let us use her epifluorescence microscope for our experiments. SB acknowledge supports by the European Community (FEDER) for general support in the frame of LCFM-BIOMAT. J-MR is a FRS-FNRS Research Associate. We are grateful to the past and current members of the group of SS for maintaining the continuous plankton cultures during 2 decades. We are thankful to Shagnika Das for her help with the English and for her comments on the MS.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvc.2022.905303/full#supplementary-material>

- Avio, C. G., Gorbi, S., and Regoli, F. (2017). Plastics and Microplastics in the Oceans: From Emerging Pollutants to Emerged Threat. *Mar. Environ. Res.* 128, 2–11. doi:10.1016/j.marenvres.2016.05.012
- Blight, L. K., and Burger, A. E. (1997). Occurrence of Plastic Particles in Seabirds from the Eastern North Pacific. *Mar. Pollut. Bull.* 34 (5), 323–325. doi:10.1016/S0025-326X(96)00095-1
- Campani, T., Bains, M., Giannetti, M., Cancelli, F., Mancusi, C., Serena, F., et al. (2013). Presence of Plastic Debris in Loggerhead Turtle Stranded along the

- Tuscany Coasts of the Pelagos Sanctuary for Mediterranean Marine Mammals (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 74 (1), 225–230. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.06.053
- Carpenter, E. J., Anderson, S. J., Harvey, G. R., Miklas, H. P., and Peck, B. B. (1972). Polystyrene Spherules in Coastal Waters. *Science* 178 (4062), 749–750. doi:10.1126/science.178.4062.749
- Claessens, M., Van Cauwenbergh, L., Vandegehuchte, M. B., and Janssen, C. R. (2013). New Techniques for the Detection of Microplastics in Sediments and Field Collected Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 70 (1–2), 227–233. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.03.009
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2014). Isolation of Microplastics in Biota-Rich Seawater Samples and Marine Organisms. *Sci. Rep.* 4, 4528. doi:10.1038/srep04528
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2015). The Impact of Polystyrene Microplastics on Feeding, Function and Fecundity in the Marine Copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49 (2), 1130–1137. doi:10.1021/es504525u
- Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., et al. (2016). Microplastics Alter the Properties and Sinking Rates of Zooplankton Faecal Pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50 (6), 3239–3246. doi:10.1021/acs.est.5b05905
- Cole, M., Coppock, R., Lindeque, P. K., Altin, D., Reed, S., Pond, D. W., et al. (2019). Effects of Nylon Microplastic on Feeding, Lipid Accumulation, and Moulting in a Coldwater Copepod. *Environ. Sci. Technol.* 53 (12), 7075–7082. doi:10.1021/acs.est.9b01853
- Cole, M. (2016). A Novel Method for Preparing Microplastic Fibers. *Sci. Rep.* 6, 34519. doi:10.1038/srep34519
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queirós, A. M., and Lindeque, P. K. (2019). Microplastics Alter Feeding Selectivity and Faecal Density in the Copepod, *Calanus helgolandicus*. *Sci. Total Environ.* 687, 780–789. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.009
- Das, S., Ouddane, B., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2020). Intergenerational Effects of Resuspended Sediment and Trace Metal Mixtures on Life Cycle Traits of a Pelagic Copepod. *Environ. Pollut.* 267, 115460. doi:10.1016/j.envpol.2020.115460
- Dayras, P., Bialias, C., Sadovskaya, I., Lee, M.-C., Lee, J.-S., and Souissi, S. (2021). Microalgal Diet Influences the Nutritive Quality and Reproductive Investment of the Cyclopoid Copepod *Paracyclops Nana*. *Front. Mar. Sci.* 8, 697561. doi:10.3389/fmars.2021.697561
- Desforges, J.-P. W., Galbraith, M., and Ross, P. S. (2015). Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 320–330. doi:10.1007/s00244-015-0172-5
- European Bioplastics (2018). Bioplastics Market Data Report. Available at: https://www.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market-Data_2018.pdf (Accessed October 10, 2021).
- Frias, J. P. G. L., Otero, V., and Sobral, P. (2014). Evidence of Microplastics in Samples of Zooplankton from Portuguese Coastal Waters. *Mar. Environ. Res.* 95, 89–95. doi:10.1016/j.marenvres.2014.01.001
- Gasperi, J., and Cachot, J. (2021). *Flux et impacts des microplastiques dans l'estuaire de la Seine*. Rouen: GIP Seine-Aval.
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., et al. (2017). Adverse Effects of Microplastics and Oxidative Stress-Induced MAPK/Nrf2 Pathway-Mediated Defense Mechanisms in the Marine Copepod *Paracyclops Nana*. *Sci. Rep.* 7, 41323. doi:10.1038/srep41323
- Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.-J., et al. (2016). Analysis of Environmental Microplastics by Vibrational Microspectroscopy: FTIR, Raman or Both? *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8377–8391. doi:10.1007/s00216-016-9956-3
- Kazour, M., Jemaa, S., Issa, C., Khalaf, G., and Amara, R. (2019). Microplastics Pollution along the Lebanese Coast (Eastern Mediterranean Basin): Occurrence in Surface Water, Sediments and Biota Samples. *Sci. Total Environ.* 696, 133933. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133933
- Laist, D. W. (1997). “Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records,” in *Marine Debris*. Editors J. M. Coe and D. B. Rogers (New York: Springer), 99–139. doi:10.1007/978-1-4613-8486-1_10
- Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C. A., Mackenzie, D. M. A., and Nielsen, T. G. (2015). A Critical Assessment of Visual Identification of Marine Microplastic Using Raman Spectroscopy for Analysis Improvement. *Mar. Pollut. Bull.* 100 (1), 82–91. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.09.026
- Li, S., Tenon, M., Garreau, H., Braud, C., and Vert, M. (2000). Enzymatic Degradation of Stereocopolymers Derived from L-, D- and Meso-Lactides. *Polym. Degrad. Stab.* 67 (1), 85–90. doi:10.1016/S0141-3910(99)00091-9
- Li, L.-L., Amara, R., Souissi, S., Dehaut, A., Duflos, G., and Monchy, S. (2020). Impacts of Microplastics Exposure on Mussel (*Mytilus edulis*) Gut Microbiota. *Sci. Total Environ.* 745, 141018. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141018
- Lindeque, P. K., Cole, M., Coppock, R. L., Lewis, C. N., Miller, R. Z., Watts, A. J. R., et al. (2020). Are We Underestimating Microplastic Abundance in the Marine Environment? A Comparison of Microplastic Capture with Nets of Different Mesh-Size. *Environ. Pollut.* 265 (A), 114721. doi:10.1016/j.envpol.2020.114721
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., and Mayes, A. G. (2017). A Rapid-Screening Approach to Detect and Quantify Microplastics Based on Fluorescent Tagging with Nile Red. *Sci. Rep.* 7, 44501. doi:10.1038/srep44501
- Mauchline, J. (1998). “The Biology of Calanoid Copepods,” in *Advances in Marine Biology*. Editor J. Mauchline (London, New York: Academic Press), 170.
- Md Amin, R., Sohaimi, E. S., Anuar, S. T., and Bachok, Z. (2020). Microplastic Ingestion by Zooplankton in Terengganu Coastal Waters, Southern South China Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 150, 110616. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110616
- Michalec, F.-G., Fouxon, I., Souissi, S., and Holzner, M. (2017). Zooplankton Can Actively Adjust Their Motility to Turbulent Flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114 (52), 11199–11207. doi:10.1073/pnas.1708888114
- Napper, I. E., and Thompson, R. C. (2016). Release of Synthetic Microplastic Plastic Fibres from Domestic Washing Machines: Effects of Fabric Type and Washing Conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 112 (1–2), 39–45. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.09.025
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., and Thompson, R. C. (2015). Characterisation, Quantity and Sorptive Properties of Microplastics Extracted from Cosmetics. *Mar. Pollut. Bull.* 99 (1–2), 178–185. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.029
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Duarte, A. C., and Rocha-Santos, T. (2019). Methods for Sampling and Detection of Microplastics in Water and Sediment: A Critical Review. *Trends Anal. Chem.* 110, 150–159. doi:10.1016/j.trac.2018.10.029
- Renner, G., Schmidt, T. C., and Schram, J. (2018). Analytical Methodologies for Monitoring Micro(nano)plastics: Which Are Fit for Purpose? *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 1, 55–61. doi:10.1016/j.coesh.2017.11.001
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., and Fossi, M. C. (2015). First Evidence of Presence of Plastic Debris in Stomach of Large Pelagic Fish in the Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 95 (1), 358–361. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.048
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., and Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and Transfer of Microplastics in the Planktonic Food Web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.013
- Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., and Jang, M. (2016). Identification and Quantification of Microplastics Using Nile Red Staining. *Mar. Pollut. Bull.* 113 (1–2), 469–476. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.049
- Song Y. K., Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Han, G. M., Rani, M., Lee, J., et al. (2015). A Comparison of Microscopic and Spectroscopic Identification Methods for Analysis of Microplastics in Environmental Samples. *Mar. Pollut. Bull.* 93 (1–2), 202–209. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.01.015
- Song Y. S., Y. S., Won, Y. J., and Kim, D. Y. (2015). Time-lapse *In Situ* Fluorescence Lifetime Imaging of Lipid Droplets in Differentiating 3T3-L1 Preadipocytes with Nile Red. *Curr. Appl. Phys.* 15 (12), 1634–1640. doi:10.1016/j.cap.2015.09.006
- Souissi, A., Souissi, S., and Hwang, J. S. (2016). Evaluation of the Copepod *Eurytemora Affinis* Life History Response to Temperature and Salinity Increases. *Zool. Stud.* 55, e4. doi:10.6620/ZS.2016.55-04
- Strickler, J. R. (1982). Calanoid Copepods, Feeding Currents, and the Role of Gravity. *Science* 218 (4568), 158–160. doi:10.1126/science.218.4568.158
- Sun, X., Li, Q., Zhu, M., Liang, J., Zheng, S., and Zhao, Y. (2017). Ingestion of Microplastics by Natural Zooplankton Groups in the Northern South China Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 115, 217–224. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.12.004
- Sun, X., Liu, T., Zhu, M., Liang, J., Zhao, Y., and Zhang, B. (2018a). Retention and Characteristics of Microplastics in Natural Zooplankton Taxa from the East China Sea. *Sci. Total Environ.* 640–641, 232–242. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.05.308

- Sun, X., Liang, J., Zhu, M., Zhao, Y., and Zhang, B. (2018b). Microplastics in Seawater and Zooplankton from the Yellow Sea. *Environ. Pollut.* 242, 585–595. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.014
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.-a., and Watanuki, Y. (2013). Accumulation of Plastic-Derived Chemicals in Tissues of Seabirds Ingesting Marine Plastics. *Mar. Pollut. Bull.* 69 (1-2), 219–222. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.12.010
- Tramoy, R., Colasse, L., Gasperi, J., and Tassin, B. (2019). Plastic Debris Dataset on the Seine River Banks: Plastic Pellets, Unidentified Plastic Fragments and Plastic Sticks are the Top 3 Items in a Historical Accumulation of Plastics. *Data Brief* 23, 103697. doi:10.1016/j.dib.2019.01.045
- Vroom, R. J. E., Koelmans, A. A., Besseling, E., and Halsband, C. (2017). Aging of Microplastics Promotes Their Ingestion by Marine Zooplankton. *Environ. Pollut.* 231 (1), 987–996. doi:10.1016/j.envpol.2017.08.088
- Wright, S. L., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013). The Physical Impacts of Microplastics on Marine Organisms: A Review. *Environ. Pollut.* 178, 483–492. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031
- Wright, S. L., Levermore, J. M., and Kelly, F. J. (2019). Raman Spectral Imaging for the Detection of Inhalable Microplastics in Ambient Particulate Matter Samples. *Environ. Sci. Technol.* 53 (15), 8947–8956. doi:10.1021/acs.est.8b06663
- Zheng, S., Zhao, Y., Liu, T., Liang, J., Zhu, M., and Sun, X. (2021). Seasonal Characteristics of Microplastics Ingested by Copepods in Jiaozhou Bay, the Yellow Sea. *Sci. Total Environ.* 776, 145936. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145936

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Thery, Bialais, Kazour, Moreau, Dufour, Benali, Amara, Monchy, Raquez and Souissi. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Ram Kumar,
Central University of Bihar, India

REVIEWED BY

P. Sathish Kumar,
National Institute of Ocean Technology,
India
Sofiene Tlili,
Conservatoire National des Arts et Métiers
(CNAM), France
Isabella Buttino,
Istituto Superiore per la Protezione e la
Ricerca Ambientale (ISPRA), Italy

*CORRESPONDENCE

Jérémy Thery
✉ jeremy.thery19@gmail.com

RECEIVED 30 May 2023

ACCEPTED 18 July 2023

PUBLISHED 08 August 2023

CITATION

Thery J, Li L-L, Das S, Dufour D, Benali S,
Raquez J-M, Souissi S and Monchy S
(2023) Multigenerational exposure of
microplastics on the microbiota of
E. affinis (copepod): a comparative
study between biodegradable and
nonbiodegradable microplastics.
Front. Ecol. Evol. 11:1231346.
doi: 10.3389/fevo.2023.1231346

COPYRIGHT

© 2023 Thery, Li, Das, Dufour, Benali,
Raquez, Souissi and Monchy. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Multigenerational exposure of microplastics on the microbiota of *E. affinis* (copepod): a comparative study between biodegradable and nonbiodegradable microplastics

Jérémy Thery^{1,2*}, Luen-Luen Li¹, Shagnika Das^{1,3},
Dylan Dufour¹, Samira Benali², Jean-Marie Raquez²,
Sami Souissi¹ and Sébastien Monchy¹

¹Univ. Littoral Côte d'Opale, CNRS, Univ. Lille, IRD, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, Wimereux, France, ²Centre d'Innovation et de Recherche des Matériaux et Polymères (CIRMAP), Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC), Université de Mons, Mons, Belgium, ³Center for Marine Science and Technology, Amity Institute of Biotechnology, Amity University, Noida, Uttar Pradesh, India

The accumulation of plastic debris around the world, especially in marine environments, has been well documented during the past decades. Recent studies have found that inorganic surfaces of microplastics (MPs) can be used by microorganisms as living substrates and form an ecosystem named "plastisphere." Some microorganisms present in MPs are capable of producing polymer-degrading enzymes. In addition, MPs can also serve as vectors and carry microorganisms (including potential pathogens) into higher trophic levels through their ingestion by animals. In this study, impacts on copepod microbiota during chronic exposure to MPs were investigated by exposing copepods to a classic single-use polymer (low-density polyethylene (LDPE)) and a biodegradable polymer (polybutylene adipate terephthalate (PBAT)). Copepods were exposed to "virgin" and "weathered" MPs during four generations at an environmentally relevant concentration of 300 µg/L, followed by one "detoxification" generation without MP exposition. Impacts of MP exposure on copepod microbiota were investigated using 16S rRNA gene high-throughput sequencing. The result of nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis showed that copepods (with or without MP exposure) carried distinguishable microbiota as compared with the microbiota of water and microalgae used for maintaining copepods. According to the results of permutational analysis of variance (PERMANOVA), the microbiota of MP-exposed (both PBAT and LDPE) copepods was significantly different from the microbiota of unexposed copepods during generations one to four. After "detoxification," however, no significant difference in microbiota composition was observed among all generation five copepods. Altogether, impacts on

copepod microbiota of MP exposure for multiple generations were observed, despite plastic origin (biodegradable or not) and aging conditions. Furthermore, copepod microbiota seemed to return to their original structure as soon as the MP exposure stopped.

KEYWORDS

microplastics, microbiota, copepod, *Eurytemora affinis*, high-throughput sequencing, LDPE, PBAT

Introduction

Due to their numerous usages in modern society for packaging, building industry, automotive, and more, world petroleum-based plastic production increased every year before the coronavirus disease (COVID) crisis in 2020 (Plastics, 2021). Even if recycling facilities and energy recovery are progressing and decreasing plastic landfills, 6.9 million tons of plastics remained in landfills in 2020 (Plastics Europe, 2021) in member states and candidate countries of the European Union (EU27 + 3). Moreover, Geyer et al. (2017) estimated that 60% of all time-produced plastics were accumulating in landfills and oceans. During the past decades, researchers demonstrated the ecological impact of this pollutant that killed high numbers of marine organisms situated at higher trophic levels, such as fishes (Romeo et al., 2015), seabirds (Tanaka et al., 2013), or marine mammals (Laist, 1997; Lusher, 2015). At present, the main solution proposed and applied to avoid this worldwide pollution is the replacement of some single-use nonbiodegradable plastics with biodegradable ones such as polybutylene adipate terephthalate (PBAT) or polylactic acid (PLA), whose durability in the environment is considered limited. However, the global assessment of the ecotoxicological impacts of these emerging bioplastics on marine ecosystems was not deeply documented (Ali et al., 2023).

When entering the seas, plastic debris is subject to physical and mechanical degradation, including photo-degradation, oxidation, abrasion (Andrady, 2011), and biological fouling in less than 24 h (Sheavly and Register, 2007). These phenomena lead to the fragmentation of plastic debris into microplastics and nanoplastics (Peng et al., 2020). Microplastics (MPs) (<5 mm) represent the hidden part and majority of plastic pollution (Lindeque et al., 2020). Apart from the degradation of larger plastic debris, sources of MPs also include synthetic textile fibers unleashed from our laundry (Napper and Thompson, 2016) and cosmetic products such as microbeads in facial cleansers (Napper et al., 2015). Approximately 6% to 12% of MPs are not captured in wastewater treatment plants and are released into the natural aquatic environments (Iyare et al., 2020), with the sea as the final destination. Because of their properties (e.g., small size, abundance, variety of density, etc.), MPs may affect a broad range of organisms from lower trophic levels such as phytoplankton (Li S. et al., 2020) and copepods (Cole et al., 2015; Thery et al., 2022) to higher trophic levels such as blue mussel *Mytilus edulis* (Von Moos et al., 2012; Li L.-L. et al., 2020) or even humans through seafood consumed (Wright et al., 2013). In copepods, studies have demonstrated that

ingestion of MPs can induce oxidative stress (Jeong et al., 2017) or modify proteome (Zhang et al., 2019), leading to lower survival and fecundity rate (Lee et al., 2013; Cole et al., 2015). When ingested and then excreted by copepods, MPs can modify the solidity, volume, and density of fecal pellets (Cole et al., 2016; Coppock et al., 2019). The fate of fecal pellets in the natural environment is driven by sedimentation speed, generally leading them to the bottom of the water column. Changes in properties in fecal pellets may affect this natural mechanism and further have an influence on carbon and nutrient cycles (Cole et al., 2016).

Previous studies have shown that MPs can be colonized by their first bacteria community only a few hours after entering the marine environment (Sheavly and Register, 2007; Dang et al., 2008; Lobelle and Cunliffe, 2011; Jacquin et al., 2019), and the community forms into a biofilm format (Oberbeckmann et al., 2015) that was named as “plastisphere” (Zettler et al., 2013). MPs offer support and protection for microorganisms in the plastisphere (Muthukumar et al., 2011), including potential pathogenic species such as *Vibrio* sp. (Zettler et al., 2013). Therefore, ingestion of such “plastisphere-carrying” MPs may introduce foreign microbial communities into animals and have impacts on their microbiota. Microbiota play a key role in maintaining the health of hosts (Man et al., 2017), and disequibrated microbiota can lead to a higher susceptibility to diseases (de Steenhuijsen Piters et al., 2022). Recently, researchers started to investigate the effects of MPs on the microbiota of animals' guts and feces. Studies showed that MP exposure significantly contributed to the decrease of bacterial families involved in nitrogen cycling and organic matter decomposition in oligochaete gut (Zhu et al., 2018) and induced dysbiosis in zebrafish intestine (Qiao et al., 2019). MP exposure also affected bacterial richness and diversity in mice gut and feces microbiota (Lu et al., 2018) and altered microbiota in blue mussels, which may lead to an increasing abundance of potential human pathogens (Li L.-L. et al., 2020). Complementary to these findings, our study differs by considering both biodegradable and nonbiodegradable MPs and their impacts on copepod microbiota throughout a multigenerational experiment. Altogether, we can hypothesize that MP ingestion, especially MPs with plastispheres, may induce dysbiosis in the microbiota of copepods that could further affect the life traits of individuals.

Copepods are considered a model organism in ecotoxicology (Kwok et al., 2015) as they represent a widely distributed group in all aquatic ecosystems (Turner, 2004), and some species can be

cultured in the laboratory. Previous studies have demonstrated acute and sublethal toxicity in copepods with a short-term exposure of a few days at high concentrations of MPs (Lee et al., 2013; Cole et al., 2015). Considering the relatively short life cycle of copepods, the effects of long-term MP exposures at environmentally realistic concentrations should be investigated using a multigenerational approach. For example, Zhang et al. (2019) have studied the multigenerational effects of polystyrene beads on the marine copepod *Tigriopus japonicus* proteome plasticity for three generations (two exposed to MPs and one recovered). The copepod species of interest in this paper, *Eurytemora affinis*, has been previously studied for multigenerational effects of natural factors such as temperature and salinity (Souissi et al., 2021) and effects of pollutants such as trace metals and contaminated sediments (Das et al., 2020; Das et al., 2022). However, studies regarding the microbiota of copepods are relatively rare. Most existing studies were focused on the specific relationship between copepods and *Vibrio* sp. (Heidelberg et al., 2002; Huq et al., 2005).

In this study, we monitored the effects on *Eurytemora affinis* microbiota for several generations during chronic MP exposure at an environmentally realistic concentration. Two types of MPs, biodegradable plastics (PBAT) and nonbiodegradable plastics (LDPE), were selected for the exposure experiment. In addition, both untreated “virgin” and pretreated “weathered” forms of MPs were used for investigating potential impacts on copepod microbiota not only by MP itself but also by microorganisms (may include potential pathogens) that were attached to MPs during the “weathering”. High-throughput sequencing of the small subunit of ribosome gene (16S rDNA) was employed to analyze the impacts of MP exposure on copepod microbial diversity. To our knowledge, this is the first study investigating the effects of MP exposure on copepod microbiota in several generations.

Materials and methods

Biological material

Cultures of the model organism *E. affinis* used for this study originated from a sampling of wild copepods in September 2014 from the oligohaline zone of the Seine Estuary (Michalec et al., 2017; Das et al., 2020). A specific protocol with controlled conditions (salinity at 15 PSU, constant temperature at 19°C, and 12:12 photoperiod) was developed (Souissi et al., 2016) to maintain the mass culture and provide standardized individuals for ecotoxicological studies (Das et al., 2020). For this experiment, a specific 300 L copepod culture, generously fed with *Rhodomonas* sp., was started 1 month before the start of the experiment to ensure the acclimation of copepods.

Microplastics

For this study, PBAT was selected to represent biodegradable plastics and LDPE for nonbiodegradable plastics. Pellets of LDPE (product code: BM50, EXXONMOBIL™, Dallas, USA) and PBAT

for (product code: Ecoflex F blend C 1200, distributed by B-Plast 2000, BASF, Ludwigshafen, Germany) were cryogenically ground (CRYOMILL, RETSCH®, Hann, Germany) into MPs in a size range of 1–10 µm because copepods were previously shown to ingest MPs < 10 µm (Thery et al., 2022). The size range of each MP sample was confirmed by Dynamic Light Scattering (Mastersizer 2000, Malvern Panalytical, Malvern, UK). MPs were prepared individually for each exposure replicates in sterilized 10 mL pill jars (540 µg MPs per jar). To prepare weathered (biologically fouled) MPs, 540 µg of MPs were mixed with 10 mL of 15 PSU water (25 µm filtered seawater diluted with deionized water to 15 PSU) in pill jars and incubated at 19°C with a 12:12 photoperiod on a rotary shaker at 200 rpm for 45 days. Each jar was covered with a drilled top to allow air exchange and prevent contamination/evaporation.

Experimental approach

During four successive generations, copepods were exposed to five conditions: control (no MPs), virgin PBAT, weathered PBAT, virgin LDPE, and weathered LDPE (each in triplicate), followed by the fifth generation without MP exposure for detoxification. For each replicate, copepods were maintained in a 2-L beaker filled with 1.8 L of 15 PSU water with constant airflow through a glass pipette. During the five generations, copepods were fed every 2 days with 10 mL of *Rhodomonas* sp. microalgae (Dayras et al., 2021). Previously established methods (Souissi et al., 2010; Souissi et al., 2016) were followed for preparing microalgae cultures and feeding copepods.

In order to have copepods in synchronized lifecycle stages, a specific protocol was followed (Das et al., 2020). To start each generation, every beaker was filled with a laying nest and 1.8 L of freshly prepared 15 PSU water, followed by 30 ovigerous females from the mass culture. After 2–3 days, eggs that have been released by females will have passed through the 200-µm mesh of the laying nest. At this moment, non-ovigerous females were removed with laying nests, and then MP samples were added according to respective conditions (final concentration 300 µg/L). This final concentration would be considered environmentally realistic according to a previous review (Paul-Pont et al., 2018) on the presence and concentration of MPs in different seawater surveys. After hatching and the development of larval stages into adults (10–15 days), copepods of each replicate were harvested with a 33-µm mesh. To start the next generation, 30 ovigerous females were selected from each harvest and added into their respective beakers after 15 PSU water renewal. The remaining copepods were briefly fixed with 70% ethanol and abundantly rinsed with sterilized MilliQ water.

DNA extraction, 16S rDNA library preparation, sequencing, and sequence processing

A total of 50 adult individuals (including males, females, and ovigerous females) were collected randomly and stored in a 1.5-mL microtube at –20°C until microbiota DNA extraction. At the end of each generation, after copepods were harvested, water samples of

each beaker were filtered through 0.22 μm Sterivex filter units (Millipore, Burlington, MA, USA), and filters were stored at -20°C . In addition, the microalgae cultures for copepod feeding were also sampled during the multigenerational exposure (200 μL per filter, one time per generation from generations one to four) using Sterivex filters and then stored at -20°C . Before DNA extraction, copepods were first crushed and homogenized using sterile single-use micropestles. For water and microalgae samples, filters were cut out of Sterivex units and placed into 1.5 mL microtubes. For all samples, total DNA was extracted using the QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The 16S amplicon library was prepared by amplification of the V3–V4 region of the bacterial 16S ribosomal RNA gene using primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for polymerase chain reaction (PCR) following the manufacturer's instructions. PCR products were examined on 1% agarose gel electrophoresis, and the purification protocol was achieved with the Nucleospin[®] Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany). The quantification of extracted DNA was performed using the QubitTM dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Second PCR and sequencing were achieved by Eurofins Genomics (Germany GmbH). Finally, sequence processing was completed following methods used in a previous publication of the group (Li L.-L. et al., 2020). Briefly, rDNA sequences were analyzed following the standard procedure (https://mothur.org/wiki/miseq_sop/) (Schloss et al., 2011) of the MOTHUR program v1.47.0 (Kozich et al., 2013). First, sequences were extracted and sorted based on their index tag, and then processed for quality filtering (e.g., discarding suspected chimeras, single singletons, and erroneous sequences). The remaining high-quality reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at a 97% similarity threshold (Behnke et al., 2011). After normalization of the dataset, OTUs were searched against the SILVA database (release 138, <http://www.arb-silva.de/>) (Quast et al., 2012) using BLASTN (Altschul et al., 1990) for taxonomic affiliation. Sequencing data have been submitted to the NCBI sequence read archive database (SRA accession: PRJNA980077).

Statistical analyses and graphical representations

Dissimilarity indices of microbial assemblages were computed using the Bray–Curtis method as a dissimilarity index with square root OTU read abundance normalization using R studio with the “vegan” package (Dixon, 2003). Hierarchical cluster analysis was performed with the Ward method using the “Cluster” package (Maechler et al., 2013). Results were then plotted in a dendrogram using “factoextra” (Kassambara and Mundt, 2017) and “RcolorBrewer” (Neuwirth and Neuwirth, 2011) packages. Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) and permutational analysis of variance (PERMANOVA-Adonis) were performed using

the vegan package (Dixon, 2003). *Post-hoc* Adonis tests were achieved using the “pairwiseAdonis” package (Teng et al., 2018). Alpha-diversity estimators (diversity—Simpson and Shannon; richness—Chao 1; and dominance—Equitability) were calculated using the Past 4.03 software (Hammer et al., 2001) for each replicate of each treatment. Values were averaged for each treatment and distribution represented in boxplots using the “ggplot2” package. Possible significant differences in alpha-diversity estimators between conditions of each generation were evaluated with one-way ANOVA or Kruskal–Wallis one-way analysis of variance, depending on results of normality and homoscedasticity of variances with R software. A *p*-value under 0.05 was considered statistically significant.

Results

16S rRNA sequences analysis

Before quality filtering and normalization across samples, a total of 4,053,284 reads were obtained. After normalization and exclusion of singletons, a total of 264178 high-quality reads ($10,567 \pm 3,938$ reads per sample) corresponding to 7,540 OTUs were identified for the microbiota of copepods during the multigeneration exposition. In water samples collected at the end of each generation, 2,532 OTUs (710 ± 171 OTUs per sample) were found, while only 395 OTUs (176 ± 34 OTUs per sample) were detected in the copepod feeding media composed of microalgae *Rhodomonas* sp. Across the five generations, the microbiota of copepods in the control condition was composed of 994 ± 203 OTUs (Figure 1). Respectively, the microbiota of copepods shared 113 ± 32 OTUs with the microbiota of water samples (representing 6.7% of copepod microbiota) and 47 ± 21 OTUs with the microbiota of microalgae feedings (2.85%) (Figure 1). Throughout the five generations, the lists of OTUs shared among the three matrices stay similar.

Effects of microplastics on copepod microbiota alpha-diversity

The alpha-diversity estimator showed no significant differences in bacterial communities among treatments across the five generations for Simpson, Shannon, and Equitability indices (Figure 2). Two significant differences ($p = 0.037$) for Chao 1 indices were detected during generation two (G2) between control (T) and weathered PBAT (PBATw) ($p = 0.05$) and between virgin LDPE (PE) and weathered PBAT (PBATw) ($p = 0.05$).

Bacterial assemblage composition along copepod generations

Taxonomic classification of the 16S rRNA amplicon sequences identified 55 orders of bacteria in the copepod microbiota during the five generations of the experiment. Rhodobacterales, Pseudomonadales,

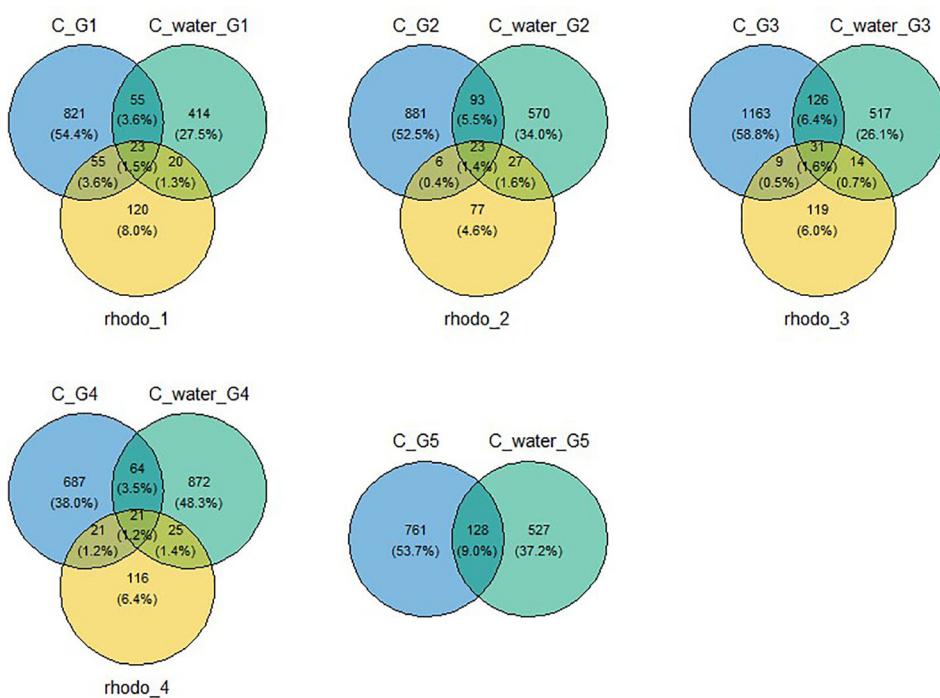


FIGURE 1 Venn diagram of OTUs shared among the microbiota of copepods in control, water, and algae used to feed copepods during the five-generation experiment. Algae was not sampled during the last generation. C, control; C_water, water used to start generation; rhodo, *Rhodomonas* sp. Algae used to feed copepods; G1, generation one; G2, generation two; G3, generation three; G4, generation four; G5, generation five (deputation).

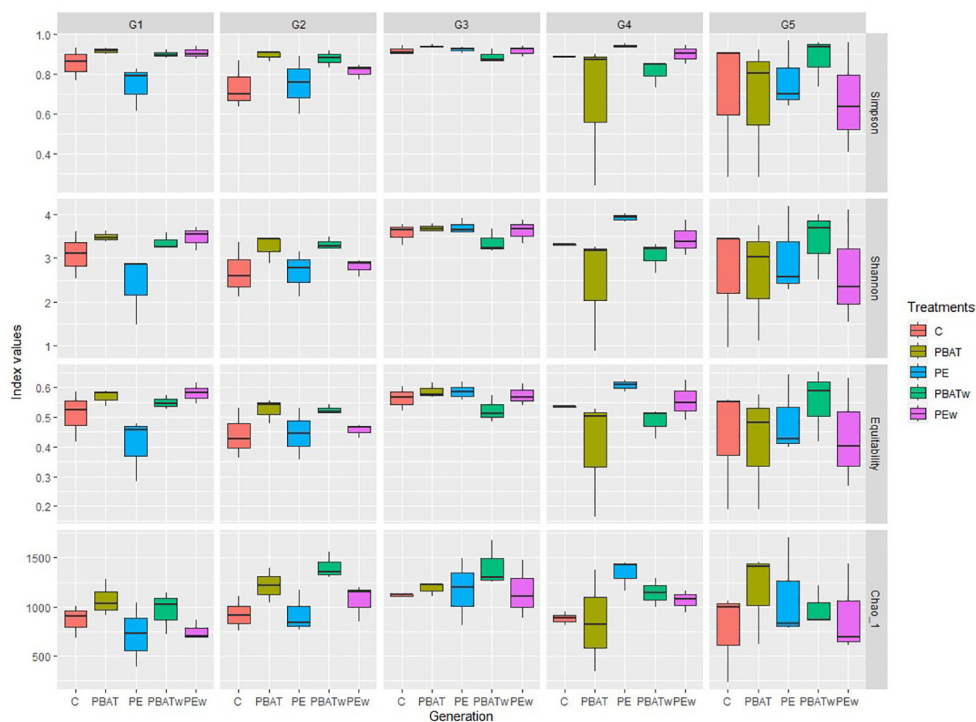


FIGURE 2 Indices for alpha-diversity of taxa. Boxplots show mean and standard deviation values of the diversity (Simpson and Shannon), richness (Chao 1), and dominance (Equitability) estimators for copepod microbiota among treatments and along the four MP exposure generations (G1–G4) and deputation generation (G5). Each box corresponds to a treatment with control (C), virgin MPs of PBAT (PBAT), virgin MPs of LDPE (PE), weathered MPs of PBAT (PBATw), and weathered MPs of LDPE (PEw).

Enterobacterales, and Rhizobiales were the top four most abundant orders present in all conditions during all experiments and represented respectively 29.6%, 15%, 11.1%, and 8%. Flavobacteriales were abundant during the first generation for all treatments but decreased in the control” and “PE” treatments during the second generation. They also decreased in the third generation in the “PBAT” and “PBATv” treatments but stayed abundant in the “PEv” treatment (Figure 3). During generations four and five, the abundance of this order was low in all samples except for the PBAT treatment in generation four, which had an increase. In the class of Bacilli, results showed an increase in thermoactinomycetales during the second and third generations and then a decrease during the two last generations. Bacillales were also relatively abundant during the third generation (Figure 3).

In the cultured water that was used to start each generation of copepods, bacterial communities showed differences at the order level during the five generations. Pseudomonadales, Flavobacteriales, Rhodobacterales, and Burkholderiales were the main order present in the first generation. During the second generation, the abundance of the abovementioned orders globally decreased and the abundance of Enterobacterales highly increased. During the third generation, Enterobacterales decreased while Pseudomonadales, Milano-WF1B-44, and Rhodobacterales increased. Some orders such as

Verrucomicrobiales, Cytophagales, and Balneolales appeared at higher abundance (Supplementary Material 1) compared to the first two generations. During generations four and five, mainly Kordiimonadales and Milano-WF1B-44 increased and were the two most abundant orders in generation five. On the other hand, Balneolales and Rhodobacterales decreased. Bacterial communities present in the copepod feeding media (*Rhodomonas* sp.) were relatively stable, and mainly composed of orders of Pseudomonadales, Rhodobacterales, Flavobacteriales, and Chitinophagales (Supplementary Material 1).

Results of the hierarchical cluster analysis (based on the Bray–Curtis distances) have shown that copepod microbiota were generally clustered according to their generations (Figure 4). On the dendrogram, treatments of all five generations could be divided into three groups: generations one and two, generations three and four, and depuration generation five (Figure 4). The bacterial communities of the two first generations had a closer Bray–Curtis distance with the depuration generation (generation five) compared to generations three and four with generation five (Figure 4). Within treatments of the same MP types (PBAT or LDPE), virgin and weathered samples generally had closer Bray–Curtis distances for the same generation (Figure 4). In addition, we noticed that the virgin PBAT-treated copepods in the depuration generation were

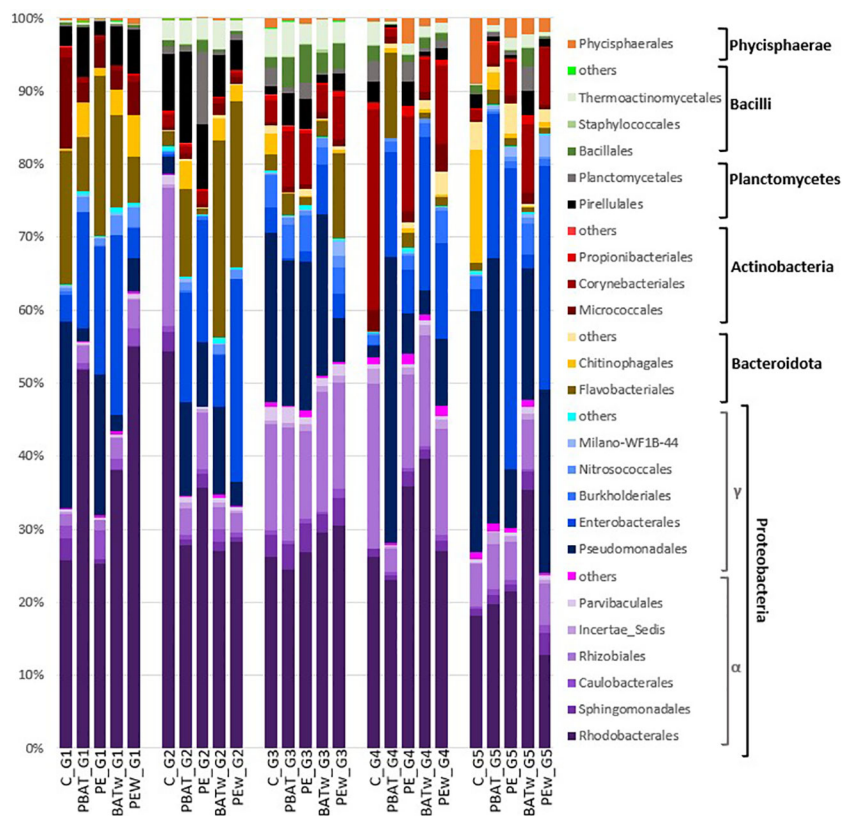


FIGURE 3 Microbial community composition of copepod microbiota at the order level. Taxa were grouped by class and then by phylum. Proteobacteria was presented in shades of purple for Alphaproteobacteria class and in shades of blue for Gammaproteobacteria; Bacteroidota in shades of brown; Actinobacteria in shades of red; Planctomycetes in black and grey; Bacilli in shades of green; and Phycisphaerae in orange. Only classes for which abundance was superior to 1% of total OTU reads were represented (total recovery of 97.6%). C, control; PBAT, virgin PBAT; PE, virgin LDPE; PBATw, weathered PBAT; PEw, weathered LDPE; G1, generation one; G2, generation two; G3, generation three; G4, generation four; G5, generation five (depuration).

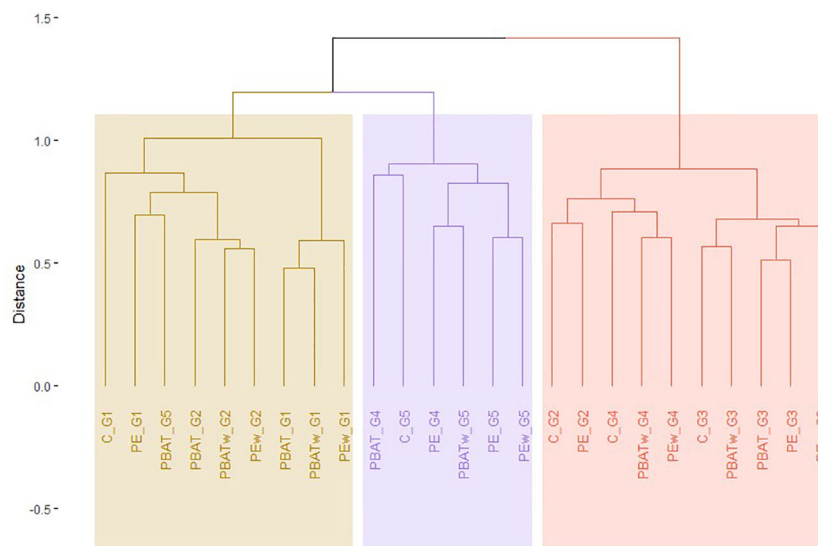


FIGURE 4 Hierarchical clustering of different treatments along the five generations of experiment (1–4, contaminated generations; 5, depuration generation) of copepod microbiota based on the Bray–Curtis dissimilarities calculated on square root transformed number of OTU reads. The colored rectangles indicate arbitrary cluster separation. T, control; PBAT, virgin PBAT; PE, virgin LDPE; PBATv, weathered PBAT; PEw, weathered LDPE; G1, generation one; G2, generation two; G3, generation three; G4, generation four; G5, generation five (depuration).

placed in the first group with most of the generation one and two samples.

In order to better understand the dispersion of different groups based on bacterial communities, an nMDS plot was carried out to analyze microbiota data from copepods, water used for copepods, and microalgae used as food (Figure 5). Three groups appeared on

this plot: the first group includes water samples used to start each generation (orange circle); the second group includes the four *Rhodomonas* sp. samples for feeding (black circle), and the third group includes samples corresponding to copepod microbiota with slight differences according to generations (Figure 5). These results agreed with the Venn diagram result (Figure 1) and suggested

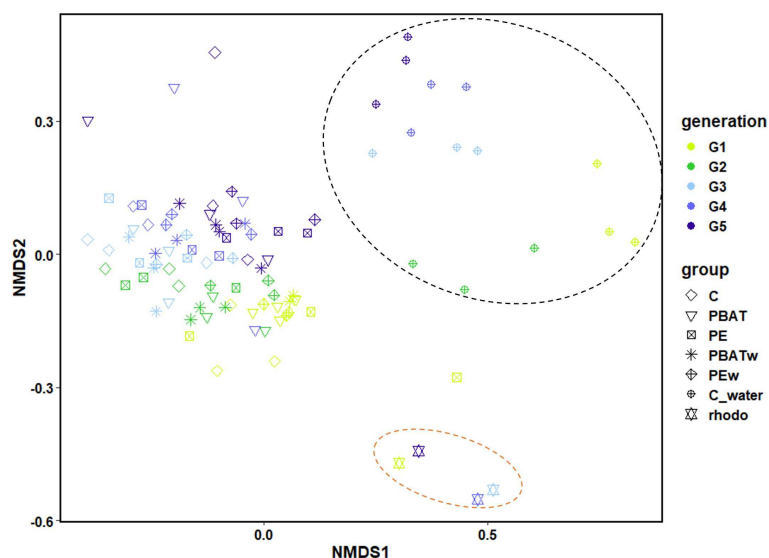


FIGURE 5 Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) on the copepod microbiota communities, water used for the experiment for each generation of copepods, and algae used for feeding copepods. The analysis was performed during the four-generation MP exposure and the last (fifth) generation of depuration. The colors of the symbols correspond to the different generations of copepods, and the shapes of the symbols correspond to the different treatments. Colored circles were arbitrarily placed to represent the different groups: the black circle represents samples of water used to start treatments of the different generations, and the orange circle is the group of *Rhodomonas* sp. samples. G1, generation one; G2, generation two; G3, generation three; G4, generation four; G5, generation five (depuration); C_water, control of water without copepods; C, control with copepods; PBAT, contaminated with virgin PBAT MPs; PE, contaminated with virgin LDPE MPs; PBATw, contaminated with weathered PBAT MPs; LDPEw, contaminated with weathered LDPE MPs.

copepods carrying their specific microbiota, as copepod microbiota only shared a mean value of 6.7% and 2.9% OTUs with the water samples and the *Rhodomonas* sp. Feeds, respectively.

Effects of MPs on copepod microbiota beta-diversity

Results of nMDS analyses coupled with PERMANOVA analysis for the four generations exposed to MPs (G1–G4) revealed that generation ($p = 0.001$), type of MPs ($p < 0.01$), and effects of generation \times type of MPs ($p < 0.05$) significantly influenced copepod microbiota (Table 1). In order to further investigate how factors significantly influence the bacterial communities of the different treatments, a *post-hoc* test (pairwise ADONIS) was performed. Side-by-side comparison between “control” and PBAT showed that generation ($p = 0.0001$), type of MPs ($p < 0.002$), and effects of generation \times type of MP ($p < 0.001$) significantly affected copepod microbiota (Table 2). Regarding control and “LDPE,” only generation ($p = 0.0001$) and the type of MPs ($p < 0.05$) had a statistically significant impact on copepod microbiota (Table 2). Between LDPE and PBAT, only generation ($p = 0.0001$) had a significant influence on copepod microbiota. PERMANOVA was also performed on data of the depuration generation (G5), and no significant differences were found among treatments (Table 3).

For each generation, sequence read count differences between the control and the different treatments were analyzed using a nonparametric Wilcoxon test. In total, 34 OTUs have shown significant differences in abundance (increase/decrease) after being exposed to MPs as compared with controls (Supplementary Material 2). At the class level, OTUs came from Alphaproteobacteria (47.1%), Gammaproteobacteria (23.5%), Actinobacteria (14.7%), Bacteroidota (8.8%), and Planctomycetes (5.9%). Alphaproteobacteria was composed of Rhodobacterales (10 OTUs), Rhizobiales (five OTUs), and Caulobacterales (one OTU). Gammaproteobacteria by Enterobacterales (five OTUs) and Legionellales, Nitrosococcales, and Pseudomonadales has one OTU for each order. Actinobacteria was composed of

Micrococcales (three OTUs) and Corynebacteriales (two OTUs). Bacteroidota was composed of Flavobacteriales (two OTUs) and Cytophagales (one OTU). Pirellulales (two OTUs) was the only family found for Planctomycetes. Respectively, 12, 11, 8, 0, and 4 OTUs changed in abundance during generations one, two, three, and four, and depuration generation has more than 82% of OTUs for which abundance increased in MP treatment compared to control one (Supplementary Material 2). Only one OTU (OTU 941, “Microbacterium”) had a significant read number difference for the two treatments (weathered PBAT and weathered LDPE) in generation one. Notably, OTUs affected by MP treatments, as detected by the Wilcoxon test, were mostly present in low read counts (≤ 3). Treatment with weathered PBAT in generation one was shown to have the highest effect at the OTU level, with eight OTUs that differed in read counts (seven OTUs increased and one decreased) after MP exposure. Overall, weathered MPs (i.e., weathered PBAT and LDPE) treatment seems to have the highest effect on OTU read abundance compared to control. Finally, the Wilcoxon test identified one OTU (OTU 2602 – *Labrenzia alba*) that was present in the control condition but absent in virgin PBAT and weathered LDPE treatments.

Discussions

The impact of MPs on copepods has been previously documented from the molecular scale (Heindler et al., 2017; Choi et al., 2020) to life trait alterations (Cole et al., 2015; Cole et al., 2016). However, to our knowledge, potential impacts of MPs on copepod microbiota have not been reported. Copepods represent a high proportion of zooplankton carbon biomass and are keystone between primary producers and secondary consumers in marine food webs (Turner, 2004). In addition, evidence has shown that microbiota plays an essential role in maintaining animal health (Zhang et al., 2010) and supporting the immune system (Nicholson et al., 2012). Furthermore, MPs offer support and protection for microorganisms in the “plastisphere” (Muthukumar et al., 2011), including potential pathogenic species such as *Vibrio* sp. (Zettler et al., 2013). Therefore, it is essential to

TABLE 1 PERMANOVA (ADONIS) results for copepod microbiota (OTUs) communities' structures during the four generations exposed to MPs (G1–G4), calculated on the Bray–Curtis distance (significant effects of factors ($p < 0.05$) are indicated with asterisks).

Main effects	Degrees of freedom	Sum of squares	F-statistic	R ²	p-value
Type of MPs	2	0.6969	2.1470	0.04936	0.0082*
Aging	1	0.2384	1.4690	0.01689	0.1333
Generation	3	3.9347	8.0809	0.27867	0.0001***
Types of MPs \times Generation	6	1.4465	1.4853	0.10244	0.0221*
Types of MPs \times Aging	1	0.2022	1.2459	0.01432	0.2236
Generation \times Aging	3	0.7050	1.4478	0.04993	0.0679
Types of MPs \times Generation \times Aging	3	0.5661	1.1626	0.04009	0.2415
Residuals	39	6.3299	0.44830		
Total	58	14.1196	1.00000		

*p-value < 0.05; **p-value < 0.01; ***p-value < 0.001—statistical significance. Permutations n = 9,999.

TABLE 2 Statistical analyses of pairwise ADONIS differences in copepod microbiota profiles between treatments during the four generations exposed to MPs (G1–G4), calculated on the Bray–Curtis dissimilarity measures (significant effects of factors ($p < 0.05$) are indicated with asterisks).

Treatments	Main effects	ADONIS test			
		Sum of squares	F	R ²	p-value
Control vs. PBAT	Type of MPs	0.5358	3.7725	0.06543	0.0011**
	Generation	2.5987	6.0992	0.31735	0.0001***
	Aging of MPs	0.2051	1.4445	0.02505	0.1425
	Type of MPs × generation	1.0215	2.3975	0.12475	0.0009***
	Generation × Aging	0.561	1.3166	0.06851	0.1341
Control vs. PE	Type of MPs	0.3498	1.8754	0.04054	0.0482*
	Generation	2.4986	4.4658	0.28963	0.0001***
	Aging of MPs	0.2461	1.3198	0.02853	0.1941
	Type of MPs × Generation	0.5946	1.0628	0.06893	0.3597
	Generation × Aging	0.6482	1.1586	0.07514	0.2522
PBAT vs. PE	Type of MPs	0.2109	1.2895	0.01896	0.1996
	Generation	3.4437	7.0175	0.30951	0.0001***
	Aging of MPs	0.2389	1.4604	0.02147	0.1318
	Type of MPs × Generation	0.5768	1.1753	0.05184	0.2334
	Type of MPs × Aging	0.2124	1.2984	0.01909	0.2006
	Generation × Aging	0.7089	1.4445	0.06371	0.076
	Type of MPs × Generation × Aging	0.5003	1.0196	0.04497	0.412

*p-value < 0.05; **p-value < 0.01; ***p-value < 0.001—statistical significance. Permutations n = 9,999.

investigate the impacts of MP exposure on copepods in all aspects, including copepod microbiota.

Previous studies have shown that MP exposure affected planarian microbiota richness with a significant increase in Simpson and Shannon indexes (Han et al., 2022) and marine medaka microbiota with a decrease in Shannon and Chao 1 index (Zhang et al., 2023). In our study, however, effects in *E. affinis* microbiota after MP exposure seem to be more subtle, with only a significant difference in the Chao 1 index between the control and the treatment of weathered PBAT during the second generation observed. Possible explanations could come from the fact that studies by Han et al. (2022) and Zhang et al. (2023) focused specifically on gut microbiota, which is considered more sensitive to pollutants as compared with external microbiota (Fackelmann and Sommer, 2019). Indeed, in our study, due to the small size of *E. affinis* and the lack of protocols for gut isolation, total DNA was extracted from each sample. Therefore, microbiota could come from both the internal (gut) and external (exoskeleton) parts of

copepods, including MPs that were ingested by copepods and adhered to the external part of copepods. This hypothesis is supported by a previous study confirming the ingestion of *E. affinis* for MP of the same size range (They et al., 2022). In addition, the environmentally realistic concentration of MPs used in this study might well contribute to the observation of subtle changes. Indeed, contrasting with other studies exposing their model organisms to high MP concentrations, the environmentally realistic concentration of MPs used to expose copepods was not enough to affect their microbiota alpha-diversity estimators. Similar results were reported on the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to comparable concentrations of MPs (200 µg/L), leading to no significant differences in the alpha-diversity estimator of their gut microbial diversity (Li L.-L. et al., 2020). Similar to the previous report for the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to an environmentally realistic concentration of MPs, no significant differences were observed in the alpha-diversity estimator of gut microbial diversity (Li L.-L. et al., 2020).

TABLE 3 PERMANOVA (ADONIS) results for copepod microbiota (OTUs) communities' structures during the generation of depuration (G5), based on the Bray–Curtis distance (significant effects of factors ($p < 0.05$) are indicated with asterisks).

	Degrees of freedom	Sum of squares	F-statistic	R ²	p-value
Treatment	2	0.7231	1.3572	0.17273	0.1207
Residuals	13	3.4633		0.82727	
Total	15	4.1864		1.0000	

*p-value < 0.05; **p-value < 0.01; ***p-value < 0.001—statistical significance. Permutations n = 9,999.

Results of microbial community structure analyses at the OTU level suggested that copepods carried their own specific microbiota that was different from cultured water and *Rhodomonas* algal food supplies. However, we noticed that the community structure was shifting throughout the experiment at each copepod generation. This observation could be due to the input of “new” bacterial communities at the beginning of each generation by changing water. Indeed, our results showed water community structure evolved during the five generations with high increases/decreases in the main orders of bacteria. Moreover, even if community structures were quite stable during the experiment, few changes at the order level were observed. Regarding our experimental design, the generation factor is clearly represented by the water used for each generation and the algae media. This hypothesis is a trivial explanation of why generation was the most significant factor in the copepod microbiota community, as shown by PERMANOVA and pairwise couple comparison with the *post-hoc* test.

According to the results of PERMANOVA, the other factor that significantly influences copepod microbiota is exposure to MPs. This finding agreed with a previous report by Li L.-L. et al., 2020 that also identified “MP exposure” as a significant factor influencing the gut microbiota of blue mussels using PERMANOVA analysis. Our results also agreed with existing studies on mice, zebrafish, and planarians that suggested MP exposure could induce significant impacts on gut microbiota (Lu et al., 2018; Qiao et al., 2019; Han et al., 2022). In our study, results of *post-hoc* analysis suggested that the effects of MPs on copepod microbiota compared to a control were independent of MP types (PBAT or LDPE), as a pairwise comparison between these two treatments showed a nonsignificant difference. Interestingly, the difference between the control and the PBAT-exposed samples was greater than the difference between the control and the LDPE-exposed samples, as the *p*-value of “control vs. PBAT” was approximately 10 times lower. As a result, the interaction between the factor “generation” and PBAT was also identified to have a significant effect on microbial community structure.

To investigate possible reasons for the greater effect on copepod microbiota of PBAT exposure than of LDPE exposure, we analyzed the biofilm communities attached to PBAT and LDPE. The preliminary (observational) results suggested no differences in bacterial communities between the two MP types that were weathered up to one hundred twenty days (data not shown). A similar observation was reported by Delacuvellerie et al. (2021) that showed no differences in bacterial communities between PBAT and LDPE after 82 days of immersion in the Mediterranean Sea. This result may be further explored and the untreated data can provide future perspectives of this study. Possible reasons for observing a greater effect of PBAT exposure might involve the interaction between copepods and PBAT. For example, as biodegradable plastics, we cannot rule out the possibility that PBAT MPs could be degraded (even partially) by the digestive enzymes of copepods after ingestion. Products of digested/degraded PBAT may further influence the gut microbiota of copepods. Altogether, we can suggest that both PBAT and LDPE MPs could potentially impact copepod microbiota in a natural environment with possible effects on life traits, even though PBAT is generally considered as more “eco-friendly.” On the opposite, a recent study on marine medaka

(*Oryzias melastigma*) suggested that polylactic acid (PLA), a compostable polymer, was less hazardous compared to “classic” plastics (i.e., polyethylene terephthalate and polystyrene) regarding effects on alpha-diversity indexes (Shannon and Chao 1) and complexity of networks of gut microbiota (Zhang et al., 2023).

According to the results of PERMANOVA, no significant difference was observed in the microbiota structures of copepods between virgin and weathered MP exposure. This is surprising since the result of diversity analysis suggested a significant difference between the bacterial community on virgin MPs compared to 45 days weathered MPs (data not shown). This result is in contrast with a previous report by Li L.-L. et al., 2020 that showed significantly greater impacts by weathered MPs on blue mussel gut microbiota than by virgin MPs. A possible explanation for such a difference in observation could be in the experimental design. For Li L.-L. et al., 2020, culture tanks for mussels were cleaned every other day, refilled with fresh seawater, and supplied with fresh virgin or weathered MPs. For copepod cultures in this study, water and MPs were refreshed at the beginning of each generation. Therefore, during each generation (10–15 days), virgin MPs could have biofilms develop and become weathered MPs. Finally, the PERMANOVA result of the depurated generation suggested no statistical differences between the control and previously MP-exposed samples. This result implied a relatively quick recovery of copepod microbiota even after several generations of exposure to MPs.

According to our results of taxonomy analysis, abundant bacterial phyla found in copepod microbiota (Proteobacteria, Bacteroidota, and Actinobacteria) were similar to those found in other copepods living in natural environments of the North Sea and the Atlantic Ocean (Brandt et al., 2010; Cregeen, 2016). Considering this taxonomic level, we were not able to find differences between exposed and control copepod microbiota. At a higher taxonomic resolution, the results of the Wilcoxon test suggested 34 OTUs were significantly ($p < 0.05$) impacted by MP exposure. Generally, the number of impacted OTUs seemed to be slowly decreasing from the first to the third generation and was close to zero for the two last generations. Among these 34 OTUs, OTU 941 (“Microbacterium”) was identified both in weathered PBAT and weathered LDPE during the first generation. It should be noted that OTU 941, as well as all others within these 34 OTUs, were represented by low read counts (≤ 3 read counts). Similarly, we found in generation three that OTU 2602 (*Labrenzia alba*) was absent in virgin PBAT and weathered LDPE compared to control. Although this OTU was only present in low read numbers, it is possible that MP impaired the symbiotic relationship between copepods and *Labrenzia alba*, as it was shown that the genome of this species possesses symbiosis factors between microbes and marine invertebrate hosts (Couceiro et al., 2021). However, even if the Wilcoxon test revealed several significant OTUs impacted by MP exposure, since these OTUs were only supported by low read numbers, we suggest considering these findings with caution.

It is worth mentioning that two *Vibrio* species (*Vibrio splendidus* and *Vibrio tasmaniensis*) were detected in one replica of virgin PBAT-exposed copepods for the second, third, and fourth generations. Both *Vibrio* species are known mollusc pathogens: *Vibrio tasmaniensis* has been reported to correlate to mass mortality events in cultured oysters (Roux et al., 2002; Lopez-Joven et al., 2018), while *Vibrio splendidus*

was detected in cleaner fish used for removing sea lice from salmon in salmon farms (Gulla et al., 2015). Special relationships between chitinous exoskeleton zooplankton such as copepods and the *Vibrio* genus were previously described as well (Tamplin et al., 1990; Heidelberg et al., 2002; Brandt et al., 2010). Nevertheless, the two *Vibrio* species were detected in only one replica in generations two to four but were not detected in the following depurated generation or water samples used to start each generation.

Conclusion

Altogether, our results suggest that MPs impact copepod microbiota rapidly (from the first generation) and continuously (until the last exposed generation) despite plastic origin, types, and aging conditions. Thus, the biodegradable polymer PBAT might not be an ideal alternative for replacing nonbiodegradable plastics considering similar impacts on copepod microbiota (and possibly on microbiota of other organisms). It would be interesting to compare other MPs, both biodegradable and nonbiodegradable, for their impacts on the microbiota of copepod and other organisms. Our study also showed that copepod microbiota returned promptly to their original composition as soon as MP exposition stopped. This result, which needs to be confirmed by further studies on a wider range of organisms, brings some hope for the resilience of organisms and restoring the ecosystem by preventing plastics from entering the environment.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: NCBI Trace Sequence Archive NCBI under BioProject accession number PRJNA980077.

Author contributions

JT and L-LL wrote the manuscript. JT conceived and performed the experiments. L-LL and SM helped with molecular biology protocols and analysis. DD contributed to the microplastic exposure experiment. SM, L-LL, SS, SB, and J-MR helped in drafting the manuscript and

approved the current version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study is a part of the Ph.D. thesis of JT from the University of Mons and the University of Littoral Côte d'Opale, funded in equal parts by the two universities. This work has been financially supported by the French State and the French Region Hauts-de-France, in the framework of the project CPER IDEAL 2021-2029. Samira Benali acknowledge supports by the European Community (FEDER) for general support in the frame of LCFM-BIOMAT. Jean-Marie Raquez is a FRS-FNRS Research Associate.

Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2023.1231346/full#supplementary-material>

References

- Ali, W., Ali, H., Gillani, S., Zinck, P., and Souissi, S. (2023). Polylactic acid synthesis, biodegradability, conversion to microplastics and toxicity: a review. *Environ. Chem. Lett.* 21, 1761–1786. doi: 10.1007/s10311-023-01564-8
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1596–1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
- Behnke, A., Engel, M., Christen, R., Nebel, M., Klein, R. R., and Stoeck, T. (2011). Depicting more accurate pictures of protistan community complexity using pyrosequencing of hypervariable SSU rRNA gene regions: Protistan community complexity. *Environ. Microbiol.* 13, 340–349. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02332.x
- Brandt, P., Gerds, G., Boersma, M., Wiltshire, K. H., and Wichels, A. (2010). Comparison of different DNA-extraction techniques to investigate the bacterial community of marine copepods. *Helgol. Mar. Res.* 64, 331–342. doi: 10.1007/s10152-010-0188-1
- Choi, J. S., Hong, S. H., and Park, J.-W. (2020). Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Mar. Environ. Res.* 153, 104838. doi: 10.1016/j.marenvres.2019.104838
- Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., et al. (2016). Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3239–3246. doi: 10.1021/acs.est.5b05905
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., and Galloway, T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine

- copepod calanus helgolandicus. *Environ. Sci. Technol.* 49, 1130–1137. doi: 10.1021/es054525u
- Coppock, R. L., Galloway, T. S., Cole, M., Fileman, E. S., Queirós, A. M., and Lindeque, P. K. (2019). Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *Calanus helgolandicus*. *Sci. Total Environ.* 687, 780–789. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.009
- Couceiro, J. F., Keller-Costa, T., Marques, M., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Whitman, W. B., et al. (2021). The *Rosebium album* (Labrenzia alba) Genome Possesses Multiple Symbiosis Factors Possibly Underpinning Host-Microbe Relationships in the Marine Benthos. *Microbiol. Resour. Announc.* 10, e00320–e00321. doi: 10.1128/MRA.00320-21
- Cregeen, S. J. J. (2016) *Microbiota of dominant Atlantic copepods: Pleuromamma sp. as a host to a betaproteobacterial symbiont*. Available at: <https://eprints.soton.ac.uk/403351/>.
- Dang, H., Li, T., Chen, M., and Huang, G. (2008). Cross-ocean distribution of rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 52–60. doi: 10.1128/AEM.01400-07
- Das, S., Ouddane, B., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2020). Intergenerational effects of resuspended sediment and trace metal mixtures on life cycle traits of a pelagic copepod. *Environ. Pollut.* 267, 115460. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115460
- Das, S., Ouddane, B., and Souissi, S. (2022). Responses of the copepod *Eurytemora affinis* to trace metal exposure: A candidate for sentinel to marine sediment resuspension effects. *Mar. Pollut. Bull.* 181, 113854. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113854
- Dayras, P., Bialais, C., Sadovskaya, I., Lee, M.-C., Lee, J.-S., and Souissi, S. (2021). Microalgal diet influences the nutritive quality and reproductive investment of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana*. *Front. Mar. Sci.* 8. doi: 10.3389/fmars.2021.697561
- Delacuvellerie, A., Benali, S., Cyriaque, V., Moins, S., Raquez, J.-M., Gobert, S., et al. (2021). Microbial biofilm composition and polymer degradation of compostable and non-compostable plastics immersed in the marine environment. *J. Hazard. Mater.* 419, 126526. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126526
- de Steenhuijsen Piters, W. A. A., Watson, R. L., de Koff, E. M., Hasrat, R., Arp, K., Chu, M. L. J. N., et al. (2022). Early-life viral infections are associated with disadvantageous immune and microbiota profiles and recurrent respiratory infections. *Nat. Microbiol.* 7, 224–237. doi: 10.1038/s41564-021-01043-2
- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Vegetation Sci.* 14, 927–930. doi: 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x
- Fackelmann, G., and Sommer, S. (2019). Microplastics and the gut microbiome: How chronically exposed species may suffer from gut dysbiosis. *Mar. Pollut. Bull.* 143, 193–203. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.030
- Geyer, R., Jambeck, J. R., and Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.* 3, 1700782. doi: 10.1126/sciadv.1700782
- Gulla, S., Sorum, H., Vågnes, Ø., and Colquhoun, D. J. (2015). Phylogenetic analysis and serotyping of *Vibrio splendidus*-related bacteria isolated from salmon farm cleaner fish. *Dis. Aquat. Org.* 117, 121–131. doi: 10.3354/dao02938
- Hammer, Ø., Harper, D. A., and Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electronica* 4 (1), 9.
- Han, Y., Zhang, X., Liu, P., Xu, S., Chen, D., Liu, J. N., et al. (2022). Microplastics exposure causes oxidative stress and microbiota dysbiosis in planarian *Dugesia japonica*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 28973–28983. doi: 10.1007/s11356-022-18547-x
- Heidelberg, J. F., Heidelberg, K. B., and Colwell, R. R. (2002). Bacteria of the γ -subclass proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5498–5507. doi: 10.1128/AEM.68.11.5498-5507.2002
- Heindler, F. M., Alajmi, F., Huerlimann, R., Zeng, C., Newman, S. J., Vamvounis, G., et al. (2017). Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di(2-ethylhexyl)phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 141, 298–305. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.03.029
- Huq, A., Sack, R. B., Nizam, A., Longini, I. M., Nair, G. B., Ali, A., et al. (2005). Critical factors influencing the occurrence of vibrio cholerae in the environment of Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4645–4654. doi: 10.1128/AEM.71.8.4645-4654.2005
- Iyare, U. P., K., Ouki, S., and Bond, T. (2020). Microplastics removal in wastewater treatment plants: a critical review. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 6, 2664–2675. doi: 10.1039/D0EW00397B
- Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujon-Pay, M., et al. (2019). Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: A review on colonization and biodegradation by the “Plastisphere”. *Front. Microbiol.* 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00865
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Kim, D.-H., Han, J., Hwang, D.-S., et al. (2017). Adverse effects of microplastics and oxidative stress-induced MAPK/Nrf2 pathway-mediated defense mechanisms in the marine copepod *Paracyclops nana*. *Sci. Rep.* 7, 41323. doi: 10.1038/srep41323
- Kassambara, A., and Mundt, F. (2017). Package ‘factoextra’. *Extract visualize results multivariate Data analyses* 76 (2), 26–27.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., and Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13
- Kwok, K. W. H., Souissi, S., Dur, G., Won, E.-J., and Lee, J.-S. (2015). “Chapter 12 - Copepods as reference species in estuarine and marine waters,” in *Aquatic Ecotoxicology*. Eds. C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard and C. Mouneyrac (London: Academic Press), 281–308. doi: 10.1016/B978-0-12-800949-9.00012-7
- Laist, D. W. (1997). “Impacts of marine debris: entanglement of marine life in marine debris including a comprehensive list of species with entanglement and ingestion records,” in *Marine Debris: Sources, Impacts, and Solutions Springer Series on Environmental Management*. Eds. J. M. Coe and D. B. Rogers (New York: NY: Springer), 99–139. doi: 10.1007/978-1-4613-8486-1_10
- Lee, K.-W., Shim, W. J., Kwon, O. Y., and Kang, J.-H. (2013). Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11278–11283. doi: 10.1021/es401932b
- Li, L.-L., Amara, R., Souissi, S., Dehaut, A., Duflos, G., and Monchy, S. (2020). Impacts of microplastics exposure on mussel (*Mytilus edulis*) gut microbiota. *Sci. Total Environ.* 745, 141018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141018
- Li, S., Wang, P., Zhang, C., Zhou, X., Yin, Z., Hu, T., et al. (2020). Influence of polystyrene microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and aggregation of freshwater microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Total Environ.* 714, 136767. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136767
- Lindeque, P. K., Cole, M., Coppock, R. L., Lewis, C. N., Miller, R. Z., Watts, A. J. R., et al. (2020). Are we underestimating microplastic abundance in the marine environment? A comparison of microplastic capture with nets of different mesh-size. *Environ. Pollut.* 265, 114721. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114721
- Lobelle, D., and Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 197–200. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.10.013
- Lopez-Joven, C., Rolland, J.-L., Haffner, P., Caro, A., Roques, C., Carré, C., et al. (2018). Oyster farming, temperature, and plankton influence the dynamics of pathogenic vibrios in the Thau Lagoon. *Front. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02530
- Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., and Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci. Total Environ.* 631–632, 449–458. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.051
- Lusher, A. (2015). Microplastics in the marine environment: distribution, interactions and effects. *Mar. Anthropogenic Litter*, 245–307. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_10
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Hornik, K., Studer, M., et al. (2013). Package ‘cluster’ (Dosegljivo na).
- Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A. A., and Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 259–270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14
- Michalec, F.-G., Holzner, M., Barras, A., Lacoste, A.-S., Brunet, L., Lee, J.-S., et al. (2017). Short-term exposure to gold nanoparticle suspension impairs swimming behavior in a widespread calanoid copepod. *Environ. Pollut.* 228, 102–110. doi: 10.1016/j.envpol.2017.04.084
- Muthukumar, T., Aravinthan, A., Lakshmi, K., Venkatesan, R., Vedaprakash, L., and Doble, M. (2011). Fouling and stability of polymers and composites in marine environment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 276–284. doi: 10.1016/j.ibiod.2010.11.012
- Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., and Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Mar. Pollut. Bull.* 99, 178–185. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.029
- Napper, I. E., and Thompson, R. C. (2016). Release of synthetic microplastic plastic fibres from domestic washing machines: Effects of fabric type and washing conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 112, 39–45. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.025
- Neuwirth, E., and Neuwirth, M. E. (2011). Package ‘RColorBrewer’. *Phys. Rev. D—Part. Fields Gravit. Cosmol.* 84, 1–5.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813
- Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., Labrenz, M., Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., and Labrenz, M. (2015). Marine microplastic-associated biofilms – a review. *Environ. Chem.* 12, 551–562. doi: 10.1071/EN15069
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., et al. (2018). Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Front. Mar. Sci.* 5. doi: 10.3389/fmars.2018.00252
- Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C. Q., Yu, H., and Ge, C. (2020). Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Sci. Total Environ.* 698, 134254. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134254
- Plastics, the facts (2021). *European Plastics*. (Brussels: Plastics Europe).
- Qiao, R., Deng, Y., Zhang, S., Wolosker, M. B., Zhu, Q., Ren, H., et al. (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere* 236, 124334. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.065
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., and Fossi, M. C. (2015). First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the

- Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 95, 358–361. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.048
- Roux, F. L., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., et al. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15, 251–258. doi: 10.1016/S0990-7440(02)01176-2
- Schloss, P. D., Gevers, D., and Westcott, S. L. (2011). Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One* 6, e27310. doi: 10.1371/journal.pone.0027310
- Sheavly, S. B., and Register, K. M. (2007). Marine debris & Plastics: environmental concerns, sources, impacts and solutions. *J. Polym. Environ.* 15, 301–305. doi: 10.1007/s10924-007-0074-3
- Souissi, A., Hwang, J.-S., and Souissi, S. (2021). Reproductive trade-offs of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* under different thermal and haline regimes. *Sci. Rep.* 11, 20139. doi: 10.1038/s41598-021-99703-0
- Souissi, A., Souissi, S., Devreker, D., and Hwang, J.-S. (2010). Occurrence of intersexuality in a laboratory culture of the copepod *Eurytemora affinis* from the Seine estuary (France). *Mar. Biol.* 157, 851–861. doi: 10.1007/s00227-009-1368-x
- Souissi, A., Souissi, S., and Hwang, J.-S. (2016). Evaluation of the copepod *Eurytemora affinis* life history response to temperature and salinity increases. *Zool. Stud.* 55, e4. doi: 10.6620/ZS.2016.55-04
- Tamplin, M. L., Gauzens, A. L., Huq, A., Sack, D. A., and Colwell, R. R. (1990). Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1977–1980. doi: 10.1128/aem.56.6.1977-1980.1990
- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M., and Watanuki, Y. (2013). Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. *Mar. Pollut. Bull.* 69, 219–222. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.12.010
- Teng, F., Darveekaran Nair, S. S., Zhu, P., Li, S., Huang, S., Li, X., et al. (2018). Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. *Sci. Rep.* 8, 16321. doi: 10.1038/s41598-018-34294-x
- Thery, J., Bialais, C., Kazour, M., Moreau, M., Dufour, D., Benali, S., et al. (2022). A new method for microplastics identification in copepods. *Front. Environ. Chem.* 3. doi: 10.3389/fevc.2022.905303
- Turner, J. T. (2004). The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zool. Stud.* 43 (2), 255–266.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., and Köhler, A. (2012). Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11327–11335. doi: 10.1021/es302332w
- Wright, S. L., Thompson, R. C., and Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. pollut.* 178, 483–492. doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.031
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. doi: 10.1021/es401288x
- Zhang, C., Jeong, C.-B., Lee, J.-S., Wang, D., and Wang, M. (2019). Transgenerational proteome plasticity in resilience of a marine copepod in response to environmentally relevant concentrations of microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 53, 8426–8436. doi: 10.1021/acs.est.9b02525
- Zhang, C., Li, F., Liu, X., Xie, L., Zhang, Y. T., and Mu, J. (2023). Polylactic acid (PLA), polyethylene terephthalate (PET), and polystyrene (PS) microplastics differently affect the gut microbiota of marine medaka (*Oryzias melastigma*) after individual and combined exposure with sulfamethazine. *Aquat. Toxicol.* 259, 106522. doi: 10.1016/j.aquatox.2023.106522
- Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., et al. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* 4, 232–241. doi: 10.1038/ismej.2009.112
- Zhu, B.-K., Fang, Y.-M., Zhu, D., Christie, P., Ke, X., and Zhu, Y.-G. (2018). Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Environ. Pollut.* 239, 408–415. doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.017