



THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES Comue Universite Bretagne Loire

ECOLE DOCTORALE N°598 Sciences de la Mer et du littoral Spécialité : *Ecotoxicologie*

Par Ngoc Nam PHUONG

Développements analytiques pour la caractérisation et la quantification de la contamination en microplastiques des matrices sédimentaires et biologiques : application aux zones conchylicoles des Pays de la Loire

Thèse présentée et soutenue à UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, le 06 juillet 2018 Unité de recherche : EA 2160 MMS – Mer, Molécules, Santé

Rapporteurs avant soutenance :

Jérôme CACHOT, Professeur, Université de Bordeaux Pierre DOUMENQ, Professeur, Aix-Marseille Université

Composition du Jury :

Jérôme CACHOT, Professeur, Université de Bordeaux Pierre DOUMENQ, Professeur, Aix-Marseille Université Fabienne LAGARDE-ABRIBAT, Maître de conférences, Université du Mans Christine HERRENKNECHT, Professeur, Université de Nantes, Directeur de thèse Laurence POIRIER, Maître de conférences, Université de

Nantes, co-encadrante de thèse Aurore ZALOUK-VERGNOUX, Maître de conférences,

Université de Nantes, co-encadrante de thèse

Invitée

Catherine MOUNEYRAC, Professeur, Université Catholique de l'Ouest

Table des matières

Valorisations scientifiquesI
RemerciementsIII
Liste des figures (hors publications)VII
Liste des tableaux (hors publications)IX
AbréviationsXI
L1 Les platieurs 11
I. I Les plastiques
I.I.I Definition
1.1.2 Classements des plastiques
1.1.2.1 Classement selon la composition chimique
1.1.2.2 Classement selon les propriétés physiques14
I.1.3 Evolution de la production des plastiques15
I.1.4 Les additifs dans les plastiques16
I.1.5 La consommation des matériaux plastiques à l'échelle européenne19
I.1.6 Recyclage et valorisation des déchets plastiques au niveau européen23
I.1.7 Pollution des écosystèmes marins par les déchets plastiques24
I.2 Les microplastiques
I.2.1 Définition
I.2.2 Source des microplastiques dans l'environnement
I.2.3 Devenir des microplastiques dans l'environnement
I.2.4 Procédure d'analyse des microplastiques dans les compartiments environnementaux
I.2.4.1 Echantillonnage
I.2.4.1 Préparation des échantillons
I.2.4.3 Caractérisation des microplastiques
I.2.4.4 Assurance qualité et contrôle qualité41
I.2.5 Contamination en microplastiques dans le milieu marin : Article nº1 : Is there

I.2.5.1 Actualisation des données de microplastiques dans les eaux marines56
I.2.5.2 Actualisation des données concernant les microplastiques dans les sables et sédiments
I.2.5.3 Actualisation des données concernant les microplastiques retrouvés dans les organismes marins
I.2.6 Microplastiques et contaminants organiques
I.2.6.1 Etudes du milieu naturel
I.2.6.2 Etudes en laboratoire
I.3 Bilan et objectifs de la thèse74

II.1 Développement d'un protocole de quantification et de caractérisation des microplastiques dans la moule bleue
II.1.1 Justification des choix lors du développement de la méthode d'analyse78
II.1.1.1 Choix des organismes
II.1.1.2 Digestion
II.1.1.3 Sédimentation
II.1.1.4 Filtration
II.1.1.5 Caractérisation des microplastiques
II.1.1.6 Contrôle qualité
II.1.2 Article n°2: Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (<i>Mytilus edulis</i>): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast
II.2 Article n ⁰ 3: Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or mode of life?
Conclusion107
Chapitre 3 : Contamination des sédiments des vasières intertidales par les microplastiques



143 149 151 152 153 154 154 154 155 156 156
149 151 152 153 154 154 154 155 156 156
149 151 152 153 154 154 154 155 156 156
151 152 153 154 154 154 155 156 156
152 153 154 154 154 155 156 156
153 154 154 154 154 155 156 156
154 154 154 154 155 156 156
154 154 154 155 156 156
154 154 155 156 156
154 155 156 156
155 156 156
156 156
156
156
156
157
158
158
159
161
161
162
166

Valorisations scientifiques relatives à ce travail doctoral

Publications dans des revues internationales

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environmental Pollution, 211, 111–123.

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, A., Poirier, L., Lagarde, F., 2018. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol set-up and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. Environmental Science and Pollution Research, 25, 6135-6144.

Phuong, N.N., Poirier, L., Pham, Q.T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? Marine pollution bulletin, 129, 664-674.

Publication scientifique soumise

Phuong, N.N., Poirier, L., Lagarde, F., Kamari, A., Zalouk-Vergnoux, A. Abundance and characteristics in Atlantic costal sediments. Soumission au journal Environmental Pollution en avril 2018.

Communications orales dans des congres internationaux

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Rouxel, J., Sussarellu, R., Akcha, F., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Comparison of tissue preparation procedures to perform microplastic analysis Application to mussels (*Mytilus edulis*) from the Atlantic coast (Pays de la Loire, France). 26th SETAC Europe Annual meeting – Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 22-26 mai 2016, Nantes, France.

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Rouxel, J., Sussarellu, R., Akcha, F., Châtel, A., Mouneyrac, C., <u>Lagarde, F.</u>, 2017. Monitoring of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the French Atlantic coast (Pays de la Loire, France). 27th SETAC Europe

Annual meeting – Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 7-11 mai 2017, Brussels, Belgique.

Phuong, N.N., <u>Zalouk-Vergnoux, A.</u>, Kamari, A., Rouxel, J., Sussarellu, R., Akcha, F., Mouneyrac, C., Poirier, L., Lagarde, F., 2017. Monitoring of microplastics in Japanese oysters (*Crassostrea gigas*) of the French Atlantic coast (Pays de la Loire, France). 11th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 14-18 mai 2017, Galway, Irlande.

Communications orales dans des congres nationaux

Phuong, N.N., <u>Zalouk-Vergnoux, A.</u>, Poirier, L., Kamari, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Quelle adéquation entre les microplastiques trouvés dans l'environnement et ceux utilisés en laboratoire. Forum ECO-TOX de Rovaltain, 11-13 Octobre 2016, Alixan, France.

Phuong, N.N., Poirier, L., Lagarde, F., <u>Zalouk-Vergnoux, A.</u>, 2016. Contamination en microplastiques des huîtres, des moules et des sédiments de la baie de l'Aiguillon. Polymères et Océans 2018, 15-17 Janvier 2018, Montpellier, France.

Communications affichées dans des congrès internationaux

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Rouxel, J., Sussarellu, R., Akcha, F., Châtel, A., <u>Mouneyrac, C.</u>, Lagarde, F., 2016. Development of analytical procedure for microplastic analysis in biological tissues: application to mussels (*Mytilus edulis*) from the Atlantic coast (Pays de la Loire, France). 37th SETAC North America Annual meeting – Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 06-10 Novembre 2016, Orlando, Florida, États-Unis.

Phuong, N.N., Poirier, L., Lagarde, F., Kamari, A., Zalouk-Vergnoux, A., <u>Déniel, M.</u>, 2018. Assessment of the microplastic contamination in sediments from the French Atlantic coast. 28th SETAC Europe Annual meeting – Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 13-17 mai 2018, Rome, Italie.

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres du jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer le travail effectué durant ces quatre années de thèse. Je vous remercie également pour le temps que vous avez consacré à la lecture du manuscrit.

Du fond de mon cœur, je voudrais remercier M. Yves-François Pouchus, Professeur à la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université de Nantes – Directeur du laboratoire Mer, Molécule, Santé (MMS) – pour m'avoir accueilli et m'avoir donné l'occasion de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier particulièrement M^{me} Catherine Mouneyrac, Professeur et doyen de la faculté des sciences de l'Université Catholique de l'Ouest – ma directrice de thèse des deux premières années – pour m'avoir accueilli dans le cadre du projet MiPlAqua et me donner l'opportunité de découvrir la thématique de recherche sur les microplastiques. Je remercie également M^{me} Christine Herrenknecht, Professeur à la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université de Nantes – directrice du département de Chimie Générale, Minérale et Analytique et ma directrice de thèse les deux dernières années – pour m'avoir accueilli dans votre département où j'ai pu réaliser une partie de cette thèse et aussi approfondir mes connaissances depuis de mon arrivée en master. Vos compétences scientifiques et vos connaissances ont été un réel bénéfice à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à M^{me} Aurore Zalouk-Vergnoux, et M^{me} Laurence Poirier – Maîtres de Conférences dans le département de Chimie Générale, Minérale et Analytique de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université de Nantes. Un grand merci pour votre offre de sujet de thèse. Elle n'aurait pas été possible sans vous ! Votre soutien, vos conseils et vos encouragements m'ont beaucoup aidé tout au long de mon travail. Merci également de votre aide pour la valorisation de mes travaux de recherche. J'ai vraiment pu améliorer mes connaissances après ce travail avec vous.

 M^{me} Fabienne Lagarde – Maître de conférences à l'Institut des Molécules et des Matériaux du Mans de l'Université du Mans – merci beaucoup à toi de m'avoir accueilli à plusieurs reprises au sein de ton laboratoire. Merci pour ta gentillesse et ton sérieux. Tes excellentes compétences en spectroscopie Raman et µFT-IR ont m'aidé à mettre au point les protocoles, résoudre des difficultés et analyser mes échantillons. Un grand merci également pour ton aide pour les publications et les présentations faites lors de congrès nationaux et internationaux. Merci aussi aux membres de ton équipe: Philippe Daniel, Nicolas Delorme, Frédéric Amiard pour leur sympathie, je n'oublierai jamais mes séjours au Mans.

Je remercie également les autres participants au projet MiPlAqua du laboratoire MMS ou de l'Ifremer : Priscilla Descottignies, Bruno Cognie, Amélie Châtel, Hannae Perrein-Ettajani, Farida Akcha, Rossana Sussarellu et Julien Rouxel. Vos idées lors des réunions m'ont permis d'aller jusqu'au bout de cette thèse. Merci aussi aux personnes de l'Ifremer qui nous ont accompagnés lors des prélèvements sur terrain. J'ai passé des bons moments avec vous.

Par ailleurs, je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire MMS : les enseignant(e)s, les technicien(e)s pour leur aide pendant mes manipulations, leurs conseils sur mes travaux, les moments de partage, les bonnes expériences. Grâce à eux, toutes les problématiques arrivées dans le courant de cette thèse ont été résolues.

J'exprime mes remerciements aux secrétariats de l'école doctorale VENAM et SML qui m'ont aidé lors de mes inscriptions administratives, aux enseignant(e)s des différentes formations que j'ai suivies. Les connaissances acquises m'ont aidé lors de mon travail de thèse et m'aideront pour mon travail dans l'avenir.

Je n'oublie pas de remercier les personnes qui ont participé à la coopération entre mon Université au Vietnam et l'Université de Nantes : M^{me} Christine Bobin-Dubigeon, M^{me} Nathalie Caroff, M^{me} Nelly Moré, M^{me} Patricia Torres-Gabillard et M^{me} Jelena Milojevic. Merci beaucoup de votre aide pendant mon séjour en France et d'avoir pris le temps nécessaire à résoudre mes difficultés dans ma vie et également dans mes études.

Je tiens à remercier vivement l'Université de médecine et pharmacie de PhuTho, mes collègues de l'université où je travaille, le ministère de l'éducation et de la formation, le gouvernement du Vietnam qui m'ont donné les bourses nécessaires pour réaliser mon master et ma thèse. Leur confiance et leurs encouragements m'ont donné plus de motivation pendant mes études.

Je remercie amicalement mes collègues – mes ami(e)s vietnamien(ne)s du groupe qui est arrivé en France en même temps que moi: Tung, Thuy, Hung, Trang, Tuyen, Huong, Trung et Hung. Merci beaucoup des moments de partage, des bons souvenirs, des difficultés de la vie qu'on a surmontée ensemble. Merci également à mes ami(e)s vietnamiennes, françaises de Nantes et du Mans: Trang, Ha, Son, Anh, Hien, Huy, Paul, Lucie, Marjorie, Thuy, Vincent et AnneIsaline. Merci aux associations vietnamiennes de Nantes et en France: l'AEVN, l'AVLA, l'UEVF pour leur aide dans ma vie.

Singulièrement, je voudrais destiner mes plus sincères remerciements à mes parents, ma femme, ma fille, mon petit frère, mes proches – sans eux, je ne pourrais rien faire.

Liste des figures hors publications

Figure 1.1 : Evolution de la production des matières plastiques en million de tonnes (MT)
en Europe et dans le monde (Source: PlasticsEurope (PEMRG), Statista 2018)15
Figure 1.2 : La consommation européenne de matières plastiques, en fonction du type de
polymère et des grands domaines d'utilisation en 2016 (source: PlasticsEurope, 2017)
Figure 1.3 : Distribution des types de plastiques utilisés en Europe en 2013 avec des
exemples d'objets fabriqués à partir de ces matières (source : PlasticsEurope 2014)22
Figure 1.4 : Concentrations en déchets plastiques à la surface des océans (d'après Cozar et
al. 2014)
Figure 1.5 : Illustration de la distribution en taille des plastiques déchets dans les gyres
océaniques (source : Cozar et al., 2014)
Figure 1.6 : Exposition des espèces animales marines aux MP (source: Lusher, 2015)
Figure 1.7 : Démarche dans l'analyse des MP dans les milieux marins (Ivleva et al., 2017)
Figure 1.8 : Comparaison des spectres de polymères obtenus en spectroscopie FTIR (à
gauche) et Raman (à droite) (d'après Kappler et al., 2016)40
Figure 2.1 : Photos prises lors de la digestion des tissus de 3 moules (I) avec HNO ₃
65% (m/v): I-1 : au début ; I-2 : en cours et I-3 : après filtration et (II) avec KOH 10% (m/v)
après filtration
Figure 2.2 · Spectromètre (uFT-IR) spotlight 200i chez Perkin Elmer, principe de réflexion
mode et exemple d'un spectre de microplastiques
Figure 3.1 : L'évolution des études de MP dans sédiment (d'après Van Cauwenberghe et
al., 2015)
Figure 4.1 : Protocole suivi pour l'étude de la sorption des contaminants organiques sur
MP151

Figure 4.2 : Courbes de cinétique de sorption des contaminants organiques sur des
microplastiques de polyéthylène (NP : nonylphénol, OP : octylphénol, EE2 : 17a-
éthinylestradiol)160
Figure C.1 : Densité (unité/hectare) des MP (de 300 µm à 5 mm) flottants en 2014 au golfe
de Gascogne (source : rapport d'Ifremer décembre, 2017)174

Liste des tableaux hors publications

Tableau 1.1 : Les principaux types de plastiques avec leur abréviation, leur densité, leur
pourcentage de production mondial en 2015 et leur numéro respectifs (Andrady, 2011;
Geyer et al., 2017 et Hidalgo-Ruz et al., 2012)12
Tableau 1.2 : Conséquences de l'enchevêtrement et de l'ingestion de déchets plastiques
observées sur les animaux marins (d'après Law, 2017)27
Tableau 1.3 : Récapitulatif des étapes réalisées dans de récentes études pour l'extraction
des MP à partir de différentes matrices
Tableau 1.4 : sites d'étude, quantité, type/forme de MP retrouvés dans les eaux marines
Tableau 1.5 : sites d'étude, quantité, type/forme de MP retrouvés dans les sables et sédiments.
Tableau 1.6 : Type et quantité des MP retrouvés dans les animaux marins61
Tableau 1.7 : Type de MP issus du milieu marin et concentrations en contaminants organiques extraits
Tableau 1.8 : Travaux portant sur la sorption de contaminants organiques sur les microplastiques
Tableau 2.1 : Choix des critères des différentes étapes des protocoles d'analyse des MP réalisés sur des bivalves
Tableau 4.1 : Niveaux de concentration en octylphénol, en nonylphénol, en 17 β -estradiol (E2) et en 17 α -éthynylestradiol (EE2) dans l'environnement marin
Tableau 4.2 : Propriétés et origine des composés organiques sélectionnés pour l'étude de leur sorption sur MP
Tableau 4.3 : Caractéristiques des droites d'étalonnages à 8 points utilisées pour la quantification des contaminants organiques
Tableau 4.4 : Réponses aux critères de répétabilité et justesse de la méthode analytique dans l'eau de mer $(N = 3)$

Tableau 4.7 : Rendements d'extraction liquide-liquide des contaminants organiques contenus dans l'eau de mer par du CH_2Cl_2 (exprimés en %, moyenne ± écart-type, N = 3)

Tableau4.8: Bilans de matière des contaminants organiques (exprimé en %,moyenne \pm écart-type, N = 3)159

 Tableau C.1 : Pourcentage de la taille des plastiques déchets à la surface du golfe de

 Gascogne (source: rapport d'Ifremer décembre, 2017)

Liste des abréviations hors publications

4-MBC :	4-methylbenzylidene camphor
4-n-NP :	4-n-nonylphénol
4-n-OP :	4-n-octylphénol
4-t-BP :	4-tert-butylphénol
4-t-OP :	4-tert-octylphénol
ABS :	Acrylonitrile butadiène styrène
ACN :	Acétonitrile
AD:	Anodisc
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AP:	Alkylphénol
ATR :	Réflectance totale atténuée
BDE :	Bromodiphényléther
BET :	Brunauer-Emmett-Teler
BJH :	Barrett-Joyner-Halenda
BPA :	Bisphénol A
CaCl ₂ :	Chlorure de calcium
CaCO ₃ :	Carbonate de calcium
CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
CO :	Contaminant organique
Cs:	Concentration sur la phase solide
CV:	Coefficients de variation
C _w :	Concentration dans la phase liquide
DCSMM :	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin
DDE :	Dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT:	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEHP :	Phtalate de di-2-éthylhexyle
DL50:	Dose létale
DMF:	Diméthylformamide
E2:	17β-estradiol
EDM :	Eau de mer
EE2 :	17α–éthinylestradiol
EPS :	Polystyrène expansé
ET :	Ecart-type
FTIR :	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
FV:	Fibre verre
H ₂ O :	Eau
H_2O_2 :	Peroxyde d'hydrogène
HAP:	Hydrocarbures aromatique polycycliques
HBCD :	Hexabromocyclododécane
HCH :	Hexachlorocyclohexane
HCl:	Acide chlorhydrique

HClO ₄ :	Acide perchlorique
HDPE :	Polyéthylène à haute densité
HNO3:	Acide nitrique
HPLC:	chromatographie en phase liquide à haute performance
Ifremer :	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IMMM :	Institut des Molécules et Matériaux du Mans
INERIS :	Institut national de l'environnement industriel et des risques
K _d :	Coefficient de distribution
KI:	Iodure de potassium
KOH :	Hydroxyde de potassium
Kow	Coefficient de partage Octanol/Eau
LDPE :	Polyéthylène à basse densité
LOD:	Limite de détection
LOQ:	Limite de quantification
MMS :	Mer Molécule Santé
MP :	Microplastiques
MT :	Million de tonnes
m/v :	Masse sur volume
NaCl :	Chlorure de sodium
NaI :	Iodure de sodium
NaOH :	Hydroxyde de sodium
Na ₂ WO ₄ :	Tungstate de sodium
NC:	Nitrate de cellulose
nd :	Non détecté
NP:	Nonylphénol
OP:	Octylphénol
OPE :	Ester organophosphate
PA :	Polyamide
PBDE :	Polybromodiphényl éthers
PC:	Polycarbonate
PCB:	Polychlorobiphényles
PCB 77 :	3,3',4,4'-tetrachlorobiphényle
PE :	Polyéthylène
PET (PETE) :	Polytéréphtalate d'éthylène
PFOA :	Acide perfluorooctanoique
PIB:	Polyisobutylène
PLA :	Acide polyactique
PMMA :	Polyméthacrylate de méthyle
POM :	Polyoxyméthylène
POP:	Polluants organiques persistants
PP:	Polypropylène
PS :	Polystyrène
PSU :	Unité de salinité pratique

PTFE :	Polytétrafluoroéthylène
PUR:	Polyuréthane
PVAL:	Poly (alcool vinylique)
PVC:	Polychlorure de vinyle
PVP:	Polyvinyl pyrrolidone
R ² :	Coefficient de détermination
SAN:	Styrène-acrylonitrile
SB:	Styrène-butadiènne
T4 :	Thyroxine
Tpm :	Tour par minute
UHPLC :	Chromatographie liquide ultra haute performance
UV:	Ultraviolet
ZnCl ₂ :	Chlorure de zinc

INTRODUCTION GENERALE

L'écosystème aquatique est reconnu comme un constituant indispensable à notre vie puisqu'il permet notre approvisionnement en eau et en nourriture. Pourtant, la protection de cet écosystème n'est pas assurée et les activités humaines sont nuisibles pour le maintien de sa qualité. De nombreuses études ont rapporté la contamination des eaux douces, des mers et des océans par différents types de contaminants : les éléments traces métalliques, les polluants organiques persistants, les déchets plastiques, etc.

Les plastiques sont des polymères organiques synthétiques qui présentent de nombreux avantages, ce qui se traduit par une utilisation importante de ces matériaux, notamment dans notre vie de tous les jours. Par conséquent leur production à l'échelle mondiale est massive : jusqu'à 335 millions de tonnes en 2016 (PlasticsEurope, 2017). Bien que la production massive des plastiques ait commencé depuis environ soixante-dix ans, la pollution par les déchets plastiques n'est visible et étudiée que depuis les années 1970. Du fait d'un temps d'utilisation court et d'une dégradation lente de ces matériaux, les déchets plastiques sont, par conséquent, omniprésents à l'échelle du globe. Près de la moitié des objets plastiques est jetée après une seule utilisation et il a été estimé qu'environ 10% atteignent les mers et les océans (Barnes et al., 2009 ; Hopewell et al., 2009), ce qui représente plusieurs dizaines de millions de tonnes par an. Une fois dans l'environnement, les débris plastiques peuvent être transportés sur de longues distances par les vents, la marée, les courants maritimes et s'accumuler dans les milieux naturels, créant par exemple des « hot-spot » au niveau des gyres océaniques.

En 1997, lors d'une expédition en mer, Charles Moore découvre l'immense amas de débris plastiques au niveau de la gyre du Pacifique Nord, qui est aujourd'hui communément appelée « 7^{ème} continent ». Les déchets plastiques accumulés se fragmentent sous l'effet de plusieurs facteurs comme la photo-dégradation, les variations de température, l'hydrolyse, la biodégradation (Costa et al., 2010 ; Zettler et al., 2013), aboutissant « in fine » à la formation de morceaux de taille variable qui sont appelés « microplastiques » (MP). La fragmentation des déchets plastiques est une source de contamination de l'environnement en MP qui est appelée « source secondaire ». En revanche les MP provenant de l'introduction dans l'environnement de micro-fragments plastiques, par l'intermédiaire de produits du quotidien (produits cosmétiques, ménagers, encres...) qui en sont constitués, correspond à la « source primaire » de MP retrouvés dans l'environnement (Andrady, 2011). A ce jour, les MP représentent une préoccupation majeure pour le maintien de la qualité des écosystèmes et de nombreuses études scientifiques ont été réalisées ces dernières années sur leur impact dans l'environnement. En effet, il devient urgent d'évaluer, d'une part, la contamination environnementale et, d'autre part,

les effets que peuvent avoir ces MP sur les milieux et les organismes qui y vivent, en d'autres termes, d'évaluer le risque environnemental.

Même si plusieurs échelles de taille ont été utilisées pour qualifier les MP, la définition proposée par Arthur et al. (2009), c'est-à-dire des matières plastiques présentant une taille inférieure à 5 mm, a été acceptée par la communauté scientifique. Les MP sont ubiquitaires puisque leur présence a été rapportée dans tous les compartiments environnementaux: atmosphère, sols, eaux, sédiments, (Dris et al., 2015b; Gasperis et al., 2015; Rillig et al., 2012) et notamment ceux du milieu marin (Cozar et al., 2015 ; Desforges et al., 2014 ; Thompson et al., 2009). Cependant, les compartiments biologiques sont également impactés (Besseling et al., 2015; Collignon et al., 2012 ; Van Cauwenberghe et al., 2015). La bioaccumulation des MP des planctons jusqu'aux mammifères a été rapportée dans diverses études (Bravo Rebolledo et al., 2013 ; Desforges et al., 2015; Mathalon and Hill, 2014). En fonction de leur taille, les MP peuvent s'accumuler, plus ou moins facilement, dans les organismes et parfois même atteindre le système circulatoire, comme cela a été montré chez une espèce de moule (Mytilus edulis ; Browne et al., 2008). Un transfert des MP le long de la chaîne trophique a aussi été mis en évidence dans une étude sur la moule et le crabe (Mytilus edulis et Carcinus menas ; Farrell and Nelson, 2013). Cependant, les unités d'expression des niveaux de contamination environnementaux peuvent être différentes, en fonction des études, tout comme les procédures d'isolement et d'identification des MP. Tout cela représente des verrous à une évaluation de la contamination à l'échelle mondiale, qu'elle soit quantitative ou qualitative (nature, forme, taille, couleur).

En parallèle, la présence de contaminants organiques a été mise en évidence sur/dans des MP issus des milieux marins. Ce sont, soit des additifs utilisés lors de la fabrication des plastiques, comme les phtalates, les alkylphénols, le bisphénol A ou les polybromodiphényl éthers (PBDE), soit des contaminants présents dans l'environnement, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), qui se sont sorbés aux MP plutôt hydrophobes (Bakir et al., 2012 ; Ogata et al., 2009 ; Teuten et al., 2007), voire un mélange des deux. Etant donné que les MP peuvent être ingérés par les organismes vivants, ils peuvent être considérés comme des vecteurs de contamination car, une fois dans l'organisme, les contaminants peuvent être désorbés et assimilés par les organismes. Ces composés, associés aux MP, vont alors potentiellement engendrer des effets sur les organismes, à différents niveaux, comme la reproduction ou le métabolisme (Avio et al., 2015).

Parmi les espèces marines, la moule et l'huître sont des bivalves souvent utilisés comme bioindicateurs car elles reflètent l'état du milieu dans lequel elles évoluent, notamment grâce à leur mode d'alimentation. La moule est notamment utilisée comme moyen de biosurveillance dans différents réseaux (Farington et al., 1995; RNO, 2006). En effet, ces espèces filtreuses se nourrissent en filtrant l'eau à des débits relativement importants, de l'ordre de 2 et 5 L/h respectivement pour la moule et l'huître. Leur utilisation s'est révélée pertinente, à plusieurs reprises, pour évaluer la contamination en MP du milieu aquatique marin, mais aussi pour évaluer les effets biologiques associés (Browne et al., 2008 ; Sussarellu et al., 2016 ; Von Moss et al., 2012). Un autre compartiment susceptible d'accumuler les MP est le sédiment, puisqu'il s'agit du compartiment récepteur ultime de nombreux contaminants de nature plutôt hydrophobe. La présence de MP dans les sédiments peut s'expliquer par la sédimentation des MP possédant une densité supérieure à l'eau, comme le polychlorure de vinyle (PVC) ou le polytéréphtalate d'éthylène (PET ou PETE). Cependant, les MP constitués de matières plastiques moins denses, comme le polyéthylène (PE) ou le polypropylène (PP), peuvent également être retrouvés dans le sédiment, leur sédimentation étant accrue du fait de la modification de leur taille, de leur densité et de leurs propriétés de surface, sous l'influence de différents facteurs.

L'économie maritime est un secteur d'activité d'un poids considérable pour la France. Parmi les activités liées à cette économie, la conchyliculture représente une part très importante, avec une production moyenne d'environ 220 000 tonnes des coquillages chaque année (comité national de la conchyliculture, 21/04/2017). Cette production se situe à la première place en Europe et à la quatrième place au niveau mondial. L'ostréiculture et la mytiliculture représentent plus de 95% de la production de coquillages (125 151 tonnes d'huîtres et 87 894 tonnes de moules en 2015/2016). Plus précisément, en région des Pays de la Loire, les productions s'élèvent à 8 000 et 10 000 tonnes respectivement pour l'huître et la moule (FranceAgriMer, 2016). Enfin, la consommation des produits de la mer, excepté les poissons, est estimée à 9,7 kg par habitant en France pour l'année 2015 (FranceAgriMer, 2016).

Dans ce contexte le laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS), associé à l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) et à l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer Nantes) a répondu à un appel à projet « Paris Scientifiques Régionaux » en proposant une étude appelée MiPlAqua pour « Approche combinée terrain/laboratoire pour l'évaluation de l'impact des microplastiques sur des organismes aquatiques d'intérêt socio-économique (moules, huîtres) ». Ce projet a été retenu et financé par

5

la région des Pays de la Loire. Le travail doctoral présenté dans ce manuscrit correspondait à une partie du projet MiPlAqua qui visait à évaluer les niveaux de contamination en MP du milieu côtier, afin de définir les risques environnementaux et d'évaluer l'exposition humaine aux MP. Par ailleurs, ce travail doctoral avait aussi pour but de déterminer les niveaux de contamination de ces MP par des composés organiques pouvant se sorber sur les MP. Les résultats obtenus devaient permettre d'estimer le niveau de contamination en MP et en contaminants organiques à apporter à des milieux artificiels pour l'exposition d'organismes en laboratoire, afin d'évaluer leurs effets potentiels, à des doses rencontrées dans l'environnement. Les points de prélèvements des moules, huîtres, eau de mer et sédiments du projet, réalisés sur la côte Atlantique de la Région Pays de la Loire se situaient dans le Golfe de Gascogne. Une étude quantitative des MP, mais également qualitative, a été menée. Pour cela, des protocoles de préparation d'échantillon et d'analyse ont dû être développés et validés au préalable, car il n'existait pas de protocole standardisé.

Ce manuscrit débute par une étude bibliographique, correspondant au chapitre 1, qui présente l'état de l'art existant sur les principaux axes constituant ce travail doctoral. Cette partie commence par la définition des matières plastiques, leur production, leur utilisation, leur devenir, en tant que déchets, afin de contextualiser la problématique des MP. Puis, l'occurrence des MP et leur caractérisation dans chaque compartiment environnemental sont rapportés, en faisant un focus préalable sur les méthodes d'extraction et d'identification des MP issus du milieu marin. Pour finir une partie traite de l'évaluation de la capacité des MP à sorber les contaminants organiques.

Le second chapitre de ce manuscrit est consacré à la présentation d'une partie des résultats du travail expérimental sur l'évaluation de la contamination en MP dans deux espèces de bivalves. Le développement du protocole qui a été utilisé est tout d'abord explicité, point par point, avant que soient présentés sa validation et son application sur les organismes issus du milieu naturel. Les résultats obtenus sont inédits puisque c'est la première fois qu'une telle étude a eu lieu sur ces sites côtiers de la Région des Pays de la Loire. Des informations quantitatives, mais également qualitatives sur les MP trouvés dans ces organismes sont présentées. Enfin, grâce à la stratégie d'échantillonnage mise en place pour cette partie du travail doctoral une discussion de l'influence spatiale, temporelle et du mode de vie des organismes sur la contamination a pu être réalisée.

Le chapitre 3 est dédié au compartiment sédimentaire, pour lequel le développement d'un protocole, rapide et peu coûteux, d'analyse des MP a été mis en œuvre. Ce protocole a ensuite

6

été validé et appliqué aux échantillons collectés sur les sites d'étude des bivalves, afin de mettre en évidence l'influence spatiale et temporelle, sur la contamination des sédiments en MP, et de corréler les résultats obtenus sur les sédiments avec ceux des bivalves.

Le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit présente les résultats obtenus sur l'étude de la capacité de sorption des MP, appliquée à six contaminants organiques (alkylphénols et estradiols) présentant des propriétés physico-chimiques différentes, avec *in fine*, la détermination de leurs coefficients de distribution entre les MP et l'eau de mer. L'influence de la nature du matériau plastique et l'évaluation des quantités sorbées pour le contaminant organique étudié le plus apolaire seront également présentés.

Pour finir, ce manuscrit terminera par une partie de discussion des résultats, de conclusion et de présentation des perspectives à ce travail.

Chapitre I:

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Liste des articles :

Article n°1 : Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments?

Publié dans le journal "Environmental Pollution" 211 : 111-123 en 2016

I.1 Les plastiques

Le mot 'plastique' dérive du latin 'plasticus' qui est lui-même issu du grec ancien 'plastikos', qui est relatif au modelage (Charlton and Charles, 1879). En effet, la propriété principale des plastiques est la plasticité ou la malléabilité du matériau pendant la fabrication d'objets pouvant avoir une grande variété de formes comme des films, des fibres, des bouteilles, des boîtes... et qui sont souvent réalisés sous pression et à haute température.

I.1.1 Définition

Les plastiques ou matières plastiques correspondent à une répétition d'unités moléculaires simples, appelées monomères. Elles couvrent une gamme très étendue de matériaux polymères artificiels ou synthétiques. Les polymères artificiels sont obtenus à partir d'une modification de matières premières naturelles alors que les polymères synthétiques sont totalement issus de la chimie du pétrole. Le celluloïd est considéré comme la toute première matière plastique artificielle dont l'origine remonte à 1856, constitué de nitrate de cellulose et de camphre. La production d'un polymère synthétique est plus récente et date de 1910.

Les plastiques sont caractérisés par de nombreuses propriétés physiques comme la légèreté, la solidité, la durabilité, la facilité de moulage, la capacité d'absorption de chocs, l'inertie chimique, l'isolation thermique et électrique, la résistance à la corrosion et à l'eau (Thompson et al., 2009).

I.1.2 Classements des plastiques

Comme la définition des plastiques, leur classement peut aussi se baser sur différents critères. Les classements les plus souvent utilisés reposent sur les caractéristiques physiques et chimiques du plastique.

I.1.2.1 Classement selon la composition chimique

La composition chimique permet de classer des plastiques. Le **tableau 1.1** répertorie quelques types de plastiques avec leur densité respective. Parmi ces plastiques, six sont particulièrement utilisés en Europe et représentent près de 80% (en tonnage) des plastiques produits (appelés « big six », PlasticsEurope, 2015), c'est la raison pour laquelle ils sont codés sur les emballages par un sigle et un numéro allant de 1 à 6 (norme ISO 1043-1, AFNOR 12-2016), le numéro 7 représentant tous les autres types de plastiques.

Type de plastique	Abréviation	Densité (g.cm ⁻³)	Pourcentage de production (% en poids)	Numéro
Polyéthylène téréphtalate	PETE (PET)	1,37 – 1,45	8,6	1
Polyéthylène haute densité	HDPE	0,94 - 0,97	13,6	2
Polychlorure de vinyle	PVC	1,16 – 1,58	10,0	3
Polyéthylène basse densité	LDPE	0,91 – 0,93	16,8	4
Polypropylène	PP	0,90 - 0,91	17,8	5
Polystyrène	PS	1,04 - 1,10	6,6	6
Polyamide	PA	1,02 - 1,05		
Polyoxyméthylène	POM	1,41 – 1,61		
Poly (alcool vinylique)	PVAL	1,19 – 1,31		
Polyuréthane	PUR	1,20	26,7	7 ⁽²⁾
Acrylonitrile butadiène styrène	ABS	1,03 – 1,08		
Polyester ⁽¹⁾		1,24 - 2,30		
Polyacrylique ⁽¹⁾		1,09 - 1,20		

Tableau 1.1: Les principaux types de plastiques avec leur abréviation, leur densité, leur pourcentage de production mondial en 2015 et leur numéro respectifs (Andrady, 2011; Geyer et al., 2017 et Hidalgo-Ruz et al., 2012).

⁽¹⁾: Polyester et polyacrylique sont des groupes de plastiques

⁽²⁾: Regroupe l'ensemble des autres plastiques qui n'entrent pas dans les catégories précédentes

Le polyéthylène téréphtalate (PET ou PETE) est un plastique de type polyester qui présente un groupement ester (-COO-) dans sa structure. Ce plastique est obtenu par la polycondensation de l'acide téréphtalique avec l'éthylène glycol. Les polyesters sont apparus dans les années 1880 et le PET a été breveté en 1941 en Angleterre (Andrady and Neal, 2009). Il est utilisé dans la production d'une large gamme de produits comme les bouteilles d'eau, les barquettes alimentaires, les fibres textiles, etc. En 2008, on a estimé que, au niveau mondial, près de 200 milliards de bouteilles fabriquées sont en PET (Arnold and Larsen, 2006).

Le polyéthylène (PE) est une polyoléfine simple et peu coûteuse. Le polyéthylène basse densité (LDPE) a été découvert en 1933 par deux ingénieurs anglais, tandis que celui à haute densité (HDPE) a été synthétisé pour la première fois en 1953 par le chimiste allemand Karl Ziegler et son équipe (Andrady and Neal, 2009; Sivaram, 2017). Son nom vient du fait qu'il est obtenu par polymérisation des monomères d'éthylène. Ce type de plastique est celui qui est le plus fabriqué parmi tous les plastiques. Cette importante proportion s'explique par la très large gamme d'applications pour lesquelles ce matériau est utilisé comme celui des emballages de produits alimentaires, des films agricoles, la fabrication de jouets, de bouteilles de lait etc.

Le polychlorure de vinyle (PVC) est un plastique de la famille des chloropolymères. Il a été synthétisé pour la première fois en 1872 par Eugen Baumann mais sa présence sur le marché des plastiques n'apparaît qu'à partir des années 1920 aux États-Unis (Andrady and Neal, 2009). Le PVC est synthétisé à partir de deux matières premières qui sont le sel de mer et le pétrole. Son utilisation majeure, à hauteur de 40%, est la fabrication de tuyaux. Par ailleurs, il entre également dans la fabrication de câbles, de vêtements, de tapisseries etc. (Andrady, 2011 ; Kunststoffe International, 2016). Il est au troisième rang des plastiques fabriqués au niveau mondial (après le PE et le PP).

Comme le PE, **le polypropylène** (PP) est une polyoléfine résultant de la polymérisation de monomères propylènes en présence de catalyseurs. Il a été découvert en 1954 (Andrady and Neal, 2009). De nombreuses applications dans la vie de tous les jours utilisent ce type de plastique, par exemple : le secteur automobile, textile, alimentaire avec différents emballages. Ce polymère se place d'ailleurs à la seconde place des polymères les plus utilisés.

Le polystyrène (PS) est un polymère qui est obtenu par la polymérisation du monomère styrène. Sa production a commencé en 1930 en Allemagne puis aux États-Unis en 1937 (Andrady and Neal, 2009). Il est le plus commun de la famille des polymères styréniques qui contiennent différents autres copolymères du styrène comme le styrène-butadiène (SB), le styrène-acrylonitrile (SAN), l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS) etc. Ils permettent d'améliorer la résistance aux chocs tout en gardant un aspect de transparence. De plus, une autre forme de ce plastique, appelée polystyrène expansé ou mousse de polystyrène (EPS ou PS-E) a été inventée en 1954 (Andrady and Neal, 2009). L'emprisonnement de petites bulles de gaz permet de donner à ce type de plastique un fort pouvoir isolant aux matériaux de construction ou d'emballages. Le polystyrène est lui plutôt utilisé pour la protection d'appareils électroniques ou d'électroménagers, comme les télévisions, les machines à laver, etc.

Les autres plastiques dont le sigle fait apparaitre le numéro 7, regroupent des centaines d'autres plastiques bien différents des six plastiques présentés précédemment. Les plus connus sont par exemple : le polyamide (PA), le polycarbonate (PC), le polyuréthane (PUR) etc. Les copolymères (avec du PE ou du PP, l'ABS) font également partie de ce groupe. Étant donnée la grande variété de plastiques constituant ce groupe, il représente donc environ 25% (en poids) de la fabrication de plastiques, et présente de nombreuses applications comme l'isolation des bâtiments (PUR), la fabrication de jouets, dans l'industrie automobile (ABS), les toitures (PC), les revêtements de câbles de télécommunication (PTFE), etc.

Plus récemment, **les bioplastiques** sont apparus car ils présentent un intérêt que ne présentent pas les plastiques synthétiques : ils sont biodégradables. Ils sont, soit issus de ressources renouvelables comme le blé, le maïs, la patate douce, soit de plastiques biodégradables issus de réactions pétrochimiques. Ces bioplastiques permettent une réduction des rejets de gaz à effet de serre lors de leur fabrication. Parmi eux, les plus connus sont l'acide polylactique (PLA), le polyamide 11, le polyéthylène bio-dérivé, etc. Leurs utilisations concernent principalement les objets jetables. Malgré les bénéfices qu'ils peuvent apporter d'un point de vue environnemental, leur production est encore très faible, atteignant seulement 3,9 millions de tonnes en 2015 (European Bioplastics, 2016).

I.1.2.2 Classement selon les propriétés physiques

Parmi les différentes propriétés physiques des matériaux plastiques, deux semblent particulièrement importantes, ce sont les propriétés thermiques et mécaniques. En ce qui concerne les propriétés thermiques et le comportement des plastiques à la chaleur, ils peuvent être classés en deux familles : les thermoplastiques et les thermodurcissables. Les thermoplastiques ont une température de transition vitreuse basse. Au-dessus de cette température (inférieures à 120°C pour la plupart des thermoplastiques), ils sont malléables, ce qui leur permet de prendre des formes réversibles. Quant aux plastiques thermodurcissables, ils prennent une forme déterminée, qui est irréversible, après polymérisation, sous l'action de la chaleur. Cette propriété dépend fortement de la structure du polymère, et des liaisons intermoléculaires, car les thermoplastiques sont en général des polymères linéaires, ramifiés, ou non, alors que les plastiques thermodurcissables sont de structure tridimensionnelle.

L'utilisation des matériaux plastiques est principalement liée à leurs propriétés mécaniques. Derrière le terme de propriétés mécaniques se cache un grand nombre de critères (environ soixante) nécessitant une évaluation à l'aide d'essais et de matériel adéquats. Ces critères regroupent par exemple la dureté, l'élasticité, l'allongement à la rupture, la résistance à la corrosion, à l'oxydation, à l'érosion, aux chocs et aux agents chimiques, etc. Les propriétés mécaniques sont dépendantes de la structure du matériau, et donc, des propriétés physiques. En effet, les plastiques thermodurcissables sont souvent durs et fragiles tandis que les thermoplastiques ont une bonne élasticité.

De plus, trois autres propriétés physiques des plastiques sont également importantes, ce sont la densité, la conductivité thermique et la conductivité électrique. En ce qui concerne la densité des plastiques, elle représente une large étendue avec des valeurs allant de 0,016 à 3,9 g.cm⁻³,

les plastiques expansés représentant les valeurs les plus faibles. Cependant, la densité de la majorité des plastiques est comprise entre 0,92 et 1,45 g.cm⁻³. Par ailleurs compte tenu de la faible conductivité thermique (environ cent fois plus faible que celle des métaux), beaucoup de matériaux plastiques sont utilisés comme isolants. De plus, la conductivité électrique étant faible également, les matériaux plastiques tels que le polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou bien le HDPE sont très souvent utilisés pour l'isolation de fils et câbles électriques.

I.1.3 Evolution de la production des plastiques

L'homme a commencé par utiliser les polymères naturels comme le caoutchouc au début du seizième siècle. Puis, la production massive de plastiques a réellement commencé à partir des années 1950 compte tenu de leurs nombreux avantages. La production mondiale a augmenté très rapidement de 1,5 millions à 335 millions de tonnes entre 1950 et 2016 (PlasticsEurope (PEMRG), Statista 2018) comme le montre la figure 1.1, avec une progression moyenne de 8,6% par an depuis 1950. En ce qui concerne l'Europe, Une nette hausse de la production s'est produite entre les années 1950 et 2002. Puis, la production stagne depuis 2002, avec des valeurs de croissance comprises entre 1 et 3% (PlasticsEurope, 2017). La production totale de plastique a été estimée à 8,3 milliards de tonnes en 2015 et pourrait atteindre 25 milliards de tonnes en 2050 (Geyer et al., 2017).





Figure 1.1: Evolution de la production des matières plastiques en million de tonnes (MT) en Europe et dans le monde (Source: PlasticsEurope (PEMRG), Statista 2018)

L'industrie produisant des matériaux plastiques consomme près de 8% du pétrole et du gaz utilisé au niveau mondial (Thompson et al., 2009) et entre 4 et 6% en Europe (PlasticsEurope, 2016). D'après le rapport européen de 2017, elle emploie plus de 1,5 millions de personnes et réalise un chiffre d'affaires de 350 milliards d'euros (PlasticsEurope 2017). L'Asie est le premier continent producteur avec près de 50% du total et la Chine est le pays qui se place en tête en produisant 29% du total. L'Europe arrive ensuite avec une production de près de 19% de la production mondiale. La production européenne est relativement stable depuis 2002 avec une moyenne annuelle comprise entre 55 et 60 millions de tonnes comme le montre la **figure 1.1**. Avec une valeur à 7,5 millions de tonnes des plastiques fabriqués en 2015, la France se situe à la dixième place des producteurs, au niveau mondial, et elle se place quatrième en Europe après l'Allemagne, la Turquie et l'Italie (Pagev 2016, World and Turkish plastics industry).

I.1.4 Les additifs dans les plastiques

Les plastiques sous forme brute sont très rares sur le marché. Dans la plupart des cas et en fonction de leur utilisation, des additifs sont incorporés au cours de leur fabrication afin d'améliorer leurs performances. La présence d'additifs dans certains plastiques commerciaux peut atteindre jusqu'à 70% de la masse totale. Actuellement, il existe de nombreux additifs qui peuvent être utilisés, en tant que plastifiants (bisphénol A, phtalates), de stabilisants (nonylphénol), d'ignifugeants (polybromodiphényléthers : PBDE, hexabromocyclododécane : HBCD, ester organophosphate : OPE), de tensioactifs (alkylphénols, alkyls perfluorés), d'agents gonflant, de colorants (carbonate de calcium, cadmium, plomb, chrome), etc. La plupart d'entre eux sont particulièrement incriminés à cause de leur toxicité rapportée dans de nombreuses études, avec des effets notables au niveau du système endocrinien (GESAMP, 2016; Meeker et al., 2009; Oehlmann et al., 2009; Rochman, 2015 et Talsness et al., 2009).

Le bisphénol A (BPA) est un composé organique aromatique très souvent utilisé dans l'industrie des plastiques depuis les années 1960 comme plastifiant. Il est principalement retrouvé dans le polycarbonate et les résines époxydes, mais aussi comme antioxydant dans le PVC. Sa production mondiale atteint 4 millions de tonnes annuellement malgré son interdiction d'utilisation dans des contenants alimentaires dans de nombreux pays comme le Canada, la France, la Belgique, etc. Sa toxicité a été largement étudiée et des essais sur des rats ont permis de déterminer des doses létales 50 (DL50) de 3250, 841 et 35 mg/kg respectivement après exposition orale, intrapéritonéale et intraveineuse (Paut and Desphande, 2012). L'exposition de rats par voie orale à une dose de 250 μ g/kg a permis de montrer que le BPA serait
carcinogène (Acevedo et al., 2013). Sur l'homme, des effets du BPA ont été observés au niveau hormonal (Meeker et al., 2009b) avec des concentrations dans l'urine de 167 hommes inversement proportionnelles au ratio estradiol/testostérone du sérum. Il s'agit donc d'un perturbateur endocrinien avéré (Meeker et al., 2009b ; Melzer et al., 2011 et Ziv-Gal et al., 2013). De plus, une étude croisée sur 2838 participants, âgés de 6 à 19 ans, a montré que la concentration en BPA dans leur urine était significativement corrélée à l'obésité (Saal et al., 2012 ; Trasande et al., 2012). Une corrélation entre le niveau du BPA dans l'urine avec celle d'un anticorps « cytomegalovirus (CMV) antibody titers » a également été trouvée dans une étude épidémiologique (Clayton et al., 2011).

Les phtalates sont un groupe de produits chimiques dérivés de l'acide phtalique. Ils sont utilisés dans plusieurs objets du quotidien comme les emballages alimentaires, les cosmétiques, les peintures, les vêtements, les jouets etc. Leur production atteint environ 3 millions de tonnes par an. Ces composés sont utilisés depuis les années 1950 dans les plastiques afin d'améliorer leur tenue aux chocs et au froid, leur allongement à la rupture, leur plasticité. Près de 90% des phtalates sont utilisés dans le PVC à l'intérieur desquels ils peuvent représenter jusqu'à 50% de la masse. Comme le BPA, certains phtalates possèdent aussi un effet perturbateur endocrinien et peuvent provoquer des anomalies au niveau du foie, des reins, etc. Cependant, sa toxicité aigüe semble moins importante, avec des valeurs de DL50 sur les rats comprises entre 1 à 10 g/kg par voie orale pour le phtalate de bis-(2-éthylhexyle) (DEHP ; NTP, 2006). Par ailleurs, le phtalate de diéthyle a également été démontré comme carcinogène sur des rats après exposition par voie orale à 520 mg/kg/jour (NTP, 1995). Le DEHP aurait aussi des effets sur la reproduction et le développement de l'enfant de moins d'un an et chez les femmes enceintes ayant subi une exposition supposée entre 1 à 30 µg/kg/jour (NTP-CERHR, 2000; 2005).

Les polybromodiphényléthers (PBDE) représentent 209 composés chimiques avec 2 noyaux aromatiques plus ou moins substitués par des atomes de brome. Ils sont commercialisés sous forme de mélanges de composés possédant 5, 8 et 10 bromes, respectivement : penta-BDE, octa-BDE et déca-BDE. Leur principale utilité est de donner aux matériaux plastiques des propriétés ignifugeantes, c'est-à-dire qui rendent difficilement inflammables les matériaux naturellement combustibles et ralentit la propagation des flammes. Ils sont utilisés dans la fabrication de nombreux produits électriques, de pièces automobiles, de textiles, de revêtements, etc. Ils peuvent représenter de 5 à 30% de la masse du plastique. Leur utilisation est massive depuis les années 1970 avec une production atteignant 67 000 tonnes en 2001. Les

PBDE causent des dommages à l'ADN par l'induction de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species ; EFSA, 2011). Le système thyroïdien semble être la cible principale de ces composés (EFSA, 2011). Par exemple, le BDE-47 a été montré comme étant la cause d'une diminution de la concentration de thyroxine (T4) dans le sérum de souris exposées à une dose de 100 mg/kg/jour par voie orale (Richardson et al., 2008). De même, le BDE-99 entraînerait une diminution de la T4 aux doses de 0,06 et 0,3 mg/kg (Kuriyama et al., 2007). Enfin, la concentration en T4 dans le sérum serait corrélée à une dose d'exposition de souris par voie orale au BDE-209 comprise entre 6 et 20 mg/kg (Rice et al., 2007). A cause de leur toxicité avérée, quelques pays ont déjà commencé à réglementer leur utilisation comme le Canada, les États-Unis, l'Europe.

Les alkylphénols (AP) ont fait l'objet de nombreux travaux, du fait de leur utilisation massive et de leur toxicité (David et al., 2009). Les AP sont une famille de composés organiques constitués d'une chaine alkyle liée à un phénol en position ortho- (2-AP), méta- (3-AP) ou para- (4-AP). Parmi les AP, le nonylphénol (NP) est le plus utilisé, notamment pour son rôle de stabilisant dans les plastiques (GESAMP, 2016). Sa toxicité a été rapportée dans plusieurs études (Tato et al., 2018 ; Vidal-Linan et al., 2015). Lussier et al. (2000) ont montré que la DL50 du NP est de 17 μ g/L après 96 h d'exposition pour un poisson marin (*Pleuronectes americanus*). La DL50 atteint 300 μ g/L pour la coque glauque (*Cerastoderma glaucum*) (Marin et al., 2008). Tandis que des effets de perturbations endocriniennes sur une large gamme d'animaux marins ont été rapportés (ECHA, 2014), à des concentrations d'exposition comprises entre 0,1 à 1 μ g/L en fonction de l'espèce.

L'hexabromocyclododécane (HBCD) et les esters organiques de l'acide phosphorique (OPE) sont utilisés comme ignifugeants (GESAMP, 2016) au même titre que les PBDE. La consommation européenne d'HBCD était d'environ 11 000 tonnes en 2007 (ECHA, 2008) avec une grande proportion (90%) utilisée dans la fabrication les polystyrènes expansés (INERIS, 2011). Sa toxicité a été évaluée sur le rat avec une dose mortelle supérieure à 20 g/kg par voie orale et supérieure à 200 mg/L par inhalation (ECHA, 2008). Pour les OPE, la consommation mondiale était d'environ 300 000 tonnes en 2011 (Castro-Jimenez et al., 2016). La toxicité des OPE a également été rapportée dans les revues d'articles de Van der Veen and Boer, (2012) et Zhang et al. (2016).

I.1.5 La consommation des matériaux plastiques à l'échelle européenne

Grâce à leurs nombreux avantages, les plastiques ont remplacé parfois les matériaux traditionnels tels que le papier, le métal, le bois, le verre. En termes de quantité, l'Europe représente une consommation de 49,9 millions de tonnes en 2016 en excluant les fibres de PET, PA, PP et polyacrylique (PlasticsEurope, 2016). Environ 70% de cette consommation concerne principalement 6 pays sur 28, que sont l'Allemagne (24,5%), l'Italie (14,2%), la France (9,6%), l'Espagne (7,7%), l'Angleterre (7,5%) et la Pologne (6,3%). La France se situe donc à la troisième place avec environ 9,6% de la valeur globale européenne, ce qui représente 4,8 millions de tonnes en 2016. Les grands domaines d'utilisation des plastiques sont au nombre de cinq : l'emballage, le bâtiment/construction, l'automobile, la fabrication d'appareils électriques/électroniques et le reste des autres utilisations comme le montre la **figure 1.2**.



Figure 1.2: La consommation européenne de matières plastiques, en fonction du type de polymère et des grands domaines d'utilisation en 2016 (source: PlasticsEurope, 2017)

En ce qui concerne l'Europe, les trois domaines d'utilisation des plastiques prépondérants sont l'emballage, le bâtiment/construction et l'automobile qui représentent respectivement 39,9%, 19,7% et 10%. A titre d'exemple, à cause des propriétés de légèreté des plastiques, de nombreux véhicules de transport public ou privé sont constitués de plastiques. C'est le cas de l'avion 'Dreamline' de Boeing qui a été conçu avec près de 50% de matières plastiques (Andrady and Neal, 2009). Ces auteurs ont aussi évalué à près de 20% la proportion de plastiques dans les bâtiments et les constructions au niveau mondial. En fonction des grands domaines considérés, les types de plastiques utilisés ne sont pas les mêmes. Les PE, les PP et les PET sont principalement utilisés dans les emballages, alors que pour le bâtiment/construction, c'est le PVC qui prédomine. Les autres utilisations du plastique sont liées à la présence de PP mais aussi à d'autres types de plastiques non mentionnés dans la figure. Les « big six » se retrouvent majoritairement utilisés dans tous les domaines confondus, comme le montre également la figure 1.3 qui illustre la distribution des types de matériaux plastiques utilisés à l'échelle européenne, avec quelques exemples d'objets correspondants. Le fait que près de 40% des matières plastiques utilisées concernent les emballages (figure 1.2) et en lien avec un temps d'utilisation relativement court. Près de la moitié de ces plastiques n'ont qu'une seule utilisation avant de devenir des déchets (Hopewelle et al., 2009).

La consommation en matériaux plastique porte parfois sur des objets de taille micrométrique puisque des microplastiques (MP) sont directement utilisés dans certains produits du quotidien : des cosmétiques, du dentifrice, des gels douche, des produits ménagers, etc. (Arthur et al., 2009; Chang, 2015; Fendall and Sewel, 2009). Leur ajout peut représenter 0,5 à 12% du produit final (Duis and Coors, 2016). La plupart de ces MP sont sous forme de « pellets », de granulés ou de sphères de géométrie régulière (Chang, 2015; Napper et al., 2015), avec une prédominance de PE dans la composition de ces MP, qui représente en général près de 93% (Gouin et al., 2015). Leur couleur est souvent blanche ou bleue (Napper et al., 2015) et présentent une taille plutôt inférieure à 300 µm (Chang, 2015 ; Napper et al., 2015). La quantité de micro-granulés de plastique rejetés chaque jour dans les réseaux des eaux usées a été évaluée à environ 8 billions de MP aux Etats-Unis (Rochman et al., 2015a). Plus récemment, Boucher et Friot (2017) ont estimé à environ 1,5 millions de tonnes la quantité de MP directement déversée sous cette forme dans les mers et les océans par an et dans le monde. C'est la raison pour laquelle certains pays comme les Pays-Bas, l'Allemagne, le Canada, les États-Unis, l'Angleterre, ont limité, voire interdit, leur utilisation dans les produits cosmétiques (Xanthos and Walker, 2017). En France, cette interdiction date du 1er janvier 2018 dans le cadre de la loi Biodiversité.



Figure 1.3: Distribution des types de plastiques utilisés en Europe en 2013 avec des exemples d'objets fabriqués à partir de ces matières (source : PlasticsEurope 2014)

I.1.6 Recyclage et valorisation des déchets plastiques au niveau européen

Le pourcentage de recyclage des déchets plastiques varie selon les pays. Au niveau européen, près de 69% des déchets plastiques ont été récupérés en 2014 parmi les 25,8 millions de tonnes générées cette année-là. Au total, 30% ont été recyclés et 40% ont été valorisés sous forme énergétique. Les 30% restants ont été mis en décharge, ce qui représentait tout de même un peu moins de 10 millions de tonnes dans l'année. (PlasticsEurope, 2015). Il faut souligner que l'évolution de la valorisation des déchets plastiques est plutôt positive ces dernières années avec des efforts réalisés à tous les niveaux, du producteur au consommateur. Entre 2006 et 2014, la part du recyclage a augmenté de 64%, la valorisation énergétique de 46%, faisant ainsi diminuer la mise en décharge de 38% (PlasticsEurope, 2015). Parmi les pays européens, l'Allemagne se place en tête pour le pourcentage de recyclage des déchets, atteignant 38% en 2014 alors que c'est la Suisse la mieux placée en termes de valorisation énergétique avec une valeur de 75%. Parallèlement, la Suisse et l'Autriche sont les deux meilleurs exemples européens avec seulement 1% de leurs déchets plastiques mis en décharge (PlasticsEurope, 2015). Ces deux derniers pays, ainsi que les Pays-Bas, la Suède, le Danemark, le Luxembourg, la Belgique, la Norvège et la Finlande, en Europe ont d'ailleurs interdit la mise en décharge des déchets plastiques, les obligeant à les recycler ou à les valoriser au maximum. Pour ce qui est de la France, en 2014, les pourcentages de recyclage, valorisation énergétique et de mise en décharge ont été respectivement de 22%, 41% et 37%. Le taux de recyclage des déchets plastiques positionne la France en-dessous de la moyenne européenne. Les emballages représentent 62% des déchets plastiques totaux. Leur prise en compte dans les politiques de valorisation des déchets plastiques est donc primordiale. Les pourcentages d'emballages valorisés sont proches au niveau européen et français avec des valeurs de 70% et 67% respectivement. Si la part du recyclage est équivalente à la part de la valorisation énergétique en Europe (35% chacun), en France la valorisation énergétique est privilégiée (42%) par rapport au recyclage (25%). Par ailleurs, ces emballages sont recyclés et valorisés à plus de 95% dans de nombreux pays européens : l'Autriche, le Luxembourg, l'Allemagne, la Suisse, le Danemark, la Belgique, les Pays Bas et la Norvège.

La valorisation des déchets plastiques dépend des pays et des types de déchets, comme cela vient d'être discuté, mais elle dépend aussi du type de plastique. Les polyoléfines (LDPE, HDPE, PP) sont plus recyclées que les autres polymères car le procédé mis en œuvre pour les réutiliser est plus simple (Hopewell et al., 2009). En ce qui concerne le PET, principalement utilisé dans la fabrication des bouteilles plastiques, la collecte, en vue du recyclage, est

quasiment entrée dans les mœurs, atteignant près de 60 milliard de bouteilles au niveau européen en 2012, dont 7 milliard pour la France. Une importante voie de recyclage du PET est la transformation en fibres textiles. D'après Andrady and Neal (2009), plus de 40 million de tonnes de matériau plastique ont pu être valorisés de cette façon-là. Pour ce qui est des PS, le PSE est le principal matériau recyclé. Enfin, même si le PVC était considéré comme un matériau non recyclable avant des années 2000, sa masse recyclée tend à augmenter d'année en année, passant de 444 468 à 568 696 tonnes entre 2013 et 2016 en Europe (69 000 tonnes pour la France en 2015), ce qui représente environ 11% du PVC produit (Kunststoffe International, 10-2016 ; PlasticsEurope, 2017). Les propriétés thermiques des plastiques vont également mener à des voies de recyclage différentes puisque les thermoplastiques pourront être remoulés puis réutilisés alors que cela ne sera pas possible pour les plastiques thermodurcissables.

Lors de la mise en décharge, mais aussi au cours de la collecte et du stockage des déchets plastiques en vue de leur valorisation, de grandes quantités peuvent se retrouver rejetés dans l'environnement. Ces rejets, associés à un long temps de dégradation, donnent un caractère omniprésent aux déchets plastiques dans l'environnement. Ainsi, ils atteignent tous les compartiments environnementaux, et notamment les écosystèmes aquatiques marins.

I.1.7 Pollution des écosystèmes marins par les déchets plastiques

La pollution des écosystèmes marins par les déchets plastiques est observée depuis les années 1970. Les premiers rapports montraient la présence de déchets dans les eaux de surface en Europe et en Américain du Nord (Buchanan, 1971; Carpenter and Smith, 1972). Par la suite, les déchets plastiques ont été retrouvés dans les sables du littoral et les sédiments (Gregory, 1977; 1983). L'ingestion par les animaux marins et la sédimentation ont aussi été mis en évidence. L'impact des déchets plastiques sur les animaux marins a été rapporté par de nombreuses études, dès la fin des années 1980 (Azzarello and Van-Vleet, 1987; Laist, 1987, 1997; Derraik, 2002). Étant données les énormes quantités de plastiques utilisées et le manque de gestion des déchets, la question de leur devenir dans l'environnement marin a été soulevée par les scientifiques au fur et à mesure des années. L'importante accumulation de plastiques dans la gyre océanique du Pacifique Nord a été découverte par Charles Moore en 1997. Par la suite, les déchets plastiques ont été quantifiés dans cette zone (Goldstein et al., 2012 ; 2013 ; Moore et al., 2001). Plus de 300 000 déchets ont été dénombrés par km² d'eau de surface, correspondant à plus de 5 kg de plastique (Moore et al., 2001). Du fait des courants marins et des vents, les gyres océaniques sont des zones privilégiées d'accumulation des déchets (Eriksen

et al., 2014) qui constituent des sites d'études intéressants. Il existe quatre autres gyres océaniques à la surface du globe (Pacifique Sud (Eriksen et al., 2013), Atlantique Nord et Sud (Ter Halle et al., 2017; Law et al., 2010; Resisser et al., 2015) et celle de l'océan Indien (Cozar et al., 2014) comme le montre la **figure 1.4**. Elles ont également été étudiées, afin d'évaluer les quantités de déchets présents, notamment les déchets plastiques. En terme de quantité, la valeur maximale déterminée atteint plus de 6 millions de particules par km², dans la gyre océanique du Pacifique Nord (Golstein et al., 2013), qui est donc reconnue comme la zone la plus contaminée par des déchets plastiques, dans le monde (Cozar et al., 2014). Concernant l'impact sur les animaux marins, les oiseaux ont été les premiers étudiés, avec la mise en évidence d'ingestion d'objets en plastiques. Puis, ces observations se sont poursuivies sur de nombreuses autres espèces marines, de manière qualitative mais aussi quantitative. À ce jour, 395 espèces, représentées par plus de 44 000 individus, ont montré des ingestions et des enchevêtrements, mettant en cause des débris plastiques (Gall and Thompson, 2015). Les animaux marins les plus étudiés sont les tortues, les poissons, les oiseaux et les mammifères (Laist, 1997). L'enchevêtrement des organismes par des objets plastiques mène en général à des blessures, des prises au piège ou des novades. Tout comme l'enchevêtrement, l'ingestion de débris plastiques est également préjudiciable aux animaux, car cela peut provoquer des blessures physiques, l'obstruction du système digestif et une diminution de la prise alimentaire. À plus long terme, des effets peuvent également être observés sur la capacité de reproduction, le génome, l'immunité, etc.



Figure 1.4 : Concentrations en déchets plastiques à la surface des océans (d'après Cozar et al., 2014).

Les conséquences de l'enchevêtrement et de l'ingestion de débris plastiques observées sur les animaux marins sont répertoriées dans le **tableau 1.2** ci-après.

	Espèce animale	Type de déchet	Impact	Référence
	Oiseau	Emballage, filet	Mort	Fowler, 1987
	Oiseau	Emballage, filet	Réduction de la taille	Fowler, 1987
	Oiseau	Emballage, matériel pêche	Blessure dermique	Croxall et al., 1990
	Lamantin	Filament, sac	Mort	Beck and Barros, 1991
	Phoque gris	Filament, filet, corde	Constriction	Allen et al., 2012
	Baleine	Fil de plastique	Blessure dermique	Woodward et al., 2006
	Éléphant de mer	Filament, matériel pêche	Blessure dermique	Campagna et al., 2007
	Baleine	Fil de plastique	Blessure dermique	Winn et al., 2008
Enchevêtrement	Oiseau	Matériel pêche	Blessure externe	Dau et al., 2009
	Phoque	Matériel pêche	Blessure externe	Dau et al., 2009
	Oiseau	Matériel de pêche	Mort	Moore et al., 2009
	9 mammifères	Matériel de pêche	Mort	Moore et al., 2009
	Invertébré	Filet à mailles	Mort	Good et al., 2010
	Poison	Filet à mailles	Mort	Good et al., 2010
	Oiseau	Filet à mailles	Mort	Good et al., 2010
	4 mammifères	Filet à mailles	Mort	Good et al., 2010
	Corail mou	Fil de pêche	Cassure	Pham et al., 2013
	Tortue marine	Matériel de pêche	Mort	Vélez-Rubio et al., 2013
	Oiseau	« pellets », mousse	Désordres biochimique et cellulaire	Connors and Smith, 1982
	Oiseau	Fragments	Obstruction intestinale	Fry et al., 1987
	Lamantin	Filament, sac	Mort	Beck and Barros, 1991
	Torture marine	Filament, matériel de pêche	Obstruction intestinale, mort	Bjorndal et al., 1994
Ingestion	Torture marine	Sac, corde	Obstruction intestinale, mort	Bugoni et al., 2001
	Oiseau	Matériel de pêche	Blessure	Dau et al., 2009
	Phoque	Matériel de pêche	Blessure	Dau et al., 2009
	Grand cachalot	Matériel de pêche	Obstruction intestinale, mort	Jacobsen et al., 2010
	Manchot	Matériel de pêche	Mort	Brandao et al., 2011
	Oiseau	« pellets »	Perforation intestinale	Carey, 2011
	Torture marine	Débris	Obstruction d'intestin	Vélez-Rubio et al., 2013

Tableau 1.2: Conséquences de l'enchevêtrement et de l'ingestion de déchets plastiques observées sur les animaux marins (d'après Law, 2017).

Une fois dans le milieu marin, les déchets plastiques sont susceptibles de contaminer les écosystèmes par leur présence, le relargage d'additifs potentiellement toxiques pour les organismes. Ils peuvent également sorber des contaminants environnementaux organiques ou métalliques et se fragmenter sous l'effet des conditions physiques et chimiques des milieux. Cette fragmentation en des particules de plus petites tailles engendre l'apparition de MP. Cela ouvre donc un grand champ d'investigation en écotoxicologie.

I.2 Les microplastiques

I.2.1 Définition

Le terme de 'microplastique' (MP) a été utilisé pour la première fois par Thompson et al., en 2004, comme hypothèse de 'disparition' des macrodéchets plastiques en mer. Par la suite, cette hypothèse a beaucoup attiré l'attention des chercheurs en raison de l'urgence face à la contamination en plastiques de notre planète. Des définitions des MP ont été proposées par plusieurs auteurs et sont principalement basées sur la taille des particules. Les MP ont été définis comme étant des particules de plastique ayant une taille inférieure à 1 mm par certains (Browne et al., 2010 ; Claessens et al., 2011 ; Dekiff et al., 2014), inférieurs à 2 mm par d'autres (Ryan et al., 2009) mais aussi entre 2 et 6 mm (Derraik, 2002), voire inférieurs à 10 mm également (Graham and Thompson, 2009). Actuellement, la communauté scientifique s'accorde sur une taille maximum des MP de 5 mm, comme proposé par Arthur et al. en 2009. Pour ce qui est de la taille minimale des MP, là encore différents auteurs ont proposé différentes tailles : 1,6 µm (Ng and Obbard, 2006), 38 µm (Claessens et al., 2011), 50 µm (Martins and Sobral, 2011), 315 µm (Matsuguma et al., 2017). Ces choix ont principalement été motivés par les techniques d'échantillonnage, de préparation et d'analyse des MP. La directive Cadre Stratégie pour le milieu marin (DCSMM) a établi également des définitions en 2013 (Galgani et al., 2013) avec des tailles inférieures à 1 µm pour les nanoplastiques, entre 1 µm à 5 mm pour les MP, entre 5 à 25 mm pour les mésoplastiques et, enfin, supérieures à 25 mm pour les macroplastiques.

I.2.2 Sources des microplastiques dans l'environnement

Il existe deux principales sources de MP dans l'environnement, appelées primaires et secondaires (Andrady, 2011; Cole et al., 2011). La source primaire correspond aux MP utilisés dans des produits du quotidien et qui se retrouvent déversés dans l'environnement. Comme cela a été présenté dans la partie sur les utilisations des plastiques, certains sont directement utilisés sous une taille micrométrique à millimétrique par les industriels pour des produits cosmétiques ou ménagers par exemple (Napper et al., 2015). Les industriels peuvent utiliser des granules de plastiques, des microfibres, pour la confection de textiles, ou des microbilles dans des produits du quotidien (dentifrice), des cosmétiques (crèmes exfoliantes, soins du visage et du corps), des produits ménagers, des encres, des peintures, etc.

La source secondaire des MP dans l'environnement correspond à la fragmentation des déchets plastiques (Barnes et al., 2009 ; Thompson et al., 2009). Les processus de fragmentation des plastiques dans l'environnement est en cours d'étude et dépend du déchet plastique et de sa composition. Différents phénomènes physiques, chimiques et biologiques sont mis en jeu dans la fragmentation des débris plastiques, tels que la photo-dégradation, l'oxydation, les variations de température, l'hydrolyse et la biodégradation, même si cette dernière reste probablement limitée, en fonction de la nature des polymères (Andrady, 2011). La vitesse de fragmentation dépend de la stabilité des matières plastiques et de la combinaison des actions physico-chimiques et biologiques qu'elles subissent. Ce processus est donc plus ou moins prolongé et peut durer de nombreuses années.

Les gyres océaniques où s'accumulent les déchets, comme évoqué plus haut, constituent des sources secondaires majeures de contamination en MP (Goldstein et al., 2012). La **figure 1.5** montre que les pourcentages de taille de particules inférieures à 5 mm, autrement dit les MP, sont toujours prédominants au niveau des gyres océaniques.



Figure 1.5 : Illustration de la distribution en taille des déchets plastiques dans les gyres océaniques (source : Cozar et al., 2014)

En effet, pour une concentration moyenne de 26 836 particules/km² évaluée au niveau de la gyre océanique du Pacifique Sud, les particules comprises entre 333 μ m à 4,75 mm occupaient jusqu'à 91% des particules recensées (Eriksen et al., 2013). Un résultat similaire (95%) a été obtenu dans l'étude de Moore et al. (2001) pour la gyre du Pacifique Nord. Concernant les teneurs en MP dans les gyres océaniques, elles peuvent atteindre jusqu'à 250 000 MP/km² et 448 000 MP/km² respectivement pour l'Atlantique Nord (Ter Halle et al., 2017) et le Pacifique Nord (Goldstein et al., 2013).

I.2.3 Devenir des microplastiques dans l'environnement

Sous une taille micrométrique, les plastiques vont se distribuer différemment dans le milieu marin en fonction de différents facteurs : les caractéristiques du site, la saison, la marée et les courants maritimes. La nature du polymère des MP va également avoir une importance dans le devenir des MP. En effet, les MP constitués de polymères de densité inférieure à celle de l'eau auront tendance à flotter à la surface des eaux (PE, PP, PSE) alors ceux constitués de polymères plus denses (PET, PVC) seront susceptibles de sédimenter. Cette répartition est toutefois théorique puisque certains MP constitués de polymères peu denses se retrouvent dans les sédiments par augmentation de leur masse lors de la colonisation biologique ou de la sorption de matières organiques. A l'inverse, des MP de plastiques plus denses peuvent être collectés

en surface, car leur taille micrométrique, leur forme et leur surface spécifique peuvent les amener à se retrouver dans la colonne d'eau ou en surface. La possibilité que présentent les MP de flotter et/ou de sédimenter font qu'ils vont se retrouver dans tous les compartiments environnementaux. Ils pourront également se déplacer sur de longues distances. Par conséquent, ils peuvent être retrouvés du pôle Nord au pôle Sud, dans tous les écosystèmes marins. En fonction de la localisation des MP dans la colonne d'eau, en surface ou dans les sédiments, diverses espèces marines sont exposées, comme le montre la **figure 1.6** et sont potentiellement capables de les accumuler.



Figure 1.6 : Exposition des espèces animales marines aux MP (source: Lusher, 2015)

L'évaluation de la contamination de l'environnement est primordiale et nécessite la mise au point de procédures d'analyse. De nombreuses études récentes se sont penchées sur ces problématiques. Plusieurs méthodes d'échantillonnage, de préparation d'échantillon et

d'analyse sont rapportées dans la littérature, en fonction du compartiment marin étudié : eaux, sédiments et organismes.

I.2.4 Procédures d'analyse des microplastiques dans les compartiments environnementaux

L'évaluation de la contamination des milieux marins au niveau des eaux, des sédiments ou des organismes nécessitent plusieurs étapes : l'échantillonnage, la préparation d'échantillon et la caractérisation des MP comme l'illustre la **figure 1.7**.



Figure 1.7 : Démarche utilisée pour l'analyse des MP dans les milieux marins (Ivleva et al., 2017)

Pour chacune des étapes, plusieurs protocoles ont été utilisés, et sont dépendants du compartiment étudié, des outils employés et de la question posée en termes de recherche.

I.2.4.1 Echantillonnage

La première étape de l'évaluation de la contamination environnementale par les MP est l'échantillonnage. Elle est dépendante de l'objet d'étude. Pour les échantillons d'eau, que ce soit en surface, dans la colonne ou dans le fond, le matériel utilisé est le filet Manta. Il en existe différents types en fonction de la profondeur d'étude souhaitée. Des flacons peuvent aussi être utilisés pour réaliser des prélèvements d'eau, afin de filtrer directement l'échantillon sur un filtre à membrane ou à l'aide de tamis présentant différentes mailles. Le but est de retenir les particules à analyser. Afin d'obtenir des résultats représentatifs, de grandes quantités d'eau ou de surface développées par les filets sont souvent nécessaires pour cette étape. L'utilisation d'un filet, ou la filtration des échantillons aqueux, présentent des avantages et des inconvénients. Les filets possèdent une maille relativement grande, entre 300 et 390 µm, ce qui permet de les utiliser sur de grandes distances, en les charriant avec un bateau, sans qu'ils soient colmatés. Ainsi, les surfaces étudiées, ou les volumes d'eau correspondants, sont considérables, ce qui représente un avantage en termes de représentativité des résultats. L'inconvénient de cette technique est la limite basse de taille des MP collectés qui est élevée et qui ne répond pas complètement à la définition des MP. A l'inverse, l'échantillonnage des eaux à l'aide de flacons, en vue de leur filtration sur des filtres ou des tamis de petite maille, permet d'étudier les MP de plus petite taille, mais avec une représentativité des résultats plus relative.

Pour ce qui est de l'échantillonnage des sables ou des sédiments, il existe également plusieurs techniques d'échantillonnage, mettant en œuvre différents matériels. Une spatule ou une benne permettent de collecter le sédiment ou le sable. Néanmoins, certains facteurs doivent être pris en compte, comme le positionnement du point d'échantillonnage par rapport au marnage, la distance par rapport à la rive, la distance entre les points prélèvements, la profondeur, la masse prélevée, la masse analysée d'un échantillon, les réplicats, l'échantillonnage discret ou composite, etc.

Enfin pour les organismes marins, le matériel utilisé dépend des objets d'étude et de leur taille. Le phytoplancton ou le zooplancton peuvent être prélevés à l'aide de filets, directement en mer, ou filtrés, après collecte en flacon. Les espèces de plus grande taille sont généralement prélevées plus facilement sans nécessiter d'outil particulier le but étant d'obtenir une bonne représentativité de la contamination d'une population.

Si pour les organismes marins les moyens mis en œuvre pour l'échantillonnage changent peu d'une étude à l'autre, ce n'est pas le cas des eaux et des sédiments. L'emploi de différentes

techniques d'échantillonnage mène à des résultats difficilement comparables entre les études. Le premier facteur limitant la comparaison est l'expression des résultats, faisant intervenir plusieurs unités pour lesquelles la conversion reste difficile. Par exemple, des résultats de contamination des eaux ou de sédiments exprimés en quantité de MP par unité de surface ne peuvent pas être convertis par unité de volume ou de masse. La représentativité des résultats étant une problématique majeure dans l'évaluation de la contamination environnementale, des réplicats sont réalisés dans les études allant la plupart du temps de trois à six. Étant donnée la grande variabilité des résultats obtenus entre réplicats, ces nombres peuvent être éventuellement discutés. Dans ce contexte, tous les scientifiques s'accordent sur le fait qu'il existe un réel besoin de standardisation des méthodes et cela est vrai pour l'échantillonnage, mais également pour les autres étapes qui suivent, tout au long de la procédure d'analyse des MP.

I.2.4.2 Préparation des échantillons

Après l'échantillonnage, la difficulté suivante réside dans l'extraction de MP à partir de la matrice. Cette étape peut être plus ou moins facilement réalisable en fonction de la matrice. L'observation visuelle directe ou à l'aide d'un microscope peut être envisagée pour des MP de taille relativement grande, collectés dans les filets Manta. Lorsque les échantillons sont chargés en matières organique et minérale deux possibilités peuvent être envisagées : la digestion et/ou la séparation par sédimentation comme le montre le **tableau 1.3**. L'étape de sédimentation est quasiment incontournable et peut parfois intervenir à plusieurs reprises (Karami et al., 2017). Elle repose sur la différence de densité entre les MP et les constituants organiques ou minéraux de la matrice. Deux difficultés sont tout de même à prendre en considération pour l'extraction des MP. La première est la large gamme de densité des MP qui peut aller de 0,9 à 2,3 g.cm⁻³ (tableau 1.1) avec des valeurs supérieures ou proches de la densité de la matière organique (1,2 à 1,5 g.cm⁻³) ou des sédiments (globalement autour de 2,7 g.cm⁻³). L'autre repose sur le fait que d'autres facteurs peuvent jouer sur le comportement des MP lors de cette étape d'extraction qui sont : la taille micrométrique, les propriétés de la surface (hydrophobe), la tension superficielle, les interactions avec la matrice, la sorption de matières organiques ou le développement biologique en surface, etc. Pour pouvoir réaliser cette étape, l'utilisation de solutions salines de forte densité (NaCl ou NaI) combinée à des mécanismes physiques (agitation, décantation ou centrifugation) peut être un moyen pour améliorer la capacité de flottaison des MP, en fonction de leur densité.

Motrico	Etapes pour l'	extraction des MP	Déférences	
Maurce	Séparation	Digestion	Kelelences	
Eau*	NaCl saturé (1,20)**	-	Eriksen et al., 2013	
	NaCl 25% ***	H ₂ O ₂ 30%	Mathalon and Hill, 2014	
	NaCl saturé	$H_2O_2 \ 30\%$	Li et al., 2015	
	Na ₂ WO ₄ 70% (1,50)	KOH 10%	Dehaut et al., 2016	
	NaI (1,50)	KOH 10%	Karami et al., 2017	
	-	HCl 1 M, 2 M	Cole et al., 2014	
	-	HCl 12 M	Desforges et al., 2015	
Organismes	-	HNO ₃ 15,9 M	Desforges et al., 2015	
	-	NaOH 1 ; 2 et 10 M	Cole et al., 2014	
	-	Protéinase	Cole et al., 2014	
	-	HNO ₃ 69%	Van Cauwenberghe et al., 2015	
	-	HNO3 65% - HClO4 68%	De Witte et al., 2014	
	-	KOH 10%	Foekema et al., 2013	
	-	H_2O_2	Claessens et al., 2013	
	-	NaOH	Claessens et al., 2013	
	H ₂ O	-	Alomar et al., 2016	
	NaCl saturé	-	Thompson et al., 2004	
	NaCl saturé	H_2O_2	Tsang et al., 2017	
Sables of	NaI (1,42)	-	Graham and Thompson, 2009	
sédiments	NaI	H_2O_2	Matsuguma et al., 2017	
	CaCl ₂ (1,30-1,35)	-	Stole et al., 2015	
	$ZnCl_2$	-	Imhoff et al., 2013	
	ZnCl ₂ (1,50)	H_2O_2	Liebezeit and Dubaish, 2012	
	Na_2WO_4	-	Ballent et al., 2016	

Tableau 1.3 : Récapitulatif des étapes réalisées dans de récentes études pour l'extraction des MP à partir de différentes matrices.

(*) Eau filtrée à 333µm ; (**) Les valeurs entre parenthèses représentent la densité des solutions en g.cm⁻³ ; (***) Pourcentage exprimé en masse/volume.

Parmi les solutions salines de forte densité, la solution de NaCl saturée est la plus souvent utilisée, car elle présente le meilleur ratio efficacité/coûts. Elle est recommandée par le guide de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM). Récemment, des auteurs ont publié des travaux présentant des méthodes d'extraction des MP ne faisant pas appel à des solutions salines de forte densité mais à de l'huile de colza qui permet de séparer les MP de la matrice, grâce à ses propriétés de surface hydrophobes (Crichton et al., 2017). Le principal inconvénient réside dans l'étape de rinçage postérieure indispensable à une bonne identification des MP par spectroscopie.

Si l'étape de digestion n'est pas indispensable pour les échantillons de sable, de sédiments et d'eau (contenant peu de matière organique), elle l'est pour les échantillons biologiques. Les quantités de matière organique étant plus réduites dans les échantillons de sable et de sédiments que dans les organismes vivants, cette étape se fait souvent avant la séparation pour les échantillons biologiques et après pour les échantillons contenant peu de matière organique. L'étape de digestion peut faire intervenir différents réactifs comme des acides, des bases ou du

peroxyde d'hydrogène, mais elle peut aussi reposer sur des réactions enzymatiques (tableau 1.3). Les réactifs enzymatiques sont plutôt utilisés sur les planctons, les zooplanctons (Cole et al., 2014 ; Desforges et al., 2015 ; Loder et al., 2015) alors que les réactifs évoqués plus haut sont utilisés pour digérer les organismes entiers d'espèces de taille moyenne (bivalves, crustacé) ou bien le système digestif de poissons, d'oiseaux et de mammifères. Les différents acides retrouvés dans les études de la littérature (HCl, HNO₃, HClO₄) peuvent être utilisé seuls ou en mélange (Claessens et al., 2013 ; De Witte et al., 2014 ; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Ils ont montré une bonne efficacité de digestion, avec des valeurs moyennes de diminution de la matière organique autour de 95%. Parmi eux, l'HNO₃ présente une bonne efficacité, mais il présente différents inconvénients comme, par exemple, la destruction des nylons (Claessens et al., 2013). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ à 30%) a été utilisé tant sur les organismes que sur les sédiments. En 2014, Nuelle et al. ont rapporté un bon taux de minéralisation avec une diminution de la proportion de la matière organique de 90%. Utilisé sur des bivalves (Mathalon and Hill, 2014 ; Li et al., 2015 ; 2016), il a permis d'obtenir de bons recouvrements des MP dopés, même sous forme de filaments (Li et al., 2016). Néanmoins, un grand volume est généralement nécessaire : 200 mL pour 5 grammes de tissus frais. Deux bases apparaissent également dans les travaux de recherche : NaOH et KOH. Le KOH a été utilisé pour la première fois en 2013 par Foekema et al. dans l'évaluation de la contamination des poissons en MP. Ce réactif a ensuite été employé dans de nombreuses autres études car il montre de bonnes capacités de digestion des tissus animaux (Dehaut et al., 2016 ; Karami et al., 2017).

L'étape de digestion est indispensable lors de l'étude de la contamination en MP d'espèces marines, ou de leurs organes, lorsque leur taille est plutôt moyenne, mais reste encore inappropriée pour des tailles très importantes. L'adaptation des protocoles est encore à l'étude et jusqu'ici les travaux réalisés sur des organismes ou des organes de grande taille ont d'abord commencé par des dissections, puis par des des observations visuelles et microscopiques, afin d'extraire les particules, à l'aide de pinces, en vue de leur identification ultérieure. Une étape de rinçage pouvait éventuellement intervenir avant celle de la caractérisation. Bien que cette méthode soit simple est performante, elle reste néanmoins fastidieuse et ne permet pas d'étudier les MP qui seraient contenus à l'intérieur des tissus de l'organisme.

Une fois extraits de la matrice, les MP sont récupérés lors d'une étape de tamisage (pour les tailles les plus grandes) ou de filtration. Ces deux méthodes permettent de retenir les particules, en fonction de leur taille et de celle des mailles des tamis ou de la porosité des filtres utilisés.

Les échantillons de sables, de sédiments et d'eau peuvent être tamisés, dans un tout premier temps, afin de collecter les MP les plus gros. Dans ce cas, les mailles peuvent présenter plusieurs tailles allant de 0,04 à 4,75 mm, celle de 1 mm étant la plus souvent utilisée. Pour les plus petits MP, la filtration sous vide est privilégiée. Le choix du filtre à membrane à utiliser doit alors se faire en prenant en compte différents facteurs. Un petit diamètre permet de diminuer le temps d'identification mais peu limiter la filtration si l'échantillon est trop chargé en matière organique. Par ailleurs, une valeur de petite valeur de porosité permettra de retenir les plus petits MP mais posera également des problèmes, en cas de présence de matière organique trop abondante dans l'échantillon. Le choix de la porosité peut se faire également en prenant en compte la résolution des méthodes d'analyse des MP utilisées ultérieurement. Dans la littérature, des porosités de 0,22 μ m jusqu'à quelques dizaines de micromètres ont été rapportées, celle de 5 μ m étant la plus souvent décrite. La nature des filtres a également une grande importance et est surtout liée à la méthode d'identification des MP mise en œuvre par la suite. Par exemple, les filtres en nitrate de cellulose ne peuvent pas être utilisés en spectroscopie FT-IR en mode transmission car il absorbe le signal (Loder et al., 2015).

I.2.4.3 Caractérisation des microplastiques

La caractérisation est la dernière étape de la procédure d'analyse des MP. Elle est essentielle. Elle est généralement réalisée en deux temps : l'observation, visuelle ou microscopique, qui permet de déterminer la taille, la couleur et la forme des particules, puis l'identification, réalisée par analyse chimique spectrale ou chromatographique, qui caractérise la composition de la particule. Dans certains travaux (De Witte et al., 2014; Mathalon and Hill, 2014; Vandermeersch et al., 2015), l'étude des MP a été réalisée uniquement sur la base de l'observation visuelle macro- ou microscopique. Même si elle permet de déterminer certaines caractéristiques des particules, les scientifiques s'accordent sur le fait qu'elle est insuffisante car la détermination de la nature du polymère est impossible. En effet, de récentes études ont montré que l'identification visuelle macro- ou microscopique comme seul outil d'identification des particules mène bien souvent à des résultats erronés. Après l'identification, à l'aide de méthodes spectroscopiques, des particules préalablement identifiées au microscope comme des MP, un fort pourcentage n'en était finalement pas : 53% pour Dekiff et al. (2014), 59% pour Frere et al. (2017) et 83% pour Bergmann et al. (2017). Selon Santana et al. (2016), la lumière polarisée du microscope peut permettre l'identification de matériaux anisotropes, en différenciant les MP, du filtre, de la matière organique et des sédiments. Toutefois, même si la lumière polarisée permet de déterminer si la particule est du plastique, il est impossible de

caractériser le type de polymère. L'identification chimique des particules est donc indispensable. Cependant, de longs temps d'analyse et un équipement couteux sont souvent nécessaires. La microscopie électronique à balayage (couplée ou non à un micro analyseur à rayons et énergie dispersive) permet, par exemple, de connaître les éléments de surface, c'està-dire la composition chimique des plastiques, voire même la présence d'additifs (Eriksen et al., 2013; Fries et al., 2013; Vianello et al., 2013). La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est aussi une technique qui permet d'identifier les types de polymères utilisés (Fries et al., 2013). Cependant, ces deux dernières méthodes sont destructives. La spectroscopie est donc un outil de choix dans la caractérisation des MP. Deux méthodes sont possibles : la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la spectroscopie Raman. Elles sont toutes deux non destructives et utilisées depuis de nombreuses années dans l'analyse des polymères. À l'issue de l'analyse spectroscopique, un spectre est enregistré pour chacune des particules puis comparé à des spectres de référence de bibliothèques fournies ou vendues avec les appareillages, en vue de leur identification. Les bandes obtenues sur les spectres Raman ou FTIR renseignent principalement sur la nature des liaisons chimiques présentes dans les matériaux. La figure 1.8 montre la comparaison de spectres obtenus par ces deux méthodes spectroscopiques. Tandis que la spectroscopie FTIR est très bien adaptée pour observer la présence de liaisons polaires (i.e. groupements C=O) comme pour les polymères de la famille des polyesters (zones jaune et verte correspondant aux vibrations d'élongation de C=O à 1800-1740 cm⁻¹ et 1760-1670 cm⁻¹ sur le spectre de gauche de la **figure 1.8**), la spectroscopie Raman est plus adaptée aux liaisons de type de C-H ou C=C ce qui correspond plutôt aux composés aliphatiques et aromatiques (zone en vert correspondant aux vibrations de déformation aromatique à 1580-1640 cm⁻¹sur le spectre de droite de la **figure 1.8**). De plus, en spectroscopie FTIR un total de cinq zones permet d'évaluer et d'identifier les polymères alors qu'il en existe seulement trois en Raman. Les zones en bleu représentent des liaisons carbone-hydrogène à 1480-1400 cm⁻¹ et 2780-2980 cm⁻¹ en FTIR alors que seule la dernière peut être observée en Raman. Ces bandes correspondent respectivement à la vibration de déformation des CH₂ et à la vibration d'élongation des CH, CH₂ et CH₃. Enfin, la zone en rose représente la vibration d'élongation de CF₂ à 1174-1087 cm⁻¹ et 709-759 cm⁻¹ respectivement, pour la spectroscopie FTIR et Raman.



Figure 1.8: Comparaison des spectres de polymères obtenus en spectroscopie FTIR (à gauche) et Raman (à droite) (d'après Kappler et al., 2016)

En plus de leur spécificité spectrale, les spectroscopies Raman et FTIR présentent d'autres avantages et inconvénients l'une par rapport à l'autre. La spectroscopie Raman permet une meilleure résolution avec la possibilité d'analyser des particules de petite taille pouvant descendre jusqu'à 1 µm. Kappler et al. (2016) ont comparé le nombre de particules identifiées par les deux méthodes spectroscopiques pour cinq classes de tailles. Les résultats étaient identiques pour les 3 plus grandes classes de tailles (21 à 50 µm; 51 à 100 µm et 101 à 400 µm) mais la spectroscopie Raman était bien plus performante pour l'analyse des 2 plus petites (5 à 10 µm et 11 à 20 µm). La spectroscopie Raman présente aussi des inconvénients : une identification erronée des polyesters (sauf le PET), une focalisation parfois difficile sur les microparticules analysées de différentes tailles et une qualité des spectres dépendant des paramètres utilisés comme la qualité du laser, l'accumulation des mesures etc. La spectroscopie FTIR ne présente pas ces inconvénients-là et semble être reconnue comme étant la méthode la plus adaptée à l'analyse des MP puisqu'elle est largement utilisée dans la littérature. Ses points forts sont d'une part, sa rapidité d'analyse, environ 100 fois supérieure à l'analyse en Raman et, d'autre part, une plus grande base de données pour réaliser les comparaisons spectrales. L'analyse peut aussi être automatisée, sur une large surface de filtre (jusqu'à 10 x 10 cm) et il est possible de travailler selon trois modes différents : en transmission, en réflexion et en réflectance totale atténuée (ATR), ce qui ouvre de nombreuses perspectives pour l'analyse des particules, en fonction de la nature des échantillons. En fonction du mode d'acquisition des spectres, la nature du filtre choisi doit être adaptée, tout comme les seuils d'exigence vis-à-vis de l'adéquation entre le spectre mesuré et celui de référence (score de la recherche). Le temps

d'analyse spectroscopique d'un seul filtre reste relativement grand et est supérieur à plusieurs heures. Afin de le limiter, plusieurs méthodes sont présentées dans la littérature. Certains auteurs (Ballent et al., 2016 ; Graca et al., 2017 ; Martins and Sobral, 2011) comptent la quantité de particules retenues sur le filtre puis en sélectionnent quelque unes afin de les identifier. Le ratio MP/ particules analysées est ensuite appliqué à l'ensemble des particules comptées mais le risque d'erreur lié à l'approximation est grand. D'autres auteurs (Vianello et al., 2013) n'ont analysé qu'une partie du filtre puis ont extrapolé le résultat à la surface totale de celui-ci. Là encore, le risque d'erreur reste grand car la surface d'un filtre n'est pas homogène.

Toujours dans le but de limiter le temps d'analyse des filtres, une autre méthode a été mise au point récemment. Cette méthode repose sur l'utilisation de rouge de Nile qui va permettre de rendre les MP fluorescents à la lumière UV et donc de faciliter la visualisation et l'analyse par spectroscopie. Elle a été utilisée pour des échantillons de sédiments (Maes et al., 2017) et d'eau de surface (Enri-Cassola et al., 2017). Les questions qui restent en suspens pour cette méthode sont l'effet de la colonisation microbienne des MP sur l'adsorption du rouge de Nile et son application à tous les types de plastiques. De plus, il semble peu probable qu'elle puisse être utilisée pour des échantillons biologiques, du fait de la grande quantité de matière organique.

I.2.4.4 Assurance qualité et contrôle qualité

L'assurance qualité et le contrôle qualité sont des gages de qualité d'une procédure analytique, même s'ils sont encore trop absents de nombreuses études sur les MP (Hanvey et al., 2017). Dans un premier temps, il semble essentiel d'éviter toute contamination croisée ou perte de contaminants, du début à la fin de la procédure, pour éviter une sur- ou sous-estimation de la contamination. Pour cela, de nombreuses précautions doivent être prises. Lors de l'échantillonnage et de la conservation des échantillons, il est préférable d'utiliser des contenants hermétiques qui ne soient pas constitués de plastiques, même si aucune étude n'a montré de contamination croisée due à la conservation dans des récipients en matériau plastique. Le plastique étant un matériau relativement résistant à la dégradation, quelle qu'elle soit, la phase de conservation des échantillons ne présente pas un réel risque de détérioration de ce type de contaminant. Néanmoins, il est préférable que cette phase soit réalisée à faible température, pour éviter la prolifération des microorganismes qui conduirait à une augmentation de la matière organique. Le temps de conservation peut être variable, allant de quelques jours à plusieurs années. Van Franeker et al. (2011) a conservé ses échantillons plusieurs années, sans qu'ils soient altérés. Pendant les phases d'extraction et de filtration, il faut limiter le contact des échantillons/solutions avec l'air ambiant, qui peut contenir des MP

(Dris et al., 2016), ou avec toute autre source de MP, comme les vêtements (Torre et al., 2016). Cela est notamment possible en travaillant sous hotte à flux laminaire, en rinçant bien, au préalable, le matériel de laboratoire, en portant des gants, une blouse, etc. Puis, la conservation des filtres doit se faire dans les boîtes de pétri, en verre par exemple, jusqu'à l'analyse. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination croisée, il est indispensable de réaliser des blancs en parallèle des échantillons, en appliquant le même protocole. La validation des procédures analytiques devrait être une étape systématique dans la mise au point de protocoles. Elle repose sur le dopage d'échantillons à l'aide de MP de différentes tailles, formes et couleurs, par exemple (Claessens et al., 2013 ; Li et al., 2016). De bons recouvrements des MP à l'issue des différentes procédures montrent la qualité de celles-ci et l'applicabilité de la méthode. Certaines limites existent, lors de cette phase de validation, à savoir le choix des MP à utiliser (type, taille, forme, couleur, etc.) et le mode de dopage permettant d'assurer l'ajout d'un nombre précis de MP, indispensable au calcul de recouvrement.

Une fois les procédures analytiques développées et mises au point, la quantification et la qualification des MP trouvés dans des matrices environnementales sont alors possibles. Galgani et al. (2013) ont proposé des classes de couleurs et de formes pour présenter les paramètres qualitatifs des MP alors que les classes de tailles varient en fonction des études, notamment à cause de la méthode d'analyse utilisée. La contamination en MP du milieu marin peut donc être caractérisée plus en détail par les scientifiques, grâce aux avancées en termes de méthodologies.

I.2.5 Contamination en microplastiques dans le milieu marin

L'objectif de cette partie de l'état de l'art est de traiter de la contamination en MP du milieu marin, à l'échelle mondiale, en incluant les compartiments aquatiques, sédimentaires et biologiques. Cet objectif était également celui de la deuxième partie de la revue d'articles présentée ci-après, qui a été publiée dans le journal « Environmental Pollution » en 2016. Il faut noter que le travail bibliographique nécessaire à cette revue s'est arrêté en Juillet 2015. Par conséquent, une actualisation des données jusqu'à février 2018 est proposée à la suite.

Environmental Pollution 211 (2016) 111-123



Review

Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments?*



Nam Ngoc Phuong ^{a, b}, Aurore Zalouk-Vergnoux ^{a, b, *}, Laurence Poirier ^{a, b}, Abderrahmane Kamari ^{a, b}, Amélie Châtel ^{a, b}, Catherine Mouneyrac ^{a, b}, Fabienne Lagarde ^c

^a Laboratoire de Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université de Nantes, Nantes F-44322, France

⁶ Université Catholique de l'Ouest, Angers F-49000, France
⁶ Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM, UMR CNRS 6283), Université du Maine, Avenu Olivier Messiaen, Le Mans F-72085, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 12 October 2015 Received in revised form 16 December 2015 Accepted 17 December 2015 Available online xxx

Keywords: Microplastics Field samples Laboratory exposures Ingestion **Biological** effects

ABSTRACT

The ubiquitous presence and persistency of microplastics (MPs) in aquatic environments are of particular concern since they represent an increasing threat to marine organisms and ecosystems. Great differences of concentrations and/or quantities in field samples have been observed depending on geographical location around the world. The main types reported have been polyethylene, polypropylene, and polystyrene. The presence of MPs in marine wildlife has been shown in many studies focusing on ingestion and accumulation in different tissues, whereas studies of the biological effects of MPs in the field are scarce. If the nature and abundance/concentrations of MPs have not been systematically determined in field samples, this is due to the fact that the identification of MPs from environmental samples requires mastery and execution of several steps and techniques. For this reason and due to differences in sampling techniques and sample preparation, it remains difficult to compare the published studies.

Most laboratory experiments have been performed with MP concentrations of a higher order of magnitude than those found in the field. Consequently, the ingestion and associated effects observed in exposed organisms have corresponded to great contaminant stress, which does not mimic the natural environment. Medium contaminations are produced with only one type of polymer of a precise sizes and homogenous shape whereas the MPs present in the field are known to be a mix of many types, sizes and shapes of plastic. Moreover, MPs originating in marine environments can be colonized by organisms and constitute the sorption support for many organic compounds present in environment that are not easily reproducible in laboratory. Determination of the mechanical and chemical effects of MPs on organisms is still a challenging area of research. Among the potential chemical effects it is necessary to differentiate those related to polymer properties from those due to the sorption/desorption of organic compounds. © 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plastics is a generic name encompassing most of the synthetic organic polymers exhibiting the property of plasticity. These products present many advantages: they are inexpensive, water and corrosion-resistant, chemically inert, easily molded, and they exhibit good thermal and electrical insulating properties. All these features explain why they are massively used in our daily lives. Since the mid-20th century, several million tons of plastics have

This paper has been recommended for acceptance by Klaus Kummerer.

been produced (Thompson et al., 2009) and in 2013, worldwide plastic production was estimated at 288 million tons (Free et al., 2014). Whilst the societal benefits of plastic are undeniably farreaching (Andrady and Neal, 2009), this valuable commodity is nonetheless the subject of increasing environmental concern. Indeed, plastics present many disadvantages: being nonrenewable resources and sources of contamination by additive compounds; undergoing embrittlement at low temperatures and deformation under loads; going through a costly recycling process; being highly resistant to degradation, etc. It has been estimated that ten percent of the plastics produced end up in the ocean. Jambeck et al. (2015) recently made the approximate calculation that in 2010 alone, 4.8 to 12.7 million metric tons of plastic wastes entered the ocean and pointed out that a steady increase is to be expected in the coming

^{*} Corresponding author.

E-mail address: aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr (A. Zalouk-Vergnoux).

http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.035 0269-7491/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

years. After less than a century of existence, plastic debris already represent from 60 to 80% of marine litter depending on the locations investigated (Derraik, 2002). Once in the environment, macrodebris undergo mechanical (erosion, abrasion), chemical (photooxidation, temperature, corrosion) and biological (degradation by microorganisms) actions (Andrady, 2011; Costa et al., 2010; Zettler et al., 2013). These different degradation processes lead to their fragmentation into microplastics (MPs), which accumulate in the environment.

The term of MP was initially suggested by Thompson (Thompson et al., 2004). The size defining MPs varies according to authors with diameters of >1.6 μ m (Ng and Obbard, 2006) and <1 mm (Browne et al., 2007, 2010; Claessens et al., 2011), <2 mm (Ryan et al., 2009), 2–6 mm (Derraik, 2002), <5 mm (Barnes et al., 2009), <10 mm (Graham and Thompson, 2009). Nowadays, most researchers agree with the definition of MPs proposed by Arthur et al. (2009) of MPs as particles in a size range of less than 5 mm. Those originating from the fragmentation of larger plastic items are defined as secondary MPs whereas primary MPs include all microsized particles entering the environment: such as fibers, industrial pellets and microbeads from cosmetics, for example (Andrady, 2011).

Whatever the definition of their size, MPs represent a very broad range of polymers. The most commonly used plastic materials are polyethylene (PE), PP, polyvinyl chloride (PVC), PS and polyethylene terephthalate (PET). They represent approximately 90% of the total world production (Andrady and Neal, 2009) and, as non-biodegradable polymers, they are expected to be among the most widely represented in sampled MPs. What happens to them in the environment will probably differ according to their chemical nature and physical properties. Being buoyant in water; PE and PP, float in seawater, mainly affect ocean surface and deposit ashore (Engler, 2012; Thompson et al., 2009) whereas PVC, which is denser than seawater, affects seabed, often next to the source (Engler, 2012). According to the most recent ten years of research, it appears that all natural habitats from pole to pole are affected by the presence of MPs (Wright et al., 2013).

The ubiquitous presence and persistency of MPs in aquatic environments are of particular concern since they represent an increasing threat to marine organisms and ecosystems. To evaluate this threat and the potential impacts of MPs on aquatic organisms, a number of laboratory experiments have been performed over recent years to mimic exposure (Nobre et al., 2015; Van Cauwenberghe et al., 2015). The global aim of this review is to compare the available literature data on MPs (size, form, quantity or concentration) having been sampled around the world with those having been employed in laboratory experiments. In this paper, we try to answer the following questions: i) Which MPs are found in the different environmental compartments (water, sediment, biota) of the marine ecosystems? ii) What are the laboratory conditions of exposure and putative ingestion of MPs by organisms, as well as their biological transfer and trophic transfer? iii) Are experimental laboratory exposures indeed consistent with this exposome? iv) Do the toxicity effects reported on a wide range of aquatic organisms actually reflect environmental reality?

2. Which MPs are found in the different environmental compartments?

2.1. MPs in marine waters

Due to their small size and capacity to float on the surface of seas and oceans, MPs are distributed in all marine ecosystems. At least 29 marine areas in the world have been investigated (detailed in Table 1).

Differences between sites are observed in MP concentrations and/or quantities. The Pacific Ocean is the most widely sampled area. When comparable, the measured concentrations in this ocean vary from almost 27,000 (Eriksen et al., 2013) to 448,000 (Goldstein et al., 2013) particles per km² and from 0.004 (Doyle et al., 2011) to 9200 (Desforges et al., 2014) particles per m³. This uneven distribution is partially accounted for by the well-known zone of concentration in the North Pacific Central Gyre, where the large-scale presence of plastic debris has previously been highlighted. Indeed, several studies have shown that quantities and distributions of MPs are pronouncedly dependent on geophysical processes (wave, wind, water current; Goldstein et al., 2013; Wright et al., 2013). For example, the highest densities of MPs were detected in the Northeast Pacific Ocean under low-wind conditions (Goldstein et al., 2013). In the Atlantic Ocean, all reported plastic concentrations have been significantly lower than in Pacific areas with only 1500 particles per km² (Law et al., 2010) and 2.5 particles per m (Lusher et al., 2014) in the most polluted zones. The Mediterranean Sea is another high spot of MP presence and a recent publication reported high levels of concentrations compared to the Atlantic Ocean (62,000 particles per km² for the lowest concentration; Collignon et al., 2014). Considerable research activity in the European zone has recently taken place since the Mediterranean Sea is a "closed sea" surrounded by urbanized areas, which may explain the high quantity of MPs (Cózar et al., 2015).

A reason other than geographic disparities for which it remains difficult to directly compare the reported MP concentrations/quantities is that the sampling techniques and analytical methodologies used in sample analysis are highly varied. For water samples, differences in sampling protocols lead to obvious difficulties of comparison between studies. Indeed, concentration data are usually expressed in terms of number of particles either by volume of filtered water (cubic meters) in the case of water pumping; or by area of waters covered (square meters) when using a trawl along a transect. The unit difference underlines the lack of standardized sampling methodology. Number of particles per km² implies that samples came mostly from water surfaces whereas particles per m³ are likely to correspond to water column sampling. Given the wide range of polymer densities, these differences in sampling depth will surely affect results in terms of both concentration and polymer nature, even though Carson et al. (2011) have shown that in the water column, 95% of small plastic debris were concentrated in the top 15 cm. For example, the use of trawl enables MPs to be sampled on large surface areas. On the other hand, while pumped samples are more representative of MP distribution in the water column, this is only the case at a sampling point. Moreover, as seen in a few recent studies, depending on the protocol used the mesh aperture of nets can vary from around 330 µm (the most commonly used so far) to less than 50 µm (Hidalgo-Ruiz et al., 2012). As high volumes of sieved water lead to a rapid clog the lowest sizes of mesh aperture are less frequently employed. In addition, extraction and analysis of particles smaller than 330 µm is more challenging (Desforges et al., 2014).

Despite differences of MP concentrations/quantities, and even though the MP type was mentioned in only 6 studies out of 25, differences in MP types can be noticed are apparent, since PE and PP fragments have been found in sea water samples from America and Australia, while PE and PS have been observed in Europe.

2.2. MPs in sediment/sand samples

It is well-known that sediments are the long-term ultimate sink for of contaminants (Chapman and Wang, 2001). Table 2 illustrates some examples of MPs reported in the sediment compartment over the last 40 years.

As it is shown in Table 2, America, Asia and Europe are the most

Table 1

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

113

Sampling contine	ent and area,	quantity or	concentration,	type or form	of MPs fo	ound in sea	water samples	s and reference	s of the corres	ponding studies.	į

Continent	Area	Quantity or concentration	Microplastics (type or form)	References	
America	Western North Atlantic	3500 particles/km ²	Pellets 2.5–5 mm	Carpenter and Smith (1972)	
	North Pacific Ocean	0.004-0.19 particles/m ³	Fragment predominant	Doyle et al. (2011)	
	Atlantic	<0.1 particles/m ³	Fragment predominant		
	South Pacific SG	26,898 pieces/km ²	Fragment predominant	Eriksen et al. (2013)	
	North Pacific SG	32.76 particles/m ³	Fragment predominant	Goldstein et al. (2012)	
	Equatorial Atlantic Ocean	0.01 particles/m ³	Fragment predominant	Ivar do Sul et al. (2013)	
	Southern Californian	3.92 items/m ³	Fragment predominant	Lattin et al. (2004)	
	North Atlantic Ocean	1534 pieces/km ²	PE + PP 99%	Law et al. (2010)	
	Caribbean Sea	1414 pieces/km ²	PE + PP 99%		
	North Pacific Gyre	2.23 particles/m ³	PP monofilament predominant	Moore et al. (2001)	
	North Pacific Central Gyre	334,271 fragments/km ²	Fragment 58.5%		
	Southern California	7.25 particles/m ³	Fragment 92.7-100%	Moore et al. (2002)	
	North Pacific offshore	0.43-2.23 particles/m ³	Fragment predominant	Moore et al. (2005)	
	North Pacific, inshore	5-7.25 particles/m ³			
	Pacific Ocean	370,000 particles/km ²	Fragment 92.6%	Shaw and Day (1994)	
	NE Pacific Ocean	8 to 9200 particles/m ³	Fibers 75%	Desforges et al. (2014)	
	Northeast Pacific Ocean	0.021-0.448 particles/m ²		Goldstein et al. (2013)	
Asia	Western Pacific Ocean	87,000 pieces/km ²	Fragment 56%	Yamashita and Tanimura (2007)	
	China	0.167 particles/m ³	Fibers, granules	Zhao et al. (2014)	
Australia	Australia	4256-8966 pieces/km ²	PE + PP 98.5%	Reisser et al. (2013)	
Europe	North Sea	50-100 fibers/l	Fibers predominant	Buchanan (1971)	
	Mediterranean Sea	0.116 particles/m ²	Filaments, PS	Collignon et al. (2012)	
	Italian coast	0.62 particles/m ³	Plastic fragment	Fossi et al. (2012)	
	Plymouth, UK	<0.04 pieces/m ³	Plastic fibers	Thompson et al. (2004)	
	French-Belgian-Dutch	0.1-0.7 particles/l	LDPE, HDPE and PS predominant	Van Cauwenberghe et al. (2015)	
	Mediterranean-Corsica	6.2 particles/100 m ²	Filaments, PS	Collignon et al. (2014)	
	Northeast Atlantic Ocean	2.46 particles/m ³	Plastic fibers > 80.3%	Lusher et al. (2014)	
	Mediterranean Sea	243,853 items/km ²	Fragment 87.7%	Cozar et al. (2015)	
	Western Mediterranean	0.15 items/m ³	Foam, filament, pellet	Lucia et al. (2014)	

Table 2

Sampling continent and area, quantity or concentration, type or form of MPs found in sediment/sand samples and references of the corresponding studies.

Continent	Area	Quantity or concentration	Microplastic (type or form)	References
America	Kamilo Beach**	248 items/m ³	PE 85%, PP 14%	Carson et al. (2011)
	Florida**	116-214 piece/l	Fragment predominant	Graham and Thompson (2009)
	Maine**	105 piece/l	Fragment predominant	
	Canada*	<10 particles/m	PE predominant, virgin pellets	Gregory (1983)
	Bermuda*	>5000 particles/m	PE predominant, virgin pellets	
	Pacific Ocean*	27 items/m ² (1-4.75 mm)	Fragment 89%	Hidalgo-Ruiz and Thiel (2013)
	Noronha Archipelago*	15 particles/kg	Fragment 65%; pellet 23%	Ivar Do Sul et al. (2009)
	Canada**	2-8 pieces/g	Plastic fibers	Mathalon and Hill (2014)
	Hawaiian beaches*	43.4 particles/l	fragment 87%, plastic pellets 11%	McDermid and McMullen (2004)
Asia	Oman Gulf*	>100 particles/m ²	PE predominant, virgin pellets	Khordagui and Abu-Hilal (1994)
	Arabian Gulf*	To 80,000 particles/m ²	PE predominant, virgin pellets	
	Sea of Japan*	8-17 particles/m ²	Fragment 41%	Kusui and Noda (2003)
	Singapore**	0-4 particles/sample	PE and PS predominant	Ng and Obbard (2006)
	Indian Ocean**	81.43 mg/kg	Fragment 100%	Reddy et al. (2006)
	India*	68.83 items/m ²	Fragment predominant	Jayasiri et al. (2013)
	Singapore**	36.8 particles/kg	PE, PP, nylon and PVC	Mohamed Nor and Obbard (2014)
	China*	4137.3 particles/m ³	Fibers, granules	Zhao et al. (2014)
	Korea*	Up to 27,606 particles/m ²	PS expanded > 96%	Lee et al. (2013)
	SW Indian Ocean**	26 particles/l	Plastic fibers	Woodall et al. (2014)
Australia	New Zealand*	>1000 particles/m	PE and PP predominant	Gregory (1977)
Europe	Tamar Estuary, UK**	32 items/sample	<1 mm, PVC 26%; Polyester 35%	Browne et al. (2010)
	Belgian coast**	<391 particles/kg	<1 mm, fiber 59%, granule 25%	Claessens et al. (2011)
	Russian beaches*	5-10 particles/m ²	Fragment 55.6%	Kusui and Noda (2003)
	Plymouth, UK**	>10 pieces/l	Plastic fibers	Thompson et al. (2004)
	Maltese coast*	>1000 pieces/m ²	PE, plastic pellets	Turner and Holmes (2011)
	French-Belgian-Dutch**	0.3-11.7 particles/kg	LDPE, HDPE and PS predominant	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	Venice, Italy**	672-2175 pieces/kg	PE + PP 82%	Vianello et al. (2013)
	Slovenia*	Up to 155.6 particles/kg	MPs (1-5 mm) > 74%; fibers, fragments	Laglbauer et al. (2014)
	North Sea**	1.3-2.3 particles/kg	PP, PE, PET, PVC, PS and polyamide	Dekiff et al. (2014)
	NE Atlantic Ocean**	324 particles/l	Plastic fibers (polyester 53.4%)	Woodall et al. (2014)
	Mediterranean Sea**	350 particles/l		

*: sandy samples (mineral deposit); **: sediment samples (deposit rich in organic matter).

widely studied continents as regards the quantification of MPs in sandy samples and sediments. Studies in Europe deal mainly with sediments (8 out of 11) whereas studies on sandy samples are predominant in Asia (6 out of 10) and in America there are as many studies on sandy samples as on sediments. Concerning the geographical comparison of MP quantity in sandy/sediment

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

samples, the location of studied areas seemed to be the main factor influencing MP distribution in the field. When comparable, the measured concentrations of MPs in the sediments ranged widely, from almost 0.3 (Van Cauwenberghe et al., 2015) to 2175 (Vianello et al., 2013) particles per kg and from 27 (Hidalgo-Ruiz and Thiel, 2013) to 80,000 (Khordagui and Abu-Hilal, 1994) particles per m² in sandy samples.

As for water samples, due to differences in sampling techniques it remains difficult to directly compare the reported MP concentrations/quantities or types. Sandy/sediment samples are usually collected from the coast at low tide (Hidalgo-Ruiz et al., 2012). The depth at which they are found, the masses of the samples and the tide level have tended to vary considerably between the different studies. For sampling at low tide from the coast, different types of tools are usually used according to sample location: stainless-steel spoons, spatula and box corer. For sampling at high tide, it is possible to use a corer and bottom trawl. The diversified sampling methods lead to results expressed in different units, making it difficult to compare between published studies. Quantification of MPs in sandy samples is usually expressed in number of particles per unit of distance and surface (Gregory, 1983; Hidalgo-Ruiz and Thiel, 2013: Kusui and Noda, 2003) while for sediment samples, MP quantities are usually expressed in number of particles per unit of volume (Graham and Thompson, 2009; Woodall et al. 2014) or per m³ (Carson et al. 2011). However, number of particles per unit of mass has been used for both types of samples, i.e. Ivar Do Sul et al. (2009) for sandy samples and Claessens et al. (2011) as well as Vianello et al. (2013) for sediments. This discrepancy is once again due to a lack of standardization for sampling protocols.

In addition to differences between sample collections, sediment sample preparation can lead to a variability of results between studies. Filtration and/or extraction protocols based on separation by density are usually employed for the quantification of MPs from sand and sediment samples. However, different sizes of sieves and filters have been reported. For example, Claessens et al. (2011) studied MPs between 38 μ m and 1 mm and Laglbauer et al. (2014) from 1 to 5 mm. Besides, solutions of water saturated with sodium chloride (Thompson et al., 2004) or sodium iodide (Claessens et al., 2013) have been used to extract MPs from sediment samples. The use of these two different salts generates different densities of solutions (1.2 g cm⁻³ for saturated sodium chloride and 1.6 g cm⁻³ for sodium iodide at 3.3 M) leading to variations in MP extraction capacity.

Concerning the different MP types found in sand/sediment samples, when mentioned in studies, PE has been largely predominant. The presence of PE is quite surprising since it is a lowdensity polymer and should float at the sea surface. This observation supports the hypothesis of a possible colonization of organisms on these MPs leading to increased density (Zettler et al., 2013; Harrison et al., 2014).

2.3. MPs in marine organisms

The MPs found in marine organisms may be the result of their ubiquitous presence in highly abundant marine ecosystems. By using a manta trawl lined with 333 µm mesh at 11 random sites of the North Pacific Ocean, Moore et al. (2001) showed that although plankton organisms were approximately five times more abundant than plastic particles, the total mass of plastic was six times greater than that of plankton. These results underlined the fact that MPs have a high potential to affect organisms due to their numerous contacts with one another, as well as with the different organisms.

The presence of MPs in organisms from marine ecosystems is now well-established (Desforges et al., 2015; Mathalon and Hill, 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). A majority of studies have focused on the ingestion of MPs in various species ranging from invertebrate to marine mammal. However, to date, data on the biological effects of MPs on marine organisms are still scarce. The types and quantities of MPs found in different marine species are indicated in Table 3.

Many types of organisms are represented in these studies, including zooplankton, polychaete, bivalve, crustacean, fish, seabirds and mammals. Fish and seabirds have been the most widely studied organisms in marine ecosystems. Concerning the composition of the MPs found in the biota, information remains with only 3 studies having been published on PE, PP or polyamide (Moore et al., 2001; Lusher et al., 2013; Besselinga et al., 2015). The MP forms were widely indicated with filaments/fibers having been found, mostly in less evolved organisms: from zooplankton to Thaliacea, with and fragments in more evolved organisms from fish to mammals. As for water and sand/sediment samples, the units of the measured variables have differed between studies. The units were particles per gram or per individual or a proportion (%) of individuals with MPs recovered in part of the digestive tract, which does not allow evaluation of quantitative contamination in organisms. MPs were detected in many organisms as mentioned in Table 3 and detailed in the following paragraph.

Regarding the species of zooplankton in the Northeast Pacific Ocean, Desforges et al. (2015) reported MP quantity in *Neocalanus cristatus* and *Euphausia pacifia*. They showed that MPs were probably filtered by these species, the ingestion rate being dependent on their feeding mode, with MPs being found particularly in non-selective feeding species.

MPs found in the fecal casts of two polychaete species (*Clyme-nella torquata* and *Alitta virens*) were equivalent to those found in sediment samples suggesting that ingestion of MPs equals egestion by the polychaete (Mathalon and Hill, 2014).

As a well-known bioindicator for environmental pollution in marine species, the mussel Mytilus edulis is the most widely studied group among marine organisms (4 studies). Low quantities of MPs were found in bivalves from German and French/Belgian/Dutch farms (respectively 0.36 \pm 0.07 and 0.2 \pm 0.3 particles/g of soft tissues; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015). Mathalon and Hill (2014) found greater quantities (up to 500 times higher) of MPs in the same species from Canada than those previously reported in bivalves from European areas by Van Cauwenberghe and Janssen (2014), Van Cauwenberghe et al. (2015). These discrepant results could be due to the differences in contamination levels between the sites studied. Moreover, as discussed above, the results also depend on the method employed for MP extraction (digestion and filtration) and analysis (microscopy and spectroscopy). The gut depuration step that was performed by Van Cauwenberghe and Janssen (2014), but which is not mentioned in the work of Mathalon and Hill (2014), could lead to differing results, since a decrease of up to 33% in the quantity of MPs in mussels appeared after 3 days of gut depuration (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Comparison between commercial and wild types of mussels (M. edulis, Mytilus galloprovincialis) showed that the total number of MPs was not significantly different between the commercial mussels and wild specimens, with values varying from 2.6 to 5.1 fibers (0.2-1.5 mm in length) per 10 g of mussel tissues (De Witte et al., 2014). Regarding another bivalve, 0.47 \pm 0.16 particles/g were found in the soft tissue (wet weight) of oysters (Crassostrea gigas) (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014) with a decrease of approximately 25% after 3 days of depuration in clean seawater.

In a crustacean (*Nephrops norvegicus*), 83% of the animals sampled in the Clyde Sea contained plastic filaments in their stomach (Murray and Cowie, 2011). In this study, tightly tangled balls of plastics were predominantly found in up to 62% of the

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

115

Table 3

Type of organisms, species, type or form and quantity of MPs found in biota with references of the corresponding studies.

Organisms	Species	Microplastics type or form	Quantity	References
Zooplankton	Neocalanus cristatus Euphausia pacifia	Fibers (50%) Fibers (68%)	0.026 particles/individual 0.058 particles/individual	Desforges et al. (2015)
Polychaete	Clymenella torquata Alitta virens	Fibers Fibers	2-8/gram (equal in sediment) 2-8/gram (equal in sediment)	Mathalon and Hill (2014)
Bivalvia	Mytilus eduis	Fibers	106-178/mussel 0.36 ± 0.07 particles/g	Mathalon and Hill (2014) Van Cauwenberghe and Janssen
	Mytilus galloprovincialis	Fibers	0.2 ± 0.3 particles/g 0.26-0.51/gram	(2014) Van Cauwenberghe et al. (2015) De Witte et al. (2014)
	Crassostrea gigas		0.47 ± 0.16 particles/g	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
Crustacean	Nephrops norvegicus Crangon crangon	Filaments Synthetic fibers	83% had MPs in stomach 0.68 ± 0.55 MP/g	Murray and Cowie (2011) Devriese et al. (2015)
Fish	Inetys vagina Astronesthes indopacifica Cololabis saira	Fragment, PP/monohlament Fragments	MPs predominant	Boerger et al. (2011)
	Hygophum reinhardtii Loweina interrupta Myctophum aurolanternatum Symbolophorus californiensis			
	Merlangius merlangus Micromesistius poutassou Trachurus trachurus Trisopterus minutus Zeus faber Aspitrigla cuculus Callionymus lyra Cepola macrophthalma Buglossisium luteum Microchins, variegates	Polyamide (35.6%), polyester (5.1%), PS (0.9%), LDPE (0.3%)	32% fish had MPs 51.9% fish had MPs 28.6% fish had MPs 40% fish had MPs 47.6% fish had MPs 51.5% fish had MPs 38% fish had MPs 32.3% fish had MPs 26% fish had MPs 26% fish had MPs	Lusher et al. (2013)
Seabird	Puffinus tenuirostris	Fragments	Observation Observation	Tanaka et al. (2013) Pand et al. (2014)
	Puffinus gravis Puffinus gravis	riagments	Observation Observation	bolid et al. (2014)
	Calonectris diomedea Puffinus mauretanicus Puffinus yelkouan Morus bassanus Ichthwaetus audouinii	Fragments	Observations	Codina-García et al. (2013)
	Ichthyaetus adabanni Ichthyaetus, melanocephalus Larus michahellis Rissa tridactyla Catharacta shua			
Mammalia	Phoca vitulina		11.2% seal had MPs in stomach	Bravo Rebolledo et al. (2013)
	Megaptera novaeangliae	PE (56.3%)	1% seal had MPs in intestine 16 MPs in gastrointestinal	Besselinga et al. (2015)

animals, and there were no significant differences in plastic load between males and females. Devriese et al. (2015) found fibers in 63% of the shrimp studied (*Crangon crangon*), with an average value of 0.68 \pm 0.55 MP/g wet weight.

The only species studied in Thaliacea was the salp (*Thetys vagina*), which presented plastic fragments and PP/monofilaments line firmly embedded in their tissues (Moore et al., 2001).

The same methodology as Moore et al. (2001) was used by Boerger et al. (2010) to determine the quantity of MPs in the guts of various common planktivorous fish from the North Pacific Central Gyre. About 35% of the sampled fish contained MPs in their guts (N = 670, 6 different species). The average number of MPs was 2.1 \pm 5.78 pieces/fish. Furthermore, these authors showed that there was a positive correlation between size class of fish and quantity of MPs in the guts. The presence of MPs in the gastrointestinal tracts of pelagic and demersal fish from the English Channel was also investigated by Lusher et al. (2013). The authors studied 10 different species (5 pelagic and 5 demersal fish; N = 504). A proportion of 36.5% (184/504) of fish contained MPs in their gastrointestinal tracts. The average number of pieces of plastic per fish was 1.90 ± 0.10 (351 pieces in 184 fish). Among the total of 351 plastic pieces 92.4% were MPs. There were no differences between pelagic and demersal fish.

MPs were also found in many species of seabirds (Bond et al., 2014; Codina-Garcia et al., 2013; Tanaka et al. 2013).

Bravo Rebolledo et al. (2013) showed that younger animals phoca vitulia accumulated greater quantities of MPs compared to older ones, and MPs were found mainly in the stomach (11.2%; N = 107) and the intestines (1%; N = 100) but not in the feces (N = 125).

Very recently, MPs were observed in the intestines of baleen whales (*Megaptera novaeangliae*), a macro-filter-feeder (Besselinga et al., 2015). A total of 45 particles were extracted from their intestines; 16 particles were identified as MPs of many different types: PE, nylon, PP etc. Among them, the most abundant type (56.25%) was PE, which is the most widely produced polymer

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

worldwide, and also the most frequently used in fishing gear.

2.4. Characterization and identification of MPs in field samples

The nature and quantities or concentrations of MPs were not systematically determined in field samples (Tables 1-3) due to the fact that improved identification of MPs from environmental samples requires several steps and demands mastery of several techniques. This is particularly the case for MPs from marine organisms. Differences in MP distribution due to changes of analytical procedure from extraction to visual sorting and identification by spectroscopy have previously been discussed in the literature (Rocha-Santos and Duarte, 2015). However, as shown in Tables 1 and 2, once when identification was carried out, PE fragments were clearly shown to be the most frequently present polymer in both waters and sand/sediment samples. Seawater samples usually contained greater proportions of low density polymers such as PE and PP as has been reported in many studies (Law et al., 2010; Moore et al., 2001; Reisser et al., 2013; Van Cauwenberghe et al., 2015). Surprisingly enough, in sediment samples some studies have also reported high proportions of PE and PP in the whole MPs detected whereas their density in water is lower (Carson et al., 2011; Gregory, 1977, 1983; Khordagui and Abu-Hilal, 1994; Ng and Obbard, 2006; Turner and Holmes, 2011; Van Cauwenberghe et al., 2015; Vianello et al., 2013). This observation tends to support the hypothesis of increased MP density by colonization of a wide range of organisms (micro-organisms, algae, invertebrates etc.) and sorption of organic pollutants. In other studies, MPs with high density (higher than seawater) were present in a more sizable proportion in sand/sediment samples compared to the water column (Browne et al., 2010; Claessens et al., 2011; Lee et al., 2013). Browne et al. (2010) showed that PVC represented 26%, polyester 35%, polyamide 18% of the MPs found in sediment samples. Claessens et al. (2011) also showed that PVC, polyester and polyamide comprised 80% of the total MPs in sediment samples from Belgian coastal areas. Lee et al. (2013) found that more than 96% of the plastic debris on beaches of Korea were Styrofoam (expanded PS) originating in oyster aquaculture facilities near the sampling sites and being used to sustain buoyancy with oyster growth, thereby showing that the nature and concentration of MP may also be dependent on the presence of industries in the vicinity of the sampling site. For deep-sea sediment samples, an average proportion of 53.4% for plastic fibers (polyester) was reported by Woodall et al. (2014) in the Northeast Atlantic Ocean, Southwest Indian Ocean and the Mediterranean Sea.

Considering their forms, plastic fragments were predominant in most of the studies in water and sand/sediment samples (Doyle et al., 2011; Eriksen et al., 2013; Ivar Do Sul et al., 2009, 2013; Law et al., 2010; McDermid and McMullen, 2004; Moore et al., 2002). Nevertheless, in some cases, other forms such as fibers and/or filaments were detected depending on the sampling method, the method of analysis, and the specific objective of the studies (Collignon et al., 2012; Desforges et al., 2014; Gregory, 1983; Lusher et al., 2014). Concerning MPs detected in organisms, the form was shown to depend upon animal with several observations of filaments/fibers in species from zooplankton to Thaliacea and of fragments in species from fish to mammals (Table 3).

Concerning the size of MP, Morét-Ferguson et al. (2010) reported that 60% of the plastic debris sampled within the North Atlantic subtropical gyre are 2–6 mm long. In addition, the change of size and abundance of MPs between the 1960–1970s and the 1980–1990s was studied by Thompson et al. (2004) who observed decreased size parallel to increased abundance, suggesting a phenomenon of fragmentation. As for Lee et al. (2013), they showed that MP abundance depended on season with a threefold increase after as compared with before the rainy season, an increase suggesting a more intense fragmentation of MPs by the high physical energy appearing during typhoons.

Interspecies differences (e.g. specific biological barriers), means of exposure and MP abundance, type, size and form present in the field (water and sediment) evidently lead to different bioaccumulations. For example, some species filter what they ingest; others choose MPs according to their size, color etc. due to their resemblance to their usual food (Boerger et al., 2010). Moreover, depending on the object studied (organisms, water or sediment), the MPs under consideration are not the same. In organism studies, focus has typically been placed on small MPs like filaments, largely because they were the ones most widely found. In environmental studies, focus on bigger MPs has been easier with the use of manta nets or water filtration techniques with large pore sizes (>330 µm) to prevent clogging. Lots of MPs present in the environment have not been observed in organisms because they did not pass through the biological barriers or due to the egestion of the organisms; this phenomenon has been reported in many studies (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Mathalon and Hill, 2014). Consequently, the link between what is found in organisms and what is found in the environment is complex.

Many different analytical techniques are currently used to assess the composition and concentration of MPs; they include Fouriertransform infrared spectroscopy (FT-IR, Thompson et al., 2004; Vianello et al., 2013; Nor and Obbard, 2014), Raman spectroscopy (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014, 2015) and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Pyr-GC-MS, Fries et al., 2013; Dekiff et al., 2014). Their principles are different hence the results may differ as well. As regards MPs in marine wildlife, the use of chemical digestion for extraction from organisms has seemed to influence results. For example, nitric acid extraction efficiency depends on MP sizes and natures. Efficiency is 30% higher for particles of 30 µm compared to 10 µm particles whereas the nylon rope fibers are not extracted (Claessens et al., 2013). There is consequently an urgent need for standardization of the methods for collection, extraction and analysis of MP contamination in the field and animals.

3. Exposure experiments in the laboratory

Over recent years, experimentations designed to assess the ingestion and biological effects of MPs have been carried out on many species, ranging from zooplankton to birds (Table 4). The highest number of studies have involved polychaetes (only one species: Arenicola marina) and crustaceans whereas zooplankton has been the most widely investigated in terms of number of species. Concerning the type of MPs used in exposure experiments, the majority of the studies have been performed with PE or PS and, exceptionally, with PVC and PP. Most of the time, the shapes of MPs were spherical since the sphere, often known as a microbead, is the most commonly commercialized shape. The size of the MPs has depended on the study under consideration as well as the concentrations/quantities of MPs introduced in exposure media. The concentrations/quantities used for exposures are very variable and tend to be expressed in different units, leading to difficulties for further comparisons. For example, the units employed have been particle number/medium volume, particle mass/medium volume, particle number/organism number, particle number/sediment mass, etc. Exposure time has also greatly varied, ranging from 4 h to 2 months. Consequently, in addition to the above-mentioned difficulty arising from the use of different unit expressions of MP quantities, variations in MP sizes, quantities and exposure times have led to highly problematic comparisons between the results of Table 4

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

117

Organisms	Species	Microplastics(MPs) Type* or form	MP Concentrations/abundance	Exposure time	References
Zooplankton	Marenzelleria spp Acartia spp Limnocalanus macrurus Eurytemora affinis Synchaeta spp Tintinnopsis lobiancoi Neomysis integer Mysis relicta Mysis relicta Bosmina coregoni nordmannii Evadne nordmannii	PE sphere 10 μm	1000–10000 particles/mL	12 h	Setălă et al. (2014)
	Votania horaniani Oxyrrhis marina Doliolidae Euphausiidae Obelia sp Siphonophorae Bivalvia Brachyura Caridea Paguridae Porcellanidae	PS 7.3–30.6 μm	635–3000 beads/mL	24 h	Cole et al. (2013)
Bivalvia	Mytilus edulis	HDPE 0-80 µm no additive	2.5 g/L	96 h	Von Moos et al. (2012)
		PS 3–9.6 μm	42 particles/mL	To 48 days	Browne et al. (2008)
		PS 0.5 μm	50,000,000 particles/mussel	1 h	Farrell and Nelson (2013)
		PS microsphere (10-90 μm)	110 particles/mL	14 days	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	Mytilus galloprovincialis	PE and PS (0.1-1 mm)	MP = 200 - 260 ng/g	7 days	Avio et al. (2015)
Polychaeta	Arenicola marina	PS sphere (400—1300 μm) pre-equilibrated with PCBs	0, 0.074, 0.74 and 7.4% dry weight	28 days	Besseling et al. (2013)
		PVC pre-equilibrated POPs (NP*, Phe*, PBDE*, Triclosan)	PVC 5% in sand	10 days	Browne et al. (2013)
		PE pre-equilibrated with Phe	Lower ratio in sediment		Teuten et al. (2007)
		MP 20-2000 µm	1.5 mg MP/individual	Few days	Thompson et al. (2004)
		PS microsphere (10–90 μm)	110 particles/g sediment	14 days	Van Cauwenberghe et al. (2015)
		PVC 130 μm	0-5% in sediment	48 h	Wright et al. (2013)
Echinodermata	Holothuria floridana Holothuria grisea Thyonella gemmata Cucumaria frondosa	MP collected on beach PVC (fragment and pellet), Nylon <5 mm	16.7 g/L	4 h	Graham and Thompson (2009)
	Embryo of Lytechinus variegatus	PE	solution MP/solution exposure: 20%	24 h	Nobre et al. (2015)
Crustacean	Centropages typicus Calanus helgolandicus Acartia clausi	PS 7.3–30.6 μm	635—3000 beads/mL	24 h	Cole et al. (2013)
	Temora longicornis	PS 0.4–30.6 μm	635-1,000,000 beads/mL		
	Allorchestes Compressa	PE 11–700 μm	0.1 g MP/individual	72 h	Chua et al. (2014)
	Orchestia gammarellus Semibalanus balanoides	MP 20-2000 μm	1 g MP/individual 1 g MP/1 lit/10 individual	Few days	Thompson et al. (2004)
	Nephrops norvegicus	PP rope	Eat fish pre-contaminated with MP	24 h	Murray and Cowie (2011)
	Carcinus maenas	PS 0.5 μm	Eat mussels pre-contaminated with MP	To 21 days	Farrell and Nelson (2013)
	Calanus helgolandicus	PS 20 µm	75 MP/mL	24 h	Cole et al. (2015)
Fish	Pomatoschistus microps	PE 420–500 μm	7 types of prey	24 h	De Sa et al. (2015)
		PE 1-5 μm	18.4-184 µg/L	To 96 h	Oliveira et al. (2013)
	Oryzias latipes	LDPE <0.5 mm	10% of their prey	2 months	Rochman et al. (2013b, 2014)
Conhird	Calonactris laucomalas	PF coastal	13-14 g/bird	To 42 dave	Teuten et al (2009)

(*): HDPE: High Density Polyethylene; LDPE: Low Density Polyethylene; NP: Nonylphenol; PBDE: Polybrominated diphenyl ether; PE: Polyethylene; Phe: Phenanthrene; PS: Polystyrene; PVC: Polyvinyl chloride.

different studies. Most works have focused on the ingestion and biological effects of MPs after laboratory exposure of animals. Nevertheless, in some studies trophic transfer has been studied with regard to exposure of organisms to preys previously contaminated with MPs (Farrell and Nelson, 2013; Murray and Cowie, 2011).

3.1. Ingestion of MPs by organisms

All of the results of marine organism exposures to MPs, from zooplankton to birds, highlight some common trends. The ingestion of MPs has depended on several different factors.

The first factor is the influence of the species studied. For example, concerning zooplankton, several species originating from the Baltic Sea were collected and their capacity of MP ingestion was

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

tested by Setälä et al. (2014). These authors exposed 11 species to 10 µm fluorescent PS microspheres at 3 concentrations (1000, 2000, 10,000 particles/mL) during 12 h. While 9 out of the 11 species ingested MPs, appreciable differences in the percentages of MP ingestion were observed. The highest percentage with ingested spheres was found in the pelagic polychaete larvae, Marenzelleria spp. In another study (Cole et al., 2013), 15 zooplankton taxa, which are representative of abundant mesozooplankton from Northeast Atlantic coastal systems, were collected in Plymouth, UK. PS spheres were chosen in the size range of 7.3-30.6 µm for the purposes of laboratory exposure during 24 h. Their concentrations ranged from 635 to 3000 beads/mL, inversely correlated to the size of the beads. As a result, 13 out of 15 exposed species showed MP ingestion at different proportions depending on taxa. Graham and Thompson (2009) studied four species of deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Holothuria floridana, Holothuria grisea, Thyonella gemmate and Cucumaria frondosa) exposed to PVC pellets (4.0 mm) and showed that the large size of the pellets likely prevented the two smallest species (Thyonella gemmata and H. floridana) from ingestion, thereby suggesting that feeding capacity could depend on species size.

Intra-species differences could also be a factor influencing the ingestion of MPs. Farrell and Nelson (2013) exposed *M. edulis* to fluorescent PS microspheres of 0.5 μ m for 1 h (411 million particles for 8 mussels × 3 replicates). In 13 out of 24 mussel organisms, the microspheres were sufficiently numerous to be visible to the naked eye when cut open. Moreover, for seabirds (*Calonectris leucomelas*, *Procellaria aequinoctialis*), ingestion of MPs was demonstrated by Ryan and Jackson (1987) and Teuten et al. (2009). Age appeared to be a major factor in the contamination by MPs since young and immature birds were more highly contaminated than older ones. Nevertheless, the author did not find any hypothesis supporting this observation (van Franeker and Law, 2015).

In addition to inter- and intra-species differences, another factor influencing ingestion could be MP size. Cole et al. (2013) showed that at both life-stages, adult and juvenile, the Holoplankton *Calanus Helgolandicus* ingested MPs of 20.6 μ m while the Holoplankton *Acartia clausi* adults ingested MPs 30.6 μ m MPS but not 20.6 μ m MPs. Browne et al. (2008) showed that the accumulation of smaller particles (3 μ m) by *M. edulis* was superior to 60% compared to larger particles (9.6 μ m), in accordance with results from Van Cauwenberghe et al. (2015) who carried out mussel exposures to PS of three different sizes (10, 30, 90 μ m). As a result, the accumulation in the tissues of lugworms of 10 μ m particles was greater than 30 μ m particles.

Type of MP is also likely to affect MP ingestion and could be an influencing factor. The four species of deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (*H. floridana, H. grisea, T. gemmate* and *C. frondosa*), studied by Graham and Thompson (2009) were exposed during 4 h of daylight to three types of plastic: PVC fragments (0.25–15 mm long, most of them smaller than 5 mm), nylon fragments (0.25–15 mm long, 0.27 mm in diameter), and PVC pellets (4.0 mm in diameter) all of them collected along the east coast of the USA from Florida to Maine. All of the species ingested MPs in variable proportions. The researchers observed significantly more sizable ingestion of nylon and PVC fragments than pellets (2–138 fold), suggesting selective ingestion by organisms.

Only one study has examined the effect of MP color after laboratory exposure and it seemed, in this case, that it was a factor relevantly influencing MP ingestion. Juvenile fish *Pomatoschistus microps* were exposed during 24 h to PE microspheres (420–500 μ m, 3 colors: white, black and red) (De Sa et al., 2015). The authors observed referential ingestion of white as opposed to blue or red MPs. They then went on to suggest that MPs could be

confused with food.

Most of the time, when ingested MPs have been localized within an organism, the digestive tract has been mentioned, according to a study of Von Moos et al. (2012) that highlighted the presence of HDPE (0–80 μ m) in the digestive system of *M. edulis* after 3 h of exposure. Concerning other animals, two filter-feeder species, the barnacle *Semibalanus balanoides* and the amphipod *Orchestia gammarellus* from intertidal habitats close to Plymouth (UK) were exposed to MPs (20–2000 μ m) at high concentrations (1 g MPs/L of seawater/10 individuals and 1 g MPs/individual respectively) for a few days (Thompson et al., 2004). Microscopic observation revealed the presence of MPs in the intestinal tracts of both species.

As mentioned above, several factors were identified as having or not having an impact on MP ingestion by organisms, *e.g.* inter- and intra-species differences, size, type and color of MPs. Combinations of these factors probably occur, which renders it difficult to fully comprehend MP ingestion. Nevertheless, after ingestion by organisms, MPs can potentially be transported in the whole body, leading to the biological effects investigated in exposure studies (Table 4) and discussed in the following section.

3.2. Biological effects

The biological effects of MPs have been were explored in different invertebrate and vertebrate species after laboratory exposures (Von Moos et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Cole et al., 2013, 2015). Among the different biological effects, mortality rate, energy budget, loss of weight, feeding activity, embryonic development, predation, biomarker responses and alteration of gene expression have been the most investigated.

The hypothesis that MPs are taken up into cells and can cause significant effects on tissue and at the cellular level was corroborated by Von Moos et al. (2012) in mussels (M. edulis). Through the exposure of mussels to high-density additive-free polyethylene (HDPE), with non-uniformly shaped grains ranging from 0 to $80 \,\mu m$ and at a nominal concentration of 2.5 g/L, MPs led to uptake in gills followed by transport towards the stomach and the digestive gland, where accumulation occurred in the lysosomal system after 3 h (Von Moos et al., 2012). In this study, pronounced destabilization of lysosomal membrane and strong inflammatory responses were shown to occur when exposure time was increased. Browne et al. (2008) showed in mussels (M. edulis) that while ingestion and translocation of MPs did not change the phagocytic activity, it increased immune response. Concerning fish, specimens of Pomatoschistus microps were exposed to PE microspheres (1-5 µm) at concentrations ranging from 18.4 to 184 µg/L (Oliveira et al., 2013). After 96 h of exposure, a reduction of acetylcholinesterase (AChE) activity had been shown to occur. In contrast, no significant effect of PE was found for glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation. Rochman et al. (2014) mixed low-density PE and preys of another fish species (Oryzias latipes) at a high proportion (up to 10% of the prey species) during 2 months. Several negative effects appeared: down regulation of choriogenin, vitellogenin and estrogen receptor (ERa) mRNA gene expression and abnormal germ cell proliferation. Severe glycogen depletion and fatty vacuolation were also observed. In the long term, a potential increase of mortality due to the effects observed at molecular level is still under debate. For example, Rochman et al. (2013, 2014) showed a mortality rate reaching 6% and probably associated with the effects observed at the molecular level. In contrast, Browne et al. (2008) showed that in mussel (M. edulis), exposure to PS microspheres did not affect their viability.

The survival of organisms is also ensured by other processes and can be impaired by a modified energy budget. While Van Cauwenberghe et al. (2015) did not measure any changes in the

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

energy budget of mussels (M. edulis) ingesting PS microspheres, an increase of energy consumption in the digestive gland (25%) was nonetheless observed. At high concentrations of exposure (up to 5% by weight, in sediment), Wright et al. (2013) showed a depletion of energy reserves (up to 50%) in lugworms (Arenicola marina), after 10 days of exposure, whereas despite longer exposure time (up to 14 days), Van Cauwenberghe et al. (2015) showed no depletion of energy reserves for this species at low concentrations. An energy budget depends not only on energy consumption but also, at a higher (eco)toxicologic level, on feeding activity. In one example, the impact of MPs on copepod (Centropages typicus) feeding activity was investigated by Cole et al. (2013, 2015). A significant decrease of algal feeding was shown under different conditions of MP exposure (>4000 beads of PS 7.3 μ m/24 h and 75 beads of PS 20 μ m/ 24 h, Cole et al., 2013, 2015 respectively). For lugworms (Arenicola marina) exposed to MPs, a reduced feeding activity was likewise shown in two different studies (Besseling et al., 2013; Wright et al., 2013). Concerning some vertebrate species, predation can also be studied. De Sa et al. (2015) showed that predation of a fish species (Pomatoschistus microps) and its efficiency were reduced by 65% and 50% respectively in the presence of PE microspheres with a diameter of 420-500 µm and different colors. A loss of weight in A. marina was indeed observed when MP concentration increased in exposure media (Besseling et al., 2013). Consequently, we could assume that the reduction of predation as well as the abundance of MPs in the media modify energy consumption, which is directly linked to the energy budget and loss of organism weight, which could lead to reduce predation, thereby completing a cycle.

At the ecological level, population survival was demonstrated to be dependent upon organism survival, reproductive efficiency, embryonic development, etc. These endpoints were investigated in the following three studies. Although there was no significant effect of MP exposure on production rates and egg size of the copepod (*Centropages typicus*), following exposure to MPs the hatching of eggs seemed depleted (Cole et al., 2013, 2015). The toxicity of PE on the embryonic development of an Echinodermata (*Lytechinus variegatus*) was also demonstrated by Nobre et al. (2015). After 24 h of exposure, PE pellets had negative effects on embryonic development, which was assessed in terms of the presence of abnormal embryos.

3.3. Trophic transfer

In addition to MP exposure from the media, trophic transfer has been studied in works involving different levels of the food web. The aim of these studies was to highlight MP intakes occurring through diet in addition to ingestion from the media (water and sediments). Trophic transfer is a process leading to a potential human health risk because humans are at the top of the trophic chains and consequently have got to be taken into account in research studies.

Potential MP transfer via planktonic organisms to a higher trophic level was indicated by MP observations in *Mysida* intestine after 3 h of incubation with mesozooplankton previously exposed to PE microspheres (Setälä et al., 2014).

Farrell and Nelson (2013) observed MP trophic transfer from mussels to crabs. *M. edulis* were exposed to 0.5 μ m fluorescent PS microspheres (411 million particles for 8 mussels) during 1 h. After that, their tissues were cut and placed in a bucket with crabs (*Carcinus maenas*). Crabs were sampled from 1 h to 21 days. Microspheres were found in the stomach, the hepatopancreas, the ovary, the gills and the haemolymph of the exposed crabs, in decreasing numbers over the trial period.

Murray and Cowie (2011) worked on the crustacean N. norvegicus originating from the Clyde Sea. After cleaning the guts of animals for 2 weeks, they were fed with their prey (fish) and preexposed with blue propylene rope (5 mm) for 24 h. The authors showed that 100% of the animals fed with plastic seeded fish presented plastics in their stomachs whereas 70% of the control animals contained plastics which they had accumulated prior to being captured and had not digested during the 2-week starvation period prior to the experiment. These results could be worrisome since this species has a strong socio-economic interest and is consumed by humans.

Another edible species was studied by Desforges et al. (2015), who estimated that consumption of the MPs contained in zooplankton led to the ingestion of 2–7 MP particles/day by members of the juvenile salmon species (*Oncorhynchus* spp.) from coastal British Columbia, and \leq 91 MP particles/day in returning adults.

Finally, Van Cauwenberghe and Janssen (2014) estimated that annual dietary exposure for European shellfish consumers can reach 11,000 MPs per year. These results pose a challenge about consequences on human health.

4. Discussion

4.1. Are experimental laboratory exposures consistent with the exposome?

Many studies have focused on the MPs found on the field. Given the constraints associated with the sampling protocols, sample treatments and analytical methods, these field studies are hardly comparable. In this part, the results on MPs from field studies will be compared when possible with the conditions used for laboratory exposures, in order to determine the degree of consistency between laboratory exposure and field exposome. Table 5 is a comparative table to summarize the differences between the MPs found in the field and those used in laboratory exposures.

Concerning MPs in water, field concentrations expressed in particles/km² cannot be used for comparison with laboratory exposure, which is usually expressed as particles/medium volume, particle mass/medium volume, particle number/organism number, and particles/sediment mass. Only the expression of field concentrations in particles/m³ can be compared to exposures expressed in particles/medium volume. The range found in the field was 0.004–9200 particles/m³ (Table 1). In laboratory exposures, the contamination range expressed in particles/mL was 42 to 10,000 corresponding to 42 million to 10 billion particles/m³. Comparing these values, it is obvious that the concentrations were not of the same order of magnitude, the lowest concentration of exposure being about 4500 times greater than the highest field concentration.

In the literature, few works have studied the accumulation and effect of MPs on organisms after sediment exposures. The reported MP exposure concentrations were 5% in mass of sand (Browne et al., 2013), up to 5% in mass of sediment (Wright et al., 2013) and 110 particles/g of sediment (Van Cauwenberghe et al., 2015). In field studies, a majority of concentrations were expressed as particle number per m³, m² or L, rendering impossible any comparison with the concentrations usually employed in laboratory exposures. Some field MP concentrations were expressed in particle number/ kg of sediment with values ranging from 0.3 to 8000 corresponding to 0.0003 to 8 particles/g (Table 2). This value is more than 10 times below the concentration employed by Van Cauwenberghe et al. (2015). Only one study on natural sediments from the Indian Ocean (Reddy et al., 2006) has expressed the concentration as 81.43 mg/kg, corresponding to 0.0081%, which was about 600 times lower than the concentrations used by Browne et al. (2013) and Wright et al. (2013) in laboratory exposures.

Table 5

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

Overall comparison of the MPs found in waters and sediments with the different MPs used for laboratory exposures. The number of references citing this type or size or nature of MP as predominant is indicated in brackets. In gray: PVC; in black: PE; in blue: PP; in yellow: PS.* identification of MP nature was not performed in all references.

	Compartment	Туре	Size	Nature	Concentration	
In the field	Water (25)	Fragments predominant (16/25)	> 330 µm	PE, PP, PS (6/25*)	0.004 to 9200 particles/m ³	→ ← fibers
	Sediment and sand (27)	Fragments predominant (15/27)		PE (10/27*)	0.3-2175 particles/kg	fragments Pellets
Laboratory exposures	Water (24)	Beads, spheres (21/24); MPs from environment (3/24)	500 nm to 2 mm; < 100 μm (15/25)	PS, PE, PVC (21/25)	42.10 ⁶ to 1.10 ¹² beads/m ³	beads
	Sediment (1)	Spheres	130 µm	PVC	110 particles/kg	

When mentioned (in 6 out of 25 studies), the type of MPs found in natural waters was PE and at times additional PP or PS. All of the waterborne exposure studies were conducted with PE or PS, with some exceptions for PVC and PP, which seems to be consistent with the field. As regards the MP types found in sediment field samples, despite their low density, PE was widely predominant when the MP type was mentioned, and was also sometimes associated with PP, PVC and PS. The polymers used for sediment exposures were PVC or PS, which do not predominate in the field. In laboratory exposures, even when the choice of polymers was consistent with those found in the field, medium contaminations were usually carried out with only one type of polymer, whereas the MPs present in the field are known to be a mix of many types of plastic. Nevertheless, the justification for use of PE or PS in laboratory exposures could be that they represent 36% of total production of plastics (Andrady and Neal, 2009). Moreover, PVC is likely to have been used in sediment exposures because it is denser than water and consequently flows and accumulates in sediment. As mentioned above, while PE with low density can be found in field sediments due to the colonization of organisms and adsorption of compounds, it remains difficult to mimic the phenomenon in laboratory experiments. The use of low density PE for sediment exposure would lead to transfer of MPs from the sediment to the water column, which could modify exposure modalities.

Whether the exposure studies were for waterborne or sediment-containing environments, in terms of forms most of the time the MPs employed for exposures, were commercialized microspheres with precise and regular sizes whereas in the field, the reported MPs presented high polydispersity in size with various irregular forms, such as fragments, fibers or filaments. These microspheres can mimic the primary MPs but not the secondary MPs that are predominant in the environment.

In order to take into account these numerous and important differences between exposure conditions and exposome, some authors (Graham and Thompson, 2009; Nobre et al., 2015) have used MPs extracted from environmental samples to carry out medium contaminations. In their findings, MPs from marine samples were more in line with exposome, *i.e.*, MPs with a variety of types and of various sizes as well as irregular and different forms. Moreover, as previously mentioned, MPs from marine environments could be colonized by organisms and constitute the sorption support for many organic compounds present in the environment, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorines (DDEs) ... To mimic organic compound sorption, Rochman et al. (2014) deployed PE pellets in marine areas during 3 months to obtain MPs more similar to those found in the environment. In addition, the levels of plastic additives, like phthalates or bisphenol A, in MPs found in the environment should be lower than commercialized plastic polymers since the time spent in marine water is likely to lead to a desorption of these compounds. In contrast, commercialized polymers are likely to contain higher levels of additives, except if they are polymers without additives, which are not currently commercially available in microsphere shapes.

4.2. Do the toxicity effects reported on a wide range of aquatic organisms, exposed to MPs in laboratories reflect environmental reality?

It remains difficult to conclude that experimental exposures are likely to mimic environmental conditions in terms of MP contamination. Since laboratory MP contaminations are not always consistent with environmental conditions the toxicity effects observed on organisms exposed to MPs in laboratory cannot reflect the reality encountered in the field.

All the laboratory experiments were performed with MP concentrations in greater orders of magnitude than those found in the field in order to depict the associated toxicity mechanisms. Consequently, the ingestion and associated effects observed in organisms corresponded to highly pronounced contaminant stress. Studies employing environmental MP levels are challenging since the available analytical tools do not yet permit identification of the biological effects occurring at low concentrations of exposure. However, in the next decades environmental MP loads are not likely to decrease since plastic, with its numerous advantages, is more and more massively used. In this context, the study of biological impacts on organisms after exposure to high concentrations of MP may be of considerable interest.
N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

In addition to the problems associated with highly variable MP concentrations, it is difficult to differentiate and separately measure the mechanical and the chemical effects of MPs on organisms. It would be interesting to determine whether the toxicity effects are due to the presence of particles or else related to the polymer nature or to the MP size and form. For example, Avio et al. (2015) showed that the majority of the observed biological variations on exposed organisms (immunological, lysosomal, cholinesterasic and antioxidant effects) were not influenced by the type of polymer (PE vs PS). In order to determine the mechanical effects, the use of particles similar to MPs in laboratory exposures, except in their nature (glass particles for example), could be useful.

As it is now well-established that MPs play the role of vectors of organic compounds such as plastic additives or organic pollutants, to marine organisms (Teuten et al., 2007; Browne et al., 2013; Besseling et al., 2013), so as to create more environmentally realistic conditions, a few impact studies have used MPs associated with organic pollutants. The organic compounds include nonylphenol, triclosan, pyrene, polybromodiphenylethers (PBDEs), PAHs, PCBs (Browne et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Chua et al., 2014; Avio et al., 2015) which are known to cause toxic effects by themselves (Meeker et al., 2009; Oehlmann et al., 2009; Talsness et al., 2009; Vidal-Linan et al., 2015). Consequently, the presence of these compounds in MPs generated an additional effect, rendering it difficult to determine from where the toxicity arises. As a result, most studies have tried to differentiate the effects of the MPs from the effects of sorbed organic compounds through exposure experiments performed with MPs mixed or not mixed with organic compounds. In general, in these studies the different organisms exposed to virgin or contaminated MPs exhibited different effects, [lugworms (Arenicola marina), mussels (M. galloprovincialis), common goby (Pomatoschistus microps)], suggesting that impacts were induced by physical ingestion of the particles and the chemical toxicity of the adsorbed organic compounds.

In the case of Rochman et al. (2013, 2014), they used virgin pellets and pellets previously deployed during 3 months in marine urban areas for exposure to Japanese medaka (O. latipes). They reported that in a marine environment, PE MPs sorbed environmentally relevant concentrations of contaminants. They also found effects on gene expression (down-regulation of choriogenin) in males exposed to marine-plastic treatment, whereas gene expression (down-regulation of vitellogenin, choriogenin and the estrogen receptor) was altered in female fish exposed to both marineand virgin-plastic treatment, suggesting that the ingestion of these plastic debris (and the associated chemical pollutants) at environmentally relevant concentrations may alter endocrine system function in fish.

In order to ensure more environmentally representative studies, the toxicity of two different types of PE, i.e., virgin or beachstranded plastic pellets, on the embryonic development of an Echinodermata (L. variegatus) were studied by Nobre et al. (2015). The toxicity of stranded pellets was found to be lower than that of virgin pellets. As shown by Rochman et al. (2013, 2014), pellets from beach had greater concentrations of hydrophobic pollutants than did virgin pellets. Nevertheless, the authors suggested that plastic pellets acted as a vector of pollutants, especially for plastic additives found on virgin particles, and also suggested that the toxicity of leached chemicals from pellets could depend on the environmental compartment in which the pellets accumulated. This is the only study highlighting the effects of potential plastic additives, which is obviously highly important. While the choice of the nature of polymer could have no effect as observed by Oliveira et al. (2013), the use of raw polymers with or without additives has to be taken into account when biological effects are studied

through laboratory exposure.

5. Conclusion

There is an urgent need to establish standardized protocols for sampling, sample preparation, MP analysis and data expression so as to facilitate the comparison of field studies. It would be helpful to better define exposome in view of producing laboratory exposure conditions that would be more consistent with the natural environment. Guidelines should also be introduced to better mimic environmental conditions and translate into realistic biological effects. Many investigations have got to be continued: (i) study of organic compound sorption on MPs taking different abiotic factors into account, (ii) mechanical and chemical toxicity evaluation of exposures to MPs associated with to organic compounds under realistic environmental conditions, (iii) evaluation of biological effects after exposure to MPs at different levels of the biological organization using several approaches such as "omic" methods (genomic, transcriptomic, metabolomic), biochemical and behavioral biomarkers. New investigations have also got to be carried on aimed at broadening the MP size ranges studied to "nanoplastics", which are challenging because of a need for new and more efficient analysis methods. To conclude, MPs toxic for organisms are likely to be present in many marine environments, raising the risk of severe alterations to human health.

References

- Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 364, 1977–1984.
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62, 1596-1605.
- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. In: Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris. NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30.NOAA, p. 530. Silver Spring, September 9–11, 2008.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. Environ. Pollut. 198, 211–222. Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philos. Trans. R. Soc. B 2020. 1005. 1009.
- 364, 1985-1998.
- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of microplastic on fitness and PCB bio-accumulation by the Lugworm Arenicola marina (L.). Environ. Sci. Technol. 47, 593-600.
- Besselinga, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzerc, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale Megaptera novaeangliae. Mar. Pollut. Bull. 95, 248-252,
- Boerger, C.M., Lattin, G.L., Moore, S.L., Moore, C.J., 2010. Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. Mar. Pollut. Bull. 60, -2278.
- Bond, A.L., Provencher, J.F., Daoust, P.Y., Lucas, Z.N., 2014, Plastic ingestion by fulmars and shearwaters at Sable Island, Nova Scotia, Canada. Mar. Pollut. Bull. 87, 68 - 75

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Microplastic – an emerging contaminant of potential concern. Integr. Environ. Assess. Manage. 3, 559–566.

- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, Mytilus edulis (L.). Environ. Sci. Technol. 42, 5026–5031. Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial patterns of plastic debris
- along estuarine shorelines. Environ. Sci. Technol. 44, 3404–3409.Browne, M.A., Niven, S.J., Galloway, T.S., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2013.Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions
- linked to health and biodiversity. Curr. Biol. 23, 2388–2392. Bravo Rebolledo, E.L., van Franeker, J.A., Jansen, O.E., Brasseur, S.M., 2013. Plastic
- ingestion by harbour seals (Phoca vitulina) in The Netherlands. Mar. Pollut. Bull 67 (1), 200–202.
- Buchanan, J.B., 1971. Pollution by synthetic fibers. Mar. Pollut. Bull. 2, 23. Carpenter, E.J., Smith, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. Science 175, 1240 - 1241
- Carson, H.S., Colbert, S.L., Kaylor, M.J., McDermid, K.J., 2011. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. Mar. Pollut. Bull. 62, 1708-1713.
- Chapman, P.M., Wang, F., 2001. Assessing sediment contamination in estuaries.

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

Environ, Toxicol, Chem, 20, 3-22,

- Chua, E., Shimeta, J., Nugegoda, D., Morrison, P.D., Clarke, B.O., 2014. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, Allorchestes compressa. Environ. Sci. Technol. 48, 8127–8134. Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C.R., 2011.
- Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Mar. Pollut. Bull. 62, 2199–2204.
- 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. Mar. Pollut. Bull. 70, 227–233. Codina-García, M., Militão, T., Moreno, J., González-Solís, J., 2013. Plastic debris in
- Codina-Carcia, M., Militao, L., Moreno, J., Conzalez-solis, J., 2013. Plastic debris in Mediterranean seabirds. Mar. Pollut. Bull. 77, 220–226.
 Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. Environ. Sci. Technol. 47, 6646–6655.
 Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, 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.
- Collignon, A., Hecq., I.H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A., 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Mar. Pollut, Bull, 64, 861-864,
- Collignon, A., Hecq, J.H., Galgani, F., Collard, F., Goffart, A., 2014. Annual variation in neustonic micro- and meso-plastic particles and zooplankton in the Bay of Calvi
- (Mediterranean–Corsica). Mar. Pollut. Bull. 79, 293–298.Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., Araujo, M.C.B., Spengler, A., Tourinho, P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. Environ. Monit. Assess. 168, 299-304.
- Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubeda, B., Gálvez, J.Á., Irigoien, X., Duarte, C.M., 2015. Plastic accumulation in the Mediterranean sea. PLoS One. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121762. De Sa, L.C., Luís, L.G., Guilhermino, L., 2015. Effects of microplastics on juveniles of
- the common goby (Pomatoschistus microps): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. Environ. Pollut. 196, 359–362.
 De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K.,
- Robbers, J., 2014. Quality assessment of the blue mussel (Mythus edulis): comparison between commercial and wild types. Mar. Pollut. Bull. 85, 146–155. Dekiff, J.H., Remy, D., Klasmeier, J., Fries, E., 2014. Occurrence and spatial distribu-
- tion of microplastics in sediments from Norderney, Environ, Pollut. 186, 248-256
- Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull. 44, 842-852.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread dis-tribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. Mar. Pollut. Bull. 79, 94–99. Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of microplastics by
- zooplankton in the northeast Pacific ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 320-330.
- Devriese, L.I., Van de Meulen, M.D., Maes, T., 2015. Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. Mar. Pollut. Bull. 98, 179–187.
- Doyle, M.J., Watson, W., Bowlin, N.M., Sheavly, S.B., 2011. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific ocean. Mar. Environ. Res. 71, 41–52. Engler, R.E., 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environ. Sci. Technol. 46, 12302–12315.
- Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Mar. Pollut. Bull. 68, 71–76.
- Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: Mytilus edulis (L) to Carcinus maenas (L). Environ. Pollut. 177, 1–3.Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R.,
- 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (Balaenoptera physalus). Mar. Pollut. Bull. 64, 2374-2379.
- Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. Mar. Pollut. Bull. 85, 156–163.
- Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identifi-cation of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. Environ. Sci. Processes mpacts 15, 1949-1956.
- Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances ovjesition in an endemic pelagic insect. Biol. Lett. 8, 817–820. Goldstein, M.C., Titmus, A.J., Ford, M., 2013. Scales of spatial heterogeneity of plastic
- marine debris in the Northeast Pacific Ocean. PLoS One. http://dx.d 10.1371/journal.pone.0080020.
- Graham, E.R., Thompson, J.T., 2009. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 368, 22–29. Gregory, M.R., 1977. Plastic pellets on New Zealand beaches. Mar. Pollut. Bull. 8,
- 82-84 Gregory, M.R., 1983. Virgin plastic granules on some beaches of Eastern Canada and
- Gregory, M.K., 1963, Virgin plastic granules on some beaches of Eastern Canada and Bermuda. Mar. Environ. Res. 10, 73–92.
 Harrison, J.P., Schratzberger, M., Sapp, M., Osborn, A.M., 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. BMC Microbiol. 14, 232–247.

- Hidalgo-Ruiz, V., Thiel, M., 2013, Distribution and abundance of small plastic debris
- Hidalgo-Kuiz, V., Hitel, M., 2013. Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. Mar. Environ. Res. 87–88, 12–18.
 Hidalgo-Ruiz, V., Gutow, L., Thompson, L.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. Environ. Sci. Technol. 46, 3060–3075.
 Ivar Do Sul, J.A., Spengler, A., Costa, M.F., 2009. Here, there and everywhere. Small
- plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic). Mar. Pollut, Bull. 58, 1236-1238.
- Western Atlantic). Mar. Pollut. Bull. 58, 1236–1238.
 Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., Barletta, M., Cysneiros, F.J.A., 2013. Pelagic microplastics around an archipelago of the Equatorial Atlantic. Mar. Pollut. Bull. 75, 305–309.
 Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., et al., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–771.
- Jayasiri, H.B., Purushothaman, C.S., Vennila, A., 2013. Quantitative analysis of plastic debris on recreational beaches in Mumbai, India. Mar. Pollut. Bull. 77, 107–112. Khordagui, H.K., Abu-Hilal, A.H., 1994. Industrial plastic on the southern beaches of the Arabian Gulf and the western beaches of the Gulf of Oman. Environ. Pollut.

- microplastics from beaches in slovenia, Mar. Politic. Bull. 89, 350–366.
 Lattin, G.L., Moore, C.J., Zellers, A.F., Moore, S.L., Weisberg, S.B., 2004. A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore. Mar. Pollut. Bull. 49, 291–294.
 Law, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic sub-tropical gyre. Science 329, 1185–1188.
 Lee, J. Hong, S. Song, Y.K. Hong, S.H. Lang, Y.C. Lang, M. Heo, N.W. Han, C.M.
- Lee, J., Hong, S., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, Y.C., Jang, M., Heo, N.W., Han, G.M., Lee, M.J., Kang, D., Shim, W.J., 2013. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. Mar. Pollut. Bull. 77, 349-354.
- Lucia, G.A., Caliani, I., Marra, S., Camedda, A., Coppa, S., Alcaro, L., Campani, T., Giannetti, M., Coppola, D., Cicero, A.M., Panti, C., Baini, M., Guerranti, C., Marsili, L., Massero, G., Fossi, M.C., Matiddi, M., 2014. Amount and distribution Marsin, E., Massero, G., Osa, M.C., Matada, M., 2014. Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). Mar. Environ. Res. 100, 10–16. Lusher, A.L., McHugh, M., Thompson, R.C., 2013. Occurrence of microplastics in the
- gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. Mar. Pollut. Bull. 67. 94–99.
- Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R., 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. Mar. Pollut. Bull. 88, 325-333.
- Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Mar. Pollut. Bull. 81, 69–79. McDermid, K.J., McMullen, T.L., 2004. Quantitative analysis of small-plastic debris
- on beaches in the Hawaiian Archipelago. Mar. Pollut. Bull. 48, 790–794. Meeker, J.D., Sathyanarayana, S., Swan, S.H., 2009. Phthalates and other additives in
- plastics: human exposure and associated health outcomes. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2097–2113.
- b 304, 2097–2113. Mohamed Nor, N.H., Obbard, J.P., 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. Mar, Pollut. Bull. 79, 278–283. Moore, C.J., Moore, S.L., Leecaster, M.K., Weisberg, S.B., 2001. A comparison of plastic
- and plankton in the north Pacific central gyre. Mar. Pollut. Bull. 42, 1297–1300. Moore, C.J., Moore, S.L., Weisberg, S.B., Lattin, G.L., Zellers, A.F., 2002. A comparison
- of neustonic plastic and zooplankton abundance in southern California's waters. Mar. Pollut. Bull. 44, 1035–1038.
- Moore, C.J., Lattin, G.L., Zellers, A.F., 2005. A brief analysis of organic pollutants sorbed to pre and postproduction plastic particles from the Los Angeles and San
- Solbed to be and postproduction plastic particles from the zon Angeles and San Gabriel River Watersheds. In: Proceedings of the Plastic Debris Rivers to Sea Conference. Algalita Marine Research Foundation, Long Beach, CA. Morét-Ferguson, S., Law, K.L., Proskurowski, G., Murphy, E.K., Peacock, E.E., Reddy, C.M., 2010. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. Mar. Pollut. Bull. 60, 1873–1878.
- Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean Nephrops norvegicus (Linnaeus, 1758). Mar. Pollut. Bull. 62, 1207–1217.
- Ng, K.L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. Mar. Pollut. Bull. 52, 761–767.
 Nobre, C.R., Santana, M.F.M., Maluf, A., Cortez, F.S., Cesar, A., Pereira, C.D.S., Turra, A., 2015. Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin Lytechinus variegatus (Echinodermata: Echinoidea). Mar. Pollut. Bull. 92. 99-104.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2047–2062. Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L., 2013. Single and combined
- effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Ecol. Indic. 34, 641–647.
- Reddy, M.S., Basha, S., Adimurthy, S., Ramachandraiah, G., 2006. Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. Estuar. Coast. Shelf Sci. 68, 656–660.
- Reisser, J., Shaw, J., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Proietti, M., Thums, M., Pattiaratchi, C., 2013. Marine plastic pollution in waters around Australia: characteristics,

N.N. Phuong et al. / Environmental Pollution 211 (2016) 111-123

and pathways. PLoS One. http://dx.doi.org/10.1371/ concentrations, ournal pone 0080466

- Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S.J., 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. Sci. Rep. 3, 3263. Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014. Early warning signs of endocrine
- disruption from the ingestion of plastic debris in the adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Sci. Total Environ. 493, 656–661. Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches
- to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment, Trends Anal, Chem 65, 47-53,
- Ryan, P., Jackson, S., 1987. The lifespan of ingested plastic particles in seabirds and their effect on digestive efficiency. Mar. Pollut. Bull. 18, 217–219.
 Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 1999–2012. Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of
- microplastics in the planktonic food web. Environ. Pollut. 185, 77–83. Shaw, D.G., Day, R.H., 1994. Colour- and form-dependent loss of plastic microdebris
- Shaw, D.S., Day, K.H., 1994. Colour- and form-dependent loss of plastic microbiols from the North Pacific Ocean. Mar. Pollut. Bull. 28, 39–43.
 Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for hu-man health. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2079–2096.
 Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.A., Watanuki, Y., 2013. Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marina elastic: Philos Philosophile 2016.
- marine plastics. Mar. Pollut, Bull. 69, 219–222. Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics
- Feuten, EL, Kowiand, SJ, Galloway, E.J., Holmpson, K.C., 2007. Foterital tor phastics to transport hydrophobic contaminants. Environ. Sci. Technol. 41, 7759–7764.
 Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of the binding formulation to the service and the relative formulation. chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2027-2045.
- Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., McGonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? Science 304, 838.

- Thompson, R.C., Moore, C.J., Saal, F.S., Swan, S.H., 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 2153-2166.
- Turner, A., Holmes, L., 2011, Occurrence, distribution and characteristics of beached plastic production pellets on the island of Malta (central Mediterranean). Mar. Pollut, Bull, 62, 377-381.
- Van Cauwenberghe, L. Jansen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environ. Pollut, 193, 65–70.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015. Microplastics are taken up by mussels (*Mytlus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. Environ. Pollut. 199, 10–17.
 van Franeker, J.A., Law, K.L., 2015. Seabirds, gyres and global trends in plastic
- pollution. Environ. Pollut. 203, 89–96. Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., Da Ros, L.
- 2013. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: first ob-servations on occurrence, spatial patterns and identification. Estuar. Coast. Shelf Sci. 130, 54-61. Vidal-Linan, L., Bellas, J., Salgueiro-Gonzalez, N., Muniategui, S., Beiras, R., 2015.
- Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholines-terase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in Mytilus gallo-
- provincialis mussel gilla. Environ. Pollut. 200, 133–139. Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and effects of microplastics on orells and tissue of the blue mussel Mytilus edulis L, after an exper-imental exposure. Environ. Sci. Technol. 46, 11327–11335.
- Miental exposure. Environ. Sci. recliniol. 40, 11327–11353.
 Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. Curr. Biol. 23, 1031–1033.
 Woodall, L.C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L.J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy. B.E., Thompson, R.C., 2014. The deep sea is a major sink for microplastic debris. R. Soc. Open Sci. 1, 140317.
- Yamashita, R., Tanimuro, A., 2007. Floating plastic in the Kuroshio current area, western North Pacific ocean. Mar. Pollut. Bull. 54, 485–488. Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the "Plastisphere": mi-
- crobial communities on plastic marine debris. Environ. Sci. Technol. 47, 7137-7146 Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., Li, D., 2014. Suspended microplastics in the surface water
- of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distri-bution. Mar. Pollut. Bull. 86, 562–568.

I.2.5.1 Actualisation des données de microplastiques dans les eaux marines

L'intérêt des scientifiques et du grand public dans l'évaluation de la contamination en MP de l'environnement a augmenté ces dernières années, tout autour du globe, avec une quantité de publications à ce sujet qui augmente exponentiellement. Afin d'évaluer le risque environnemental, il est nécessaire de caractériser les niveaux de contamination. En moins de deux ans, plus de 20 articles ont été publiés sur la contamination des eaux marines (**tableau 1.4**) et viennent s'ajouter aux publications (plus de 20) déjà existantes.

Au total, près de 56 zones différentes du globe terrestre ont été étudiées, dont 27 durant les deux dernières années. Au regard des différents sites d'étude et des continents correspondants, l'Europe représente un peu moins de la moitié des études, alors que l'Amérique, très étudiée jusqu'en 2015, l'est beaucoup moins ces dernières années. Des investigations ont récemment commencé au large de l'Afrique, dans le cadre d'une étude de Kanhai et al. (2017) qui a porté sur plus de 13 000 km de côtes dans l'océan Atlantique. La zone centrale de la côte Est de l'Asie est également un peu plus étudiée mais, dans l'immédiat, encore aucun travail ne concerne le Vietnam.

Continent	Site d'étude	Quantité de particules	Microplastiques (type/forme)	Références
	Groenland	2,38 /m ³	Polyester 53%, PE 23%	Amélineau et al., 2016
Amérique	Baie de San Francisco	700 000 /km ²	Fragment prédominant	Sutton et al., 2016
	Mexique	$0,04 - 2,44 \ /m^3$	MP (80%), Fragment	Diaz-Torres et al., 2017
Afrique	Namibie (Atlantique)	8,5 /m ³	Polyastar fibras (04%)	Kanhai at al 2017
Anique	Maroc (Atlantique)	6 à 6,5 /m ³	Folyester, libres (94%)	Kaliliai et al., 2017
	Golfe Arabique	1 460 000 /km ²	PE+PP, fibre (93,8 %)	Abayomi et al., 2017
	Qatar	$0,73 \ /m^3$	PP, PE	Castillo et al., 2016
Asia	Japon	0,08 /m ³	MP (0,3 à 5 mm)	Isobe, 2016
Asie	Indonésie	$0,27 - 0,54 \ /m^3$	PP (68%), PE (11%)	Syakti et al., 2017
	Hongkong	$0,51 - 279 \ /m^3$	PE, PP	Tsang et al., 2017
	Chinois	$0,33 \pm 0,34 \ /m^3$	PE, PP, PS	Zhang et al., 2017
Océanie	Mer de Tasman	3700 /km ²	PS, PE, PP	Rudduck et al., 2017
	Atlantique (Nord-Est)	70,8 /m ³	Polyester, fibre	Courtene-Jones et al., 2017
	France (Atlantique)	$0,24 \pm 0,35 \ /m^3$	PE, PP	Frere et al., 2017
	Mer de Sardaigne	$0,16 \pm 0,31 \ /m^3$	MP (0,2 à 5 mm)	Fossi et al., 2016
	Mer de Ligurie	$0,49 \pm 1,66 \ /m^3$	MP (0,2 à 5 mm)	Fossi et al., 2016
	Mer Adriatique	406 000 /km ²	PE (>80 %)	Gajst et al., 2016
	Mer Baltique	420 000 /km ²	PE+PP (77%)	Gewert et al., 2017
	Turquie	0,38 /m ²	Fragment, film (90%)	Gundogdu and Cevik, 2017
Europe	Atlantique nord	10-250 000 /km ² 5 x10 ⁵ -7 x10 ⁶ /km ²	MP (1-5mm), PE MP (0,02-1mm), PE	Ter Halle et al., 2017
	Atlantique	$1,15 \pm 1,45 \ /m^3$	Polvester fibres (94%)	Kanhai et al 2017
	Portugal	$3,5 / m^3$	Toryester, nores (9470)	Kanna et al., 2017
	Mer du nord	27 000 /m ³	Fibre (50%), Blue (21%)	Karlsson et al., 2017
	Baie de Marseille	96 000 /km ²	(1-5 mm ²) prédominant	
	Golfe du Lion	212 000 /km ²	(<1 mm ²) prédominant	Schmidt et al 2018
	France (Méditerranée)	34000-113000 /km ²		
	Angleterre	1,39 /m ³	Fibre (77%), Blue (50%)	Steer et al., 2017

Tableau 1.4: sites d'étude, quantité, type/forme de MP retrouvés dans les eaux marines.

La comparaison du tableau 1 de la revue et du tableau 1.4 montre que les études les plus récentes se sont beaucoup plus attelées à la caractérisation des MP en essayant systématiquement d'identifier leur nature, de mesurer leur taille, alors que les études réalisées jusqu'en 2015 se sont plutôt basées sur une observation générale de la forme, en identifiant assez peu souvent le type de matériau plastique. Les résultats récents montrent que les MP de PE et PP sont majoritairement retrouvés dans les eaux marines ce qui semble cohérent avec leur production et leur utilisation massive à l'échelle du globe. Malgré la difficulté de comparer les résultats issus de différents protocoles, il semblerait que la quantité de MP dans les eaux marines ait augmenté au cours du temps comme la conséquence de leur accumulation dans l'environnement dû à leur longue durée de vie. La zone la plus contaminée identifiée dans la Nord-Est de l'océan Pacifique avec est au les quantités reportée revue suivantes : 448 000 particules par km² (Goldstein et al., 2013) et 9 200 par m³ (Desforges et al., 2014). L'actualisation des résultats montrent de nouveaux « hot-spots » de contamination en MP avec jusqu'à 7 millions de particules par km² dans l'Atlantique Nord (Ter Halle et al., 2017) et 27 000 particules par m³ dans la mer du Nord (Karlsson et al., 2017).

I.2.5.2 Actualisation des données concernant les microplastiques dans les sables et sédiments

Aux trente et une études portant sur les MP dans les sables et sédiments publiées jusqu'en 2015, un nombre équivalent d'études se sont ajoutées ces deux dernières années. L'évolution des sites d'études est la même que pour les eaux marines : l'Europe est bien représentée, les études en Amérique ont diminué alors que celles en Asie augmentent et que l'Afrique apparaît (**tableau 1.5**).

Continent	Site d'étude	Quantité de particules	Microplastiques (type or forme)	Références
Amérique	Canada**	760 /kg	PE, PS	Ballent et al., 2016
-	Canada**	4,15 /échantillon	Fibres (76,8%)	Crichton et al., 2017
	Uruguay*	25 /m ²	Fragments et « pellets » (73,6 %)	Lozoya et al., 2016
	Brésil*	0 - 160 /m ²	« Pellets » plastiques	Moreira et al., 2016
	Mexique**	2000 – 69 000 /kg	Fibres, blanc	Retama et al., 2016
Asie	Qatar*	13,5 /kg	Films et fibres (84,5 %)	Abayomi et al. 2017
	Chine*	3 146 /m ²	MP (98%), EPS	Fok et al. 2017
	Taiwan*	320 - 42560 /m ³	PE, PP (87%), fragments (81,7%)	Kunz et al. 2017
	Japon**	100 - 1900/kg	PE, PP (fragments)	Matsuguma et al., 2017
	Chine**	$121 \pm 9 / kg$	Fibres	Peng et al., 2017
	Hongkong**	47 - 279/kg	PE, PP	Tsang et al., 2017
	Chine*	102 - 163 /kg	PE, PS	Yu et al., 2016
Afrique	Afrique de sud**	401 750 /kg	PE, copolymères	Matsuguma et al., 2017
	Afrique de sud**	700 - 3300 /kg	Fibres bleues et noires	Nel and Froneman, 2015
Océanie	Australie**	3 400 /L	Filaments (84%)	Ling et al., 2017
Europe	Espagne**	$0,9 \pm 0,1 \ /g$	Bleus et noirs	Alomar et al., 2016
	Norvège**	42 - 6595 /kg	< 25µm (80%), CPE	Bergmann et al., 2017
	Angleterre**	3030 /kg	Fibres bleues, PTFE	Blumenroder et al., 2017
	Italie**	62 - 1069 /kg	Bleus et noirs	Cannas et al., 2017
	Angleterre**	$67,4 \pm 13,2 \text{ /kg}$	PE et éthylène copolymères	Coppock et al., 2017
	Mer de Baltique*	1,3 - 36,3 /kg	Plastiques expansés	Esiukova, 2017
	France Atlantique**	$0,97 \pm 2,08$ /kg	PE, PP	Frere et al., 2017
	Mer Baltique**	25 - 53 /kg	Fibres en polyester	Graca et al., 2017
	Italie**	45 - 1069 /kg	Filaments	Guerranti et al., 2017
	Océan Indien**	$35,8 \pm 42,5 \ /m^2$	PE, PP (92%), fragments (52%)	Imhof et al. 2017
	Pays-Bas**	$48\pm55~/m^2$	Fibres (50%), bleu (21%)	Karlsson et al. 2017
	Mer du Nord**	100 - 3600 /kg	Sphères	Leslie et al., 2017
	Europe (23 côtes)** France (Normandie)**	72 - 1512 /kg 143 -156 /kg	PE, PP, PS Bleus et noirs (78-92 %)	Lots et al., 2017
	Allemagne**	0 - 7 /kg	Fibres	Stolte et al 2015

Tableau 1.5: sites d'étude, quantité, type/forme de MP retrouvés dans les sables et sédiments.

* : sables ; ** : sédiments

Concernant la nature des MP retrouvés dans les sables et les sédiments, une plus grande variété de types de plastiques a été retrouvée, comparée au compartiment aquatique. Les PE et PP restent majoritaires mais d'autres types de matériaux plastiques sont aussi reportés comme les PS, les EPS, les polyester, les PTFE, ces derniers étant particulièrement denses (Blumenroder et al., 2017). Ces résultats peuvent s'expliquer par la plus grande vitesse de sédimentation des MP constitués de polymères plus denses que l'eau ou encore par une augmentation de la densité des particules de polymères moins denses lors de leur colonisation par des micro-organismes ou bien par sorption de matières organiques. Bien que cela soit moins fréquent, les résultats sont difficilement comparables car leurs unités d'expression des sont souvent différentes d'un article à un autre. Cela souligne encore un besoin de standardisation des méthodes d'analyse et d'expression des résultats.

I.2.5.3 Actualisation des données concernant les microplastiques retrouvés dans les organismes marins

Plus d'une vingtaine de travaux ont été publiés, entre juillet 2015 et début 2018, sur les MP retrouvés dans les animaux marins (**tableau 1.6**). Ils s'ajoutent à la quinzaine répertoriée dans la table 3 de la revue d'articles. Ces études portent sur de nombreuses espèces animales, avec trois familles particulièrement représentées : les bivalves, les poissons et les oiseaux.

Famille	Espèce	Microplastiques type ou forme	Quantité de MP ou fréquence de contamination	Références
Zooplancton	23 espèces (larves de poisson)	Fibres bleues (66%)	2,9% (N=347)	Steer et al., 2017
	Copépodes	Fibres (70%), polyester	4,1 – 131,5 MP/m ³	Sun et al., 2017
	Chétognathes			
	Méduses			
	Crevettes			
	Larves de poisson			
Bivalves	Mytilus edulis	Fibres	2,5 MP/g frais	Catarino et al., 2016
		Fibres (50%)	6 000 – 107 000 MP/kg sec	Karlsson et al., 2017
		Fibres	19 – 105 MP/g sec	Leslie et al., 2017
		Fibres	0,9 – 4,6 MP/g frais	Li et al., 2016
		Formes irrégulières	Non estimé	Santana et al., 2016
		Fibres	0 - 0.32 MP/g frais	Vandermeersch et al., 2015
	Mytilus galloprovincialis	Fibres	0,04 – 0,34 MP/g frais	Vandermeersch et al., 2015
	Crassostrea gigas	Fibres	30 - 87 MP/g sec	Leslie et al., 2017
	9 espèces	Fibres	2,1 – 10,5 MP/g frais	Li et al., 2015
Crustacés	Eriocheir sinensis	Filaments, gris	13% (N=302)	Fudalewska et al., 2016
	Isopoda sp.	Fibres (24%), noires et bleues	4 000 – 109 000 MP/kg sec	Karlsson et al., 2017
	Hemigrapsus sanguineus		26 000 – 43 000 MP/kg sec	
	Gammarus spp.	Fibres	11 MP/g sec	Leslie et al., 2017
	Nephrops norvegicus	PP, nylon, fibres	67% (N=1450)	Welden and Cowie, 2016
Gastéropodes	Colus jeffreysianus	Fibres, fragments	28,6% (N=7)	Courtene-Jones et al., 2017
	Turritellidae sp	Fibres (24%), noires et bleues	2 000 - 19 000 MP/kg sec	Karlsson et al., 2017
	Littorina littorea		2 000 - 35 000 MP/kg sec	
		Fibres	20 MP/g sec	Leslie et al., 2017
Eponges	Hymenacidon perlevis	Fibres (24%), noires et bleues	25 000 – 57 000 MP/kg sec	Karlsson et al., 2017
Cnidaires	Actinia equina	Fibres (24%), noires et bleues	4 000 - 20 000 MP/kg sec	Karlsson et al., 2017
Echinodermes	Ophiura sp.	Fibres (24%), noires et bleues	38 000 – 113 000 MP/kg sec	Karlsson et al., 2017
	Ophiomusium lymani	Fibres, fragments	40% (N=40)	Courtene-Jones et al., 2017
	Hymenaster pellucidus		74% (N=19)	

Tableau 1.6: Type et quantité de MP retrouvés dans les animaux marins.

Poissons	Sardina pilchardus	PE, fragments	19% (N=99)	Avio et al., 2015b
	Squalus acanthias		44% (N=9)	
	Merluccius merluccius		100% (N=3)	
	Mullus barbatus		64% (N=11)	
	Chelidonichthys lucernus		67% (N=3)	
	Scyliorhinus canicula	Fibres 71%	15,3% (N=72)	Bellas et al., 2016
	Merluccius merluccius		18,8% (N=12)	
	Mullus barbatus		16,7% (N=128)	
	21 espèces	Fibres, transparentes et cellophane	Entre $1,1 \pm 0,3$ et $7,2 \pm 2,8$ MP/ind ⁽¹⁾	Jabeen et al., 2017
	Salmo trutta	PE, PS	68% (N=62)	Karlsson et al., 2017
	Gadusmorhua	Fragments, films	2,4% (N=205)	Liboiron et al., 2016
	Pleuronectes platessa	Polyamide (68,2%), noir et	$0,9 \pm 1,79 \text{ MP/ind}$	Murphy et al., 2017
	Platichthys flesus	voilé (64,9 %)	0.8 ± 0.94 MP/ind	
	Limanda limanda		$1,3 \pm 1,67$ MP/ind	
	Lepidorhombus whiffiagonis		$0,1 \pm 0,32$ MP/ind	
	Argentina silus		$0,1 \pm 0,26$ MP/ind	
	Boops boops	Filaments	$3,75 \pm 0,25$ MP/ind	Nadal and Deudero, 2016
Oiseaux	12 espèces	Fragments et « pellets »	De 12% à 100%	Acampora et al., 2016
	Phalacrocorax carbo	« pellets »	3,2% (N=121)	Acampora et al., 2017
	Alle alle	Fibres	8,99 à 9,99 MP/ind	Amélineau et al., 2016
	Ptychoramphus aleuticus	« pellets »	41,5% (N=171)	Floren and Shugart, 2017
	Pelagodroma marina	PE (73%), Fragments (84%)	79% (N=263) de 4,2 à 5,4 MP/ind	Furtado et al., 2016
	Fulmarus glacialis	« pellets »	89,5% (N=143)	Terepocki et al., 2017
	Ardenna grisea		64% (N=25)	
Reptiles	Caretta caretta	PE, PP (80%), fragments	MP (25%),	Pham et al., 2017
		(68%)	15.8 ± 6.1 MP/ind	

(1) ind pour individu

La présence de MP est confirmée dans de nombreux organismes, avec des pourcentages variés en fonction des espèces, allant de 3,2% chez une espèce d'oiseau (*Phalacrocorax carbo*) à 100% chez certains poissons (*Merluccius merluccius*) et d'autres espèces d'oiseaux (**tableau 1.6**). Des études complémentaires en écotoxicologie sont nécessaires pour comprendre si l'exposition et la bioaccumulation des MP dans les organismes vivants peuvent engendrer des effets sur ces organismes et l'écosystème. Cette problématique fait l'objet de la partie 3 de la revue d'article mais n'a pas été réactualisée dans le contexte de ce manuscrit. Quels que soient les effets démontrés, il semble urgent d'essayer d'améliorer les systèmes de gestion des déchets pour limiter l'accumulation des MP dans l'environnement.

I.2.6 Microplastiques et contaminants organiques

I.2.6.1 Etudes du milieu naturel

Suite à leur fabrication, leur utilisation et leur devenir dans l'environnement, les matières plastiques ont des compositions, initialement multiples, qui sont susceptibles d'évoluer dans le temps. En effet, ils représentent des cocktails des contaminants organiques, qui peuvent être liés aux additifs variés, ajoutés au cours de leur fabrication, ou encore à des contaminants présents dans l'environnement, plutôt hydrophobes et capables de se sorber. Le phénomène de sorption correspond à l'absorption et/ou l'adsorption. En effet, les contaminants environnementaux, peuvent créer des interactions de surface avec les matériaux plastique, faisant intervenir des phénomènes d'adsorption/désorption, mais également une migration dans la masse plastique correspondant alors à des phénomènes d'absorption/diffusion (Ogata et al., 2009 ; Rios et al., 2007 ; Teuten et al., 2007 ; 2009). De par leur composition et leur capacité de sorption/désorption, les plastiques vont pouvoir transporter des contaminants organiques sur de très longues distances. Les matériaux plastiques peuvent être considérés comme des sources ou des réserves de contaminants organiques. Par conséquent, des contaminants organiques ont été quantifiés sur des débris en matériau plastique collectés dans le milieu marin, tout autour du monde. Par ailleurs, lorsque les débris plastiques se fragmentent pour donner des MP, les organismes vivants sont conjointement exposés aux MP et aux contaminants organiques. Les MP sont donc susceptibles de jouer un rôle de vecteur de contamination au travers du contact ou de l'ingestion de MP. De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser la capacité des MP à sorber les contaminants organiques. Elles sont répertoriées dans le tableau 1.7.

Chapitre I

Matrice	Sita d'átuda	Tuna da MD	ΣΗΑΡ	ΣΡCΒ	Pesticides	Autre CO	Dáfárangas
d'origine	Sile a elude	Type de Mr	$(ng.g^{-1})$	$(ng.g^{-1})$	$(ng.g^{-1})$	$(ng.g^{-1})$	References
Eau	Pacifique nord	Fragments PE	12-868	3-78	DDT: 0-2	NP: 24-997	Hirai et al., 2011
						BPA: 0-283	
			1.5.0.1			PBDE: <59	
		Fragments PP	16-24	1-4	DDT: 0,5-0,6	NP: 6	
			110	1.4		PBDE: <9909	
	Pacifique nord	Fragments PP	112	14	DD1: 0,8	NP: 135	
	Man daa aanoihaa	Encomente DE	105	20	DDT: 4.9	PBDE: 0	
	wher des caraibes	Fragments PE	105	29	DD1: 4,8	$\mathbf{NP}: \mathbf{JO}$ $\mathbf{RDA} \cdot 1$	
						PRDE: 16	
		Fragments PP	88	1	$DDT \cdot 0.4$	NP· 159	
		T fuginentis T T	00	1		BPA: 3	
						PBDE: 9	
	Japon	« pellets » PP	-	117	DDE: 3,1	NP: 9	Mato et al., 2001
	Hawaï - USA	Fragments, «pellets»	9200	nd	nd	-	Rios et al., 2007
	Pacifique nord	Fragments (PE et PP)	nd-14459	nd-2856	nd-454	-	Rios et al., 2010
	Pacifique nord	Fragments (PE, PP, PUR, nylon)	nd-846	nd-223	nd	-	Rios Mendoza and Jones, 2015
	Pacifique nord	Fragments PE	100-959	1–23	DDE: 0,1-4,7	BPA: 5-284 PBDE: 0 4-57	Teuten et al., 2009
	Japon					BPA: <25	
	1					PBDE: 0,9-2	
	Corée du sud	Fragments EPS				HBCD: <4608	Jang et al., 2017
	Asie du sud					HBCD: <29	
	Asie du nord					HBCD: <274	
	Pérou					HBCD: <4810	
	Canada					HBCD: <4090	
C / l'an ant	USA Destruce1	nallata DE	52 44900	2 222	DDT: 0.42.41	HBCD: <14500	Automas et al. 2012
seament	Portugal	« pellets » PE	55-44800	2-223	DD1: 0,42-41	-	Endo et al. 2005
et sable	Japon Drásil	« pellets » PE et PP	-	<2300	-	-	Endo et al., 2005
	Brásil	« pellets »	130-27733	-	-	-	Fisher et al., 2015
	DICSII	« pellets » FE	40-0000	-	-	-	1151101 et al., 2017
	Belgique	« pellets »	105-7895	7.2-236.3	-	-	Gauquie et al., 2015
Sédiment et sable	Hawaï - USA Pacifique nord Pacifique nord Pacifique nord Japon Corée du sud Asie du sud Asie du nord Pérou Canada USA Portugal Japon Brésil Brésil Belgique	Fragments, «pellets» Fragments (PE et PP) Fragments (PE, PP, PUR, nylon) Fragments PE Fragments EPS	9200 nd-14459 nd-846 100-959 53-44800 - 130-27735 40-6835 871-9852 105-7895	nd nd-2856 nd-223 1–23 1–23 2-223 <2300 - - - 7,2-236,3	nd nd-454 nd DDE: 0,1-4,7 DDT: 0,42-41 - - - -	- - - - BPA: 5-284 PBDE: 0,4-57 BPA: <25 PBDE: 0,9-2 HBCD: <4608 HBCD: <29 HBCD: <274 HBCD: <274 HBCD: <4810 HBCD: <4090 HBCD: <14500 - - - -	Rios et al., 2007 Rios et al., 2010 Rios Mendoza and Jones 2015 Teuten et al., 2009 Jang et al., 2017 Antunes et al., 2017 Endo et al., 2013 Fisner et al., 2013 Fisner et al., 2017 Gauquie et al., 2015

Tableau 1.7: Type de MP issus du milieu marin et concentrations en contaminants organiques extraits.

Chapitre I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sédiment et sable	Costa Rica	Fragments PE	1-25	1-61	DDT: 0,6-23,2	NP: 2-33 BPA: 0-730	Hirai et al., 2011
(suite)						PBDE: <6	
· · ·		Fragments PP	33-284	1-17	DDT: 1,6-124,4	NP: <3936	
		C				BPA: 0,4-35	
						PBDE: <180	
	Japon	Fragments PE	0-9297	2-436	DDT: 0,2-198	NP: 1-706	
						BPA: 0-0,5	
						PBDE: <1,6	
		Fragments PP	106-270	2-71	DDT: 0-5,9	NP: 9-22	
						BPA: <2,8	
						PBDE: <3	
	USA	Fragments PE	79-656	178-399	DDT: 4,1-7	NP: <1,1	
						BPA: <6,8	
		Enservente DD	20.279	15 110		PBDE: <41	
		Fragments PP	39-378	15-119	DD1: 2,2-8,4	NP: /-130	
						PRDE < 26	
	Vietnam	Fragments PF	359-389	9-26	DDT: 11-108	NP: < 0.9	
	vietnam	Tragments T L	557 507	20		PBDE: <7	
		Fragments PP	73-2024	3-102	DDT: 14-99	NP: <551	
		8				BPA: 0-264	
						PBDE: <412	
	Pacifique	« pellets »	-	0,1-9,9	DDT: 0,7-3,4 ; HCH: 0,2-1,6	-	Heskett et al., 2012
	Atlantique	-	-	7-9	DDT: 3,4-4,1 ; HCH: 0,6-19,3	-	
	Indien		-	6,5	DDT: 3,4 ; HCH: 1,7	-	
	Mer de caraïbes		-	1,7	DDT: 3,1 ; HCH: 0,8	-	
	Grèce	« pellets » PE	100-500	0-290	DDT: 1,1-42 ; HCH: 1,05-3,5	-	Kanapanagioti et al., 2011
	Vietnam	« pellets »	-	4-8	DDT: 12,3-14,1 ; HCH: 1,23	-	Le et al., 2016
	Japon	« pellets » PP	-	3,97-97,5	DDE: 0,16-2	NP: <16	Mato et al., 2001
	Portugal	« pellets » PE	50-24000	10-310	DDT: 0-49 ; HCH: 0-3,3	-	Mizukawa et al., 2013
	Australie	« pellets » PE	-	16	DDE: 6,69 ; HCH: 0,14-0,19	-	Ogata et al., 2009
	Japon		-	5-453	DDE: 2,16-11,7	-	
					HCH: 0,52-1,04		
	USA		-	32-605	DDE: 5,09-267 ; HCH: <0,94	-	
	Afrique du sud		-	41	DDE: 2,13 ; HCH: 33,9	-	
	Hawaï - USA	Fragments PP	nd-6 200	nd-980	nd-1100	-	Rios et al., 2007

Sédiment	Brésil	« pellets »	40,2-1256	77,7-1295	DDT: 8,9-441 ; HCH: 0,59-3,14	-	Taniguchi et al., 2016
et sable	Japon	Fragments PE	60-9370	12-254	DDE: 0,2-276	-	Teuten et al., 2009
(suite)	USA	Fragments « pellets »	30-1900	nd-47	DDT: nd-76	-	Van et al., 2012
		(PS et autres)					
Organisme	Brésil	« pellets »	-	491	DDT: 68	-	Colabuono et al., 2010
(oiseau)		Fragments	-	243-418	DDT: 64,4-87,7	-	

nd : non détecté ; - : non déterminé;

PE : polyéthylène, PP : polypropylène, PUR : polyuréthane, EPS : polystyrène expansé et PS : polystyrène ;

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; PCB : polychlorobiphényles ; DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane ; DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène ; HCH : hexachlorocyclohexane ; NP : nonylphénol ; BPA : bisphénol A ; PBDE : polybromodiphényléthers et HBCD : hexabromocyclododécane.

Comme le montre le tableau 1.7, les principaux contaminants environnementaux recherchés MP sont les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques sur les (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les retardateurs de flamme bromés (polybromodiphényléthers (PBDE) et hexabromocyclododécane (HBCD)) et deux pesticides : le lindane (hexachlorocyclohexane, HCH) et le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), ainsi que l'un de ses produits de dégradation le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE). Ces contaminants organiques possèdent des propriétés plus ou moins grandes de persistance, de bioaccumulation, de mobilité et de toxicité (ce sont des perturbateurs endocriniens pour la plupart). Leur origine est exclusivement anthropique, excepté les HAP qui peuvent également provenir de phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques ou des feux de forêt. À ce jour, il existe des règlementations et/ou conventions au niveau national et international visant à contrôler, réduire ou éliminer leurs rejets dans l'environnement. Par exemple, la convention de Stockholm est entrée en vigueur en 2004 pour les 152 pays signataires, afin d'interdire l'utilisation de certaines substances chimiques appelées 'Polluants Organiques Persistants' (POP) dont les PCB font partie. Ces composés étaient principalement employés dans des peintures, des transformateurs électriques, des condensateurs etc. Cette convention préconisait également de restreindre l'utilisation du DDT employé pour ses propriétés insecticides. En 2009, neuf nouvelles substances ont été ajoutées à la liste établie par la convention, dont l'HCH, qui est un insecticide, et les PBDE, employés principalement comme retardateurs de flamme. Les HAP ne sont pas considérés comme des POP selon la convention de Stockholm mais ils sont répertoriés en tant que tels dans le protocole d'Aarhus, traité international entré en vigueur en 2003, au même titre que le DDT, l'HCH, les PCB et certains PBDE. Les HAP sont des constituants naturels du charbon et du pétrole et peuvent provenir de la combustion incomplète de matières organiques telles que les carburants, le bois, le tabac, etc. De par leurs caractéristiques, ces contaminants sont ubiquistes et représentent l'exposome environnemental.

Les alkylphénols (AP), et notamment le nonylphénol (NP) ainsi que le bisphénol A (BPA), ont également été recherchés sur les MP dans certaines études (**tableau 1.7**) pour les mêmes raisons que les composés précédents (persistance, bioaccumulation, mobilité et toxicité). Comme indiqué plus haut, dans la partie sur les additifs plastiques, l'activité de perturbation endocrinienne de ces composés a été mise en évidence ces dix dernières d'années, ce qui a conduit à les considérer comme des contaminants (Madigou et al., 2001; Ricciardi et al., 2008; Vidal-Linan et al., 2015). A l'inverse des autres contaminants environnementaux, les AP et le BPA entrent également dans la composition de certains polymères comme plastifiants. Ils sont utilisés aussi comme antioxydants et détergents mais aucune restriction d'utilisation n'a encore

été émise par les autorités, exceptées celle des éthoxylates de nonylphénol, dans les articles textiles, selon la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals : Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques).

S'il est assez facile de comprendre que les contaminants organiques désorbés des MP et n'entrant pas dans la fabrication des matières plastiques (PCB, HAP, retardateurs de flamme, pesticides) proviennent du milieu environnemental, il est plus difficile de déterminer l'origine des AP. Ils peuvent être issus de leur sorption aux MP comme les autres contaminants organiques, mais aussi de la matière plastique potentiellement fabriquée à partir de ces additifs. Une étude comparative des concentrations de divers contaminants organiques (NP *vs* PCB) dans le milieu marin et en surface des MP a permis de montrer que la source principale en 4-NP serait plutôt la matière plastique (Mato et al., 2002).

La nature du polymère a été démontrée comme étant un facteur d'influence de la sorption des contaminants organiques. Hirai et al. (2011) ont observé par exemple que la concentration en contaminants organiques désorbée de fragments de PP était supérieure à celle obtenue pour les fragments de PE alors qu'ils provenaient tous du même site d'échantillonnage.

Finalement, diverses études ont mesuré les concentrations en contaminants organiques dans des MP et des tissus d'oiseaux (Tanaka et al., 2013), de poissons (Anh et al., 2017) et de baleines (Fossi et al., 2016) provenant des mêmes sites d'échantillonnage. Des corrélations plus ou moins nettes entre ces concentrations ont permis de mettre en exergue le rôle de vecteur de contamination organique des MP.

Le **tableau 1.7** montre qu'aucune étude publiée n'a encore rapporté de sorption de principes actifs médicamenteux (antibiotiques, analgésiques, antiépileptiques, etc.), cosmétiques ou d'hygiène corporelle sur les MP. Ils sont pourtant bien étudiés depuis quelques dizaines d'années et également retrouvés dans le milieu environnemental (Caliman and Gavrilescu, 2009). Leur présence dans l'environnement est potentiellement problématique car ils sont susceptibles de provoquer des effets sur les organismes à des faibles concentrations.

I.2.6.2 Etudes en laboratoire

Les interactions de sorption entre les MP et les contaminants organiques ont fait l'objet de plusieurs études depuis le début des années 2000 et particulièrement ces cinq dernières années. Les objectifs visés sont triples avec une meilleure compréhension des mécanismes, la détermination des facteurs d'influence et l'évaluation du rôle des MP comme vecteurs de contaminants organiques aux organismes vivants. La détermination du coefficient de distribution est courante dans les travaux. Il est noté K_d et permet de traduire la capacité de sorption des contaminants organiques sur les MP. Il représente la distribution des contaminants organiques entre deux phases, ici liquide et solide, à l'équilibre. Afin de pouvoir l'exprimer, il est important de se trouver à l'équilibre et pour cela la cinétique de sorption des contaminants organiques sur les MP doit être étudiée.

Le **tableau 1.8** présente les études de sorption réalisées entre les MP et les contaminants organiques. Plusieurs contaminants organiques modèles ont été étudiés, avec plusieurs types de MP (Bakir et al., 2012; 2014; Daugherty, 2017; Teuten et al., 2007). Le choix des différents types de matériaux plastiques a été fait de manière à être représentatif des MP retrouvés dans l'environnement tout comme celui des contaminants organiques, puisqu'ils font partie des principales familles des contaminants environnementaux évoqués plus haut.

Chapitre I

Ν	Aicroplastique	es (MP)	Contaminant	organique	Conditions expérimentales	Dáfárancas
Nature	Taille (µm)	Concentration	Nature	Concentration (µg/L)	Conditions experimentales	References
PE, PVC	200–250	10 mg/25 mL	Phénanthrène	0,8–3,1	24–72h à l'obscurité	Bakir et al., 2012
			DDT	0,8–1,7	35 PSU/ 220 tpm/ 18-20°C	
			mélange des deux		-	
			Phénanthrène	0,6–6,1	24–360h à l'obscurité	Bakir et al., 2014a
			DDT	0,3–2,4	35 PSU/ 220 tpm/ 18-20°C	
			PFOA	0,01–0,1		
			DEHP	1,5–5		
			Phénanthrène	0,6–6,1	24–360h à l'obscurité	Bakir et al., 2014b
			DDT	0,8–3,1	0 ; 8,8 ; 17,5 ; 26,3 et 35 PSU/	
					220 tpm/ 18–20°C	
PE, PP	250-300	30 mg/40 mL	Tonalide, 4–MBC,	20 à 100	48h à l'obscurité	Daughety, 2017
		C	Triclosan, 17β-estradiol		33 PSU/ agitation/ 23°C	
			· •		avec ou sans matière organique	
PA, PP, PS	3000-5000	1000 mg/50 mL	Metformine,	100 000 et 20	24h à l'obscurité	Goedecke et al., 2017
		U	Difénoconazole		1 et 35 PSU/ 0-240 tpm/ 23°C	
					рН 6-8	
PE, PP,	<2000	0,15–0,32 mg/mL	Phénanthrène	100	164 jours à l'obscurité	Karapanagioti and
POM,	2000-3000	-			0 et 35 PSU/ agitation/23°C	Klontza, 2008
PE, PP,	200-250	10 mg/25 mL	Phénanthrène	17 μM	24–72h à l'obscurité	Teuten et al., 2007
PVC		C		·	35 PSU/ 220 tpm/ 18-20°C	
					L	
PE, PS,	100-150	10 mg/50 mL	Pyrène	0-100	48h à l'obscurité	Wang and Wang, 2018
PVC		U	2		0 PSU/ 200 tpm/ 25°C	
PE	250-280	10-50 mg/60 mL	Carbamazépine, Triclosan,	10, 20, 50, 100 et 200	168 h à l'obscurité	Wu et al., 2016
		0	4-MBC.	, , ,	0.5–35 PSU/ agitation	,
			17α-éthinylestradiol		<i>, , , ,</i>	
PP	180-5000		PCB 77	1 000	24h à l'obscurité	Zhan et al., 2016
					Eau douce, eau salée et hexane/	
					agitation/ 19, 21, 23, 25 et 27°C	

Tableau 1.8: Travaux portant sur la sorption de contaminants organiques sur les microplastiques.

PE : polyéthylène, PP : polypropylène, PVC : polychlorure de vinyle ; PS : polystyrène ; POM : polyoxyméthylène

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane ; PFOA : acide perfluorooctanoïque ; DEHP : phtalate de di-2-éthylhexyle et 4–MBC : méthylbenzylidène camphre.

PSU = practical salinity unit = unité de salinité pratique; tpm = tour par minute

De façon générale, trois facteurs principaux ont été étudiés dans les travaux présentés dans le **tableau 1.8** : les MP (leur type, leur taille et leur concentration), les contaminants modèles (leur nature et leur concentration) et les conditions expérimentales (la salinité, la lumière, l'effet de l'agitation, la température, le pH, la présence de matières organiques).

• Les microplastiques

Les tailles de MP étudiées jusqu'ici sont comprises entre quelques centaines de micromètres et quelques millimètres. Des MP de taille plus petite, de l'ordre de la dizaine de micromètres, voire même du nanomètre, n'ont pas encore été à l'étude. Même si leur nature est représentative de l'environnement, les concentrations utilisées lors des expérimentations sont bien plus élevées que celles pouvant être retrouvées dans l'environnement. Ces choix de concentrations peuvent tout de même se justifier puisque l'objectif de ces travaux est plutôt axé sur la détermination des mécanismes de sorption. Teuten et al. (2007) ont rapporté que la nature du plastique joue un rôle prépondérant dans la sorption du phénanthrène puisque les valeurs du coefficient de distribution (K_d) déterminées étaient de 38100, 2190 et 1650 respectivement pour le PE, le PP et le PVC. En faisant varier la taille des MP de PVC, ces mêmes auteurs ont également démontré que plus la taille des MP est petite, plus la capacité de sorption du phénanthrène est grande, avec des valeurs de K_d égales à 1650 et 1690 respectivement pour des tailles de 200–250 μ m et 130 μ m, cette variation étant toutefois minime.

• Les contaminants organiques

La nature des contaminants influence également les mécanismes de sorption sur les MP. Par exemple, Bakir et al. (2014a) ont montré que le DDT est plus sorbé que le phénanthrène sur des MP de PVC. Ce résultat suggère l'influence de l'hydrophobicité des contaminants organiques sur leur capacité à se sorber. La valeur mesurée du K_d pour le phénanthrène (log K_{ow} = 4,5) est de 2 300 L/kg alors que celle du DDT (log K_{ow} = 6,36) atteint plus de 100 000 L/kg. Pareillement, Wu et al. (2016) ont travaillé sur la sorption de quatre contaminants organiques sur des MP de PE. Les K_{ow} étaient compris entre 2,45 (carbamazépine) et 5,10 (4-MBC) permettant d'expliquer la valeur du K_d du 4-MBC supérieure à celle de la carbamazépine d'un facteur d'environ 3 000. L'utilisation de mélanges de contaminants organiques a également permis de mettre en évidence des phénomènes de compétition entre les contaminants organiques (Bakir et al., 2012).

• Les conditions expérimentales

De façon générale, toutes les études ont été réalisées dans l'obscurité, afin d'éviter la dégradation photolytique des contaminants organiques et/ou des MP. Les autres conditions expérimentales testées sont variables pour ce qui concerne l'agitation, la salinité, le pH, la température, la présence de matières organiques et la durée (tableau 1.8). L'agitation permettant de diminuer les temps d'équilibrage est relativement forte, avec des vitesses d'agitation souvent supérieures à 200 tours par minute. L'étude de Goedecke et al. (2017) a montré que l'agitation influence significativement les mécanismes de sorption, alors que la salinité et le pH semblent être des facteurs peu influants. D'autres auteurs ont conclu que la salinité joue sur la capacité de sorption qui est plus grande dans l'eau salée que dans l'eau douce (Karapanagioti and Klontza, 2008; Zhan et al., 2016). De plus, la présence de matières organiques engendrerait une diminution de la sorption des contaminants organiques sur les MP. Les MP se trouveraient en compétition avec la matière organique. Daugherty. (2017) a montré que la tonalide était sorbée en plus grande quantité sur des MP de PE en absence de matières organiques. En revanche, la présence de matière organique entraînerait une diminution de la capacité de sorption du triclosan, du 4-MBC et du 17a-éthinylestradiol mais pas de la carbamazépine sur des MP de PE (Wu et al., 2016). La durée d'expérimentation dans les études du tableau 1.8 varie entre 24 heures et 164 jours. Selon Zhan et al. (2016) la sorption du PCB 77 sur des MP de PP est à l'équilibre au bout de huit heures alors que Karapanagioti and Klontza (2008) ont montré que l'équilibre n'était toujours pas atteint après 168 heures pour le phénanthrène et des MP de PP et PE. En fonction de la nature des MP et des contaminants organiques, Rochman et al. (2013b; 2013c) ont montré que dans des conditions environnementales, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre peut varier de deux mois à plus d'un an.

Si les études des mécanismes de sorption sont importantes pour estimer le transport des contaminants organiques par les MP, les études sur les mécanismes de désorption le sont tout autant, afin d'évaluer les transferts de contamination, c'est-à-dire si les MP peuvent être considérés comme des réservoirs ou des sources de contaminants, en fonction des conditions. Cela étant, peu d'études ont été réalisées sur l'évaluation de la désorption des contaminants organiques (Bakir et al., 2014a; 2014b; Teuten et al., 2007). Bakir et al. (2014a) se sont même placés dans des conditions qui miment celles de l'intestin d'organismes marins afin d'évaluer si la désorption des contaminants organiques à partir des MP peut se produire mettant en évidence une vectorisation des contaminants organiques par les MP. Dans cette étude, la

désorption des contaminants organiques dans des conditions intestinales a été évaluée à plus de 30 fois celle dans l'eau de mer. Pour aller plus loin dans l'évaluation du transfert de contaminants organiques des MP vers les organismes, et des effets biologiques potentiellement associés, des expositions en laboratoires ont été menées mais dans des conditions qui étaient, dans la plupart des études, bien différentes de celles de l'environnement, comme cela est reporté dans la revue d'article insérée dans ce chapitre bibliographique.

I.3 Bilan et objectifs de la thèse

Cette étude bibliographique a permis, dans un premier temps de bien caractériser ce que sont les plastiques et de montrer qu'ils jouent un rôle fondamental dans notre quotidien. En effet, leur production ne cesse d'augmenter, la demande sociétale est forte et pour autant les modes de traitement de ces matières, une fois devenues déchets, ne sont pas optimales. De ce fait, de nombreux déchets de plastiques se retrouvent dans l'environnement et vont subir des transformations, notamment une fragmentation, qui va engendrer une nouvelle menace potentielle pour la préservation des écosystèmes : les microplastiques (MP).

La problématique des MP est relativement récente dans le domaine de l'écotoxicologie. Ils peuvent provenir de la fragmentation des déchets, comme expliqué plus haut, mais également de produits du quotidien qui en contiennent. Les sources sont donc diffuses et leurs devenirs sont variés en fonction de leur nature, leur taille, leur colonisation, etc. Ils sont donc ubiquitaires et de nombreuses études ont porté sur la détermination des niveaux de contamination environnementale, sans qu'une standardisation des méthodes d'analyse ne soit apparue. Outre le fait qu'ils puissent être bioaccumulés dans les organismes marins, et potentiellement engendrer des effets délétères sur ces derniers, les MP sont également susceptibles de transporter et transférer des contaminants organiques issus de leur fabrication ou de la sorption de contaminants environnementaux.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a tout d'abord été dédié à l'évaluation de la contamination en MP de deux espèces de bivalve : la moule bleue (*Mytilus edulis*) et l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Le fort poids socio-économique de ces deux espèces dans la région des Pays de la Loire, voire même au niveau national, a été l'une des motivations majeures à cette partie du travail doctoral. Afin d'atteindre ce premier objectif, le développement d'un protocole d'analyse des MP dans des matrices biologiques a dû être réalisé au préalable. Le chapitre 2 de ce manuscrit est consacré à la présentation du protocole mis au point et à déterminer si certains facteurs comme le site d'étude, la saison ou le mode de vie des organismes pouvaient avoir un impact sur leur contamination. Le troisième chapitre présente ensuite une mise au point d'un protocole d'analyse des MP dans la matrice sédimentaire et son application aux sédiments issus des mêmes sites, en fonction des saisons de prélèvement des bivalves. Des hypothèses sur le transfert de contamination des compartiments abiotiques vers les organismes seront émises et discutées. Finalement, une étude préliminaire de la sorption sur des MP modèles de contaminants organiques ayant des polarités variables sera présentée dans le quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit. **Chapitre II:**

DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE ET EVALUATION DE LA CONTAMINATION EN MICROPLASTIQUES DE DEUX BIVALVES

Liste des articles:

Article n°2 : Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (<u>Mytilus edulis</u>): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast

Publié dans le journal **"Environmental Science and Pollution Research"** 25 : 6135-6144 en 2018

Article n°3 : Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life?

Publié dans le journal "Marine Pollution Bulletin" 129 : 664-674 en 2018

Un des principaux objectifs de ce travail doctoral était de caractériser la contamination du milieu marin en microplastiques. Ce chapitre du manuscrit est dédié au compartiment biologique avec pour cibles deux espèces de bivalves présentant un fort poids socioéconomique, que ce soit au niveau régional ou national, la moules bleue (Mytilus edulis) et l'huître creuse (Crassostrea gigas). L'intérêt d'étudier ces deux espèces marines ne réside pas seulement au niveau socio-économique, il se trouve également au niveau écologique puisque ce sont des espèces filtreuses, bioaccumulatrices, sédentaires, abondantes, avant une grande aire de répartition, ce qui permet de les considérer et de les utiliser comme de bons bioindicateurs de la qualité du milieu marin. De plus, ces espèces faisant partie intégrante de l'alimentation humaine, l'étude de leur contamination permet également d'évaluer l'exposition de l'homme aux contaminants permettant indirectement d'évaluer des risques sanitaires. L'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre a permis de mettre en évidence la nécessité de développer des protocoles analytiques permettant l'extraction et la caractérisation des MP issus d'organismes vivants ou de leurs tissus. La première partie de ce chapitre portera donc sur le développement d'un protocole qui a été publié dans le journal « Environmental Science and Pollution Research ». Puis, il sera appliqué à des organismes issus de la côte Atlantique de la Région Pays de la Loire, collectés selon une stratégie d'échantillonnage permettant de réaliser un monitoring de l'environnement tout en mettant en avant l'effet potentiel de certains facteurs sur la contamination. Un deuxième article publié dans le journal « Marine Pollution Bulletin » relate les résultats obtenus et correspond à la deuxième partie de ce chapitre.

II.1 Développement d'un protocole de quantification et de caractérisation des microplastiques dans la moule bleue

Le développement du protocole d'analyse des MP dans la moule bleue (*Mytilus edulis*) a commencé par un état de l'art spécifique. Les protocoles publiés décrivent les étapes successives que sont : le choix des organismes, la digestion, la sédimentation, la filtration et la caractérisation des MP. Ces travaux ont été le point de départ des réflexions et des expérimentations réalisées pour atteindre l'objectif de ce travail. Le début de cette partie de chapitre sera consacrée à la justification des choix réalisés, au regard de l'état de l'art et des résultats expérimentaux obtenus, afin de développer un protocole d'analyse qualitative et quantitative des MP applicable à la moule bleue. L'article correspondant à ce travail sera présenté par la suite.

II.1.1 Justification des choix lors du développement de la méthode d'analyse

II.1.1.1 Choix des organismes

Toutes les études réalisées jusqu'ici sur les bivalves ont porté sur des organismes de taille adulte comme le montre le **tableau 2.1**. Ce choix est justifié par le fait que ce sont ceux consommés par l'homme. L'exposition de l'homme aux MP au travers de son alimentation peut donc être partiellement évaluée. Certains auteurs utilisent la longueur des coquilles pour décrire les bivalves choisis (Claessens et al., 2013 ; Mathalon and Hill, 2014 ; Li et al., 2015), d'autres la masse des tissus frais (Catarino et al., 2016 ; Dehaut et al., 2016). Dans le cadre de cette étude, des moules ayant une taille de coquille de 4 cm environ ont été choisies (ainsi que des huîtres de 9 cm pour le monitoring environnemental).

Etape	Critère	Choix	Références ^(a)
	Taille	Adule	[1-5]
		Magasin	[2-3]
	Origine	Sauvages	[1-2], [4-5]
Echantillonnage		Cultivées	[1-2]
	Dápuration ou	Rinçage	[3], [5]
	Deputation ou Rincage	Dépuration	[1]
	Kiliçage	-	[1], [2], [4]
		HNO ₃	[1]
		H_2O_2	[2]
Digestion	Réactif	HNO ₃ -HClO ₄	[3]
		Enzyme protéase	[4]
		КОН	[5]
	Oui	NaCl	[2]
Sédimentation	Oui	Na_2WO_4	[5]
	Non	-	[1], [3-4]
	Noturo	Nitrate de cellulose (5 µm)	[1-2]
Filtration	(porosité) du	Fibre verre (0,7 ou 1,6 µm)	[1], [4-5]
Fillation	(porosite) du	Nitrocellulose (0,8 µm)	[2], [4]
	mue	Papier filtre	[3]
		Spectroscopie Raman	[1], [5]
Identification	Technique	Microscope à lumière polarisée	[1]
Identification	reeninque	Observation sous microscope	[2-4]
		µFT-IR en mode transmission	[2]
Contrôle qualité	Blancs		[1-4]
	Dopages		[1-2], [4-5]

Tableau 2.1: Choix des critères des différentes étapes des protocoles d'analyse des MP réalisés sur des bivalves.

^(a): Références correspondant au protocole de [1] Claessens et al. (2013) et ses applications (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015; Santana et al., 2016); [2] Mathalon and Hill, (2014) et ses applications (Li et al., 2015; 2016); [3] De Witte et al. (2014); [4] Catarino et al. (2016) et [5] Dehaut et al. (2016).

Avant de commencer l'étape de digestion des tissus, la façon de préparer les bivalves varient en fonction des études. Certaines études commencent par une phase de dépuration des organismes qui dure 24h (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014 ; Van Cauwenberghe et al., 2015). Cette phase permet aux organismes d'éliminer le contenu de leur tractus digestif comme les sables, des matières inorganiques et potentiellement certains MP. D'autres études ont entrepris un rinçage des tissus des bivalves à l'eau MilliQ après avoir ôté leurs coquilles (De Witte et al., 2014 ; Dehaut et al., 2016). Le but du rinçage est de n'étudier que les MP qui auraient traversé des membranes biologiques, en écartant ceux restés à la surface de l'organisme ou présents dans la cavité de la coquille. La position qui a été adoptée dans ce travail était de ne pas réaliser de dépuration, ni de rinçage des organismes afin de considérer tous les MP existant dans et à la surface de l'organisme.

Dans le but de développer la méthode d'analyse des MP, des moules avaient été achetées en magasin par mesure de simplicité. Il apparaitra dans la suite de ce chapitre que l'origine des moules a toute son importance.

II.1.1.2 Digestion

L'étape de digestion qui suit la collecte et la préparation des bivalves est primordiale afin d'éliminer le maximum de matière organique, ce qui limiterait le repérage microscopique et gênerait la caractérisation des MP. Son efficacité est principalement dépendante du réactif utilisé. Les réactifs utilisés peuvent être classés en quatre catégories :

- les acides forts avec l'acide nitrique (HNO₃) utilisé pour la 1^{ère} fois dans l'étude de Claessens et al. (2013), puis appliqué par d'autres auteurs (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015; Santana et al., 2016). Celui-ci a parfois été mélangé à l'acide perchlorique (HClO₄) en 2014 (De Witte et al., 2014);
- les oxydants forts avec l'utilisation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) initiée par Mathalon and Hill, (2014). Ce protocole a par la suite été adapté par d'autres auteurs (Li et al., 2015; 2016);
- les **enzymes** dans l'étude de Catarino et al. (2016)
- et les bases fortes, précisément l'hydroxyde de potassium (KOH), mis en œuvre par Dehaut et al. (2016).

Dans le cadre de cette étude, afin de choisir le ou les réactifs pour la digestion des organismes, l'efficacité de chacun, seul ou en mélange, a été déterminée dans les mêmes conditions (volume, temps de mise en contact, température et temps de chauffage, filtre, etc.). Puis,

l'abattement de la matière organique a été calculé en divisant la masse obtenue après filtration par la masse de tissus frais soumise à digestion. La comparaison des valeurs d'abattement et la facilité de mise en œuvre ont permis de déterminer le réactif le plus efficace, en termes de digestion.

Tous les réactifs ont permis d'obtenir de relativement bonnes valeurs d'abattement comprises entre 97,2 et 99,8%. Des essais de digestion utilisant l'H₂O₂ seul ont été réalisés et n'apparaissent pas dans l'article qui suit car son efficacité étaient bien éloignée des autres, même après 5 jours de mise en contact. Pourtant, trois études avaient préalablement été réalisées, en utilisant l'H₂O₂, et menaient à de bons résultats (Mathalon and Hill, 2014; Li et al., 2015; 2016). La différence d'efficacité observée pourrait s'expliquer par les différentes valeurs du ratio volume d'H₂O₂/masse de tissus qui était 20 fois plus élevé dans les précédentes études (200 mL/5 g *vs* 20 mL/environ 10 g pour 3 moules). A la suite de la comparaison des résultats d'abattement, KOH 10% (m/v) et HNO₃ 65% (m/v) ont été retenus pour continuer le développement analytique de la méthode, dans le but de déterminer le volume à utiliser, le temps de contact, la chauffe et l'agitation optimaux pour la digestion.

Au cours des essais, l'utilisation d'HNO₃ a présenté un inconvénient majeur qui est l'apparition de mousse, comme le montre l'image I-2 sur la **figure 2.1**.



Figure 2.1: Photos prises lors de la digestion des tissus de 3 moules (I) avec HNO₃ 65% (m/v): I-1 : au début ; I-2 : en cours et I-3 : après filtration et (II) avec KOH 10% (m/v) après filtration

En effet, la mousse est difficile à entrainer lorsque la solution est transférée d'un contenant à l'autre, ce qui pourrait engendrer une perte des MP restés dans la mousse. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les mauvais recouvrements obtenus avec HNO₃, comme présenté dans l'article qui suit, lors de la validation de la méthode par dopage des échantillons à l'aide de MP modèles. Finalement une solution de KOH à 10% (m/v) a été retenue pour son efficacité de digestion et sa facilité d'utilisation.

II.1.1.3 Sédimentation

Une étape de sédimentation n'est pas toujours réalisée dans les protocoles issus de l'état de l'art, comme le montre le **tableau 2.1**. Seules deux études ont procédé à cette étape afin d'améliorer la séparation des MP et la matière inorganique et organique restante après digestion. Mathalon and Hill, (2014) et Dehaut et al. (2016) ont utilisé respectivement des solutions de NaCl saturé et de Na₂WO₄, ce qui permet d'augmenter la densité des solutions et de favoriser la récupération des MP.

Lors de la mise au point du protocole utilisant des moules achetées en magasin, cette étape de sédimentation n'est pas apparue nécessaire car les filtres obtenus après digestion ne présentaient plus beaucoup de matières organiques et peu de matières minérales. Mais, lorsque des moules prélevées sur le terrain ont été utilisées pour appliquer le protocole, une grande quantité de matières minérales ont été récupérées sur le filtre, limitant la caractérisation et la quantification des MP. L'ajout d'une telle étape au protocole était devenu indispensable. La difficulté de cette étape réside dans l'utilisation d'une solution qui soit suffisamment dense pour permettre la flottaison des MP, tout en assurant la sédimentation d'un maximum de matières minérales et organiques restantes. Plusieurs tests ont été réalisés en utilisant des MP modèles de PVC (matière plastique plus dense que l'eau). L'idée de départ était de laisser décanter la solution obtenue après digestion dans du KOH 10% (m/v). Malheureusement, les MP de PVC sédimentaient dans le fond car la solution n'était pas assez dense. Par conséquent, d'autres tests ont été réalisés en utilisant des solutions de NaCl à différentes concentrations et de KI à 50% (m/v). KI a été choisi sur la base de l'état de l'art. En effet, l'emploi de NaI a été reporté dans la littérature, dans les protocoles d'analyse des sédiments utilisant une étape de sédimentation. Les résultats ont montré que les solutions de NaCl, même saturées, ne permettent pas d'assurer la flottaison de la totalité des MP de PVC. Par contre, cet objectif est atteint lors de l'utilisation de KI à 50% (m/v). En parallèle, la quantité de matières minérales récupérée sur le filtre était nettement diminuée, et suffisamment limitée, pour permettre d'identifier les MP en µFT-IR. Afin de limiter l'utilisation de KI, pour des raisons environnementales et de coût, cette étape a été réalisée avec deux sédimentations successives qui utilisaient chacune 20 mL de KI à 50% (m/v) contre une seule étape avec 100 mL. L'ampoule à décanter était la verrerie adéquate pour réaliser cela puisque le robinet présentait un orifice suffisamment grand pour permettre la récupération des particules les plus lourdes (les 10 mL du bas). Finalement, l'ajout de cette étape dans le protocole final a été validé par

l'étude d'échantillons dopés en MP de PE, PP et PVC et l'obtention de valeurs de recouvrement comprises entre 70 et 100% (Voir Fig.2 publication Phuong et al. 2018a).

II.1.1.4 Filtration

Le choix du filtre pour l'étape de filtration doit être basé sur trois critères :

- la nature du filtre, qui doit être adaptée à l'utilisation de solutions concentrées de KOH et à la méthode d'identification par μ FT-IR ;

- la porosité, qui tient compte du fait que le filtre doit retenir les MP pour les analyses et en même temps laisser passer un maximum de matières organiques et minérales, pour faciliter l'identification des MP et donc diminuer le temps d'analyse ;

- le diamètre du filtre.

La résolution analytique de l'appareillage utilisé dans l'étape de caractérisation doit aussi être considérée. En effet, il n'est pas judicieux d'utiliser un filtre avec une porosité beaucoup plus petite que la résolution du spectrophotomètre puisqu'il retiendrait aussi beaucoup de matières organiques et inorganiques, limitant la caractérisation des MP. Dans cette étude, elle a été évaluée à 20 µm environ.

Finalement, assez peu de combinaisons nature/porosité de filtres sont commercialisées. Dans cette étude, six matériaux de filtres ont été testés : l'oxyde d'aluminium (Al₂O₃), le polycarbonate, les fibres de verre, le métal, l'acétate de cellulose et le nitrate de cellulose. Sur ces six matériaux, trois sont bien adaptés aux deux modes de travail utilisés en FT-IR (Loder et al., 2015) que sont la transmission et la réflexion. Cependant, ils présentaient également des inconvénients lors de leur utilisation. Le filtre d'oxyde d'aluminium Anodisc possède une porosité très faible (0,2 µm), par conséquent, il retient beaucoup trop de matières à sa surface. De plus, il n'a pas permis l'identification du PVC, en mode transmission. Le filtre de polycarbonate a une porosité acceptable de 10 µm, mais il engendre un bruit de fond important. Pour ce qui est du filtre métallique sa porosité est de 20 µm, il semblerait donc bien adapté, mais l'identification des matières plastiques n'était pas optimum, car il pouvait gondoler. Même s'il n'est possible de travailler qu'en mode réflexion en spectroscopie FT-IR, les filtres de nitrate ou d'acétate cellulose d'une porosité de 12 µm s'est avéré être le meilleur compromis puisque le filtre de fibre de verre avait aussi une trop petite porosité de 0,7 µm. Par ailleurs, le diamètre du filtre choisi était de 25 mm, plutôt que 47 mm, ce qui permettait de minimiser le temps d'observation au microscope des MP présents à leur surface.

II.1.1.5 Caractérisation des microplastiques

Dans un premier temps, la technique de microscopie couplée à la spectroscopie Raman semblait être la plus adaptée pour identifier les MP extraits des bivalves en raison de sa bonne résolution et de la possibilité d'identifier des MP ayant une taille très petite (jusqu'à 1 μ m). Cependant, les premiers travaux publiés décrivant son utilisation ont montré que cette technique présentait aussi des inconvénients majeurs. Le premier est un temps d'analyse très grand, approximativement une dizaine d'heures par filtre. Certains auteurs ont essayé de rendre la détection semi-automatique (Frère et al., 2016) mais elle n'était applicable qu'à des MP de grande taille et non issus d'organismes. Le second inconvénient est la difficulté d'analyser des filtres un peu gondolés, car la distance entre l'objectif et le filtre est petite. Finalement, il est également difficile de déterminer la couleur des MP, à cause de l'interaction du rayonnement avec le filtre (Kappler et al., 2016 ; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014).

Même si la résolution est moins bonne en μ FT-IR, cette technique permet, malgré tout, un gain de temps considérable. Par ailleurs, les filtres légèrement gondolés sont analysables car la distance objectif/filtre est plus grande qu'en Raman. Dans le cadre de cette étude, le mode réflexion a été utilisé pour être compatible avec le filtre choisi pour la filtration. L'appareil et le principe d'identification en mode réflexion sont présenté dans **figure 2.2**.



Figure 2.2: Spectromètre µFT-IR spotlight 200i (Perkin Elmer), principe du mode réflexion et exemple d'un spectre de microplastiques

Avec l'appareil utilisé, il est possible de travailler en mode automatique dans une zone limitée. En effet, des quadrats de taille définie allant de 1 x 1 mm à 10 x 10 mm peuvent être analysés automatiquement. La taille est sélectionnée en fonction de la charge en particules du filtre. Cependant, il est apparu plus rapide de travailler manuellement dans le contexte de cette étude.

Une fois le spectre d'une particule enregistré, il va être comparé à une librairie de spectres, à l'aide du logiciel de traitement des données (Spectrum[®] - IRWinlab, Perkin Elmer), afin de d'obtenir une liste d'éventuelles natures de particule associées à un score de recherche. Le score de recherche est calculé selon l'adéquation entre le spectre de la librairie et le spectre de la particule analysée. Dans le cadre de ce travail, la caractérisation de la nature du matériau plastique de la particule a été considérée comme valide lorsque la matière plastique identifiée était dans la liste des recherches et présentait un score supérieur à 60% (PerkinElmer Polymer database). Cette valeur peut paraître faible et est parfois inférieure à des scores considérés dans la littérature. Cependant, lors de l'analyse de MP modèles utilisés pour la validation de la méthode, les scores obtenus étaient parfois seulement de cet ordre de grandeur, alors que la nature du plastique était bien connue.

Lorsque le couplage microscope/spectromètre n'est pas disponible, la mise en œuvre de la caractérisation est plus difficile. Cela a été fait dans deux précédents travaux décrits dans la littérature (Li et al., 2015 et 2016). Dans ce cas, les auteurs ont procédé à une sélection des particules observées sur le filtre à l'aide d'un microscope, puis, à leur récupération, à l'aide d'une pince, avant leur identification par FT-IR. Les inconvénients de l'utilisation de ce procédé sont, d'une part, un long temps de manipulation, et, d'autre part, la dextérité nécessaire pour sa réalisation, particulièrement pour les MP de taille inférieure à 50 µm.

II.1.1.6 Contrôle qualité

D'un point de vue analytique, le contrôle qualité d'une méthode est indispensable. Parmi les dix travaux de l'état de l'art portant sur l'analyse de MP issus de bivalves, huit ont évalué la contamination croisée en étudiant des blancs (méthode réalisée sans échantillon). Le nombre de particules observées sur un filtre varie de 0,5 à 5 mais ne correspondent pas à des matières plastiques. Seulement 4 sur les 10 études ont validé leur protocole en procédant à des dopages à l'aide de MP modèles de différents types, tailles, natures et formes (**tableau 2.1**). Les recouvrements atteignent des valeurs allant de 85 à 100%. Ces études ont aussi permis de montrer qu'HNO₃ détruit des nylons (Claessens et al., 2013) et que NaOH modifie la masse et la morphologie de MP de taille de 1 à 5 mm (Dehaut et al., 2016). Dans le présent travail, il

n'était pas possible de peser les MP modèles, car ils étaient trop petits mais les recouvrements ont été calculés, la taille et la couleur répertoriées et les spectres obtenus, avant et après la procédure analytique, ont été comparés.

II.1.2 Article n°2 : Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135–6144 DOI 10.1007/s11356-017-8862-3

HEALTH AND ENVIRONMENTAL RISKS ASSOCIATED WITH EMERGING POLLUTANTS AND NOVEL GREEN PROCESSES

Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast

Nam Ngoc Phuong^{1,2,3} · Aurore Zalouk-Vergnoux¹ · Abderrahmane Kamari¹ · Catherine Mouneyrac² · Frederic Amiard⁴ · Laurence Poirier¹ · Fabienne Lagarde⁴

Received: 3 January 2017/Accepted: 17 March 2017/Published online: 5 April 2017 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Microplastics (MPs) constitute a main environmental issue due to their threat to marine organisms and so far to humans. The lack of a fast standard protocol in MP isolation and identification from living organisms bring to challenge for the science. In this paper, an optimized protocol using potassium hydroxide 10% (KOH 10%; m/v) for digestion of mussel soft tissues (Mytilus edulis) and multi-steps of sedimentation has been developed. Efficiency higher than 99.9% of organic and mineral matter elimination was shown by application on mussels sampled on the French Atlantic coast. The identification of MPs was performed by FTIR microscopy straight on the filter and the whole analysis can be compatible with a routine goal. Fourteen MPs of four different chemical natures were found and identified in 5 pools of 3 sampled mussels. Their size ranged from 30 to 200 µm. Further investigations are now needed to evaluate the potential risk of such particles within this marine bivalve species and other filter feeders.

Keywords Microplastics · Mussel · Digestion · French coastal environment, characterization

Responsible editor: Philippe Garrigues

Aurore Zalouk-Vergnoux aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr

- ¹ Laboratoire de Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université de Nantes, F-44322 Nantes, France
- ² Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université Catholique de l'Ouest, F-49000 Angers, France
- ³ PhuTho College of Pharmacy, Viettri City PhuTho Province 290000, Vietnam
- ⁴ Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM, UMR CNRS 6283), Université du Maine, Avenue Olivier Messiaen, F-72085 Le Mans, France

Introduction

Plastic is a generic name used to encompass most of the synthetic organic polymers exhibiting the property of plasticity. Their worldwide production was estimated up to 311 million tons in 2014 (PlasticsEurope, 2015) and is in constant increase over the world. Despite their advantages (low cost production, water and corrosion resistant, chemically inert, easily molded), approximately 50% of the produced plastics are thrown after only one use (Hopewell et al., 2009) and 10% of the plastics end up in oceans (Thompson et al., 2009). The consequences on marine life have been reported for several years: accumulation of plastic debris in all parts of the world and ingestion, with possible entanglement, from zooplankton to mammals (Cole et al., 2011; Gall and Thompson, 2015; Laist, 1987; Moore, 2008). Moreover, under the influence of many biotic and abiotic factors, such as microorganisms, erosion, abrasion, photooxidation, and temperature, plastics can be fragmented into microplastics (MPs) which were defined by Arthur et al. (2009) as particles with size inferior to 5 mm, this definition being accepted by the scientific community. They may accumulate in all environmental compartments (Phuong et al., 2016). Many studies have been done to determine the quantities of MPs in the different environmental compartments such as seawaters (Eriksen et al., 2013; Lucia et al., 2014; Thompson et al., 2004), sand/sediments (Carson et al., 2011; Lee et al., 2013; Woodall et al., 2014) and marine organisms (Desforges et al., 2015; Lusher et al., 2013; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Monitoring the presence of MPs in marine organisms is currently of high importance as some of these organisms such as mussels and oysters are consumed by human and may constitute the main vector of human contamination.

Reports demonstrating the presence of MPs in marine organisms were done through a dissection of the stomachs

Springer



without digestion combined with a visual sorting of MPs via microscopic analysis (Boerger et al., 2010; Bond et al., 2014; Lusher et al., 2013; Tanaka et al., 2013). This methodology was suitable for fish or marine vertebrates but seems not transposable to smaller organisms. Moreover, the MPs could be translocated into the circulatory system of marine animals (Browne et al., 2008). Hence, other studies performed on crustaceans or bivalves used preliminary digestion to ensure the complete MP collection (Devriese et al., 2015; Mathalon and Hill, 2014) but without further identification that can lead to an over-estimation of the MP quantities. All studies led to a great variability of the results between the studies that could be linked to the lack of a standardized protocol allowing identification and quantification of MPs in marine animals.

To separate MPs from organisms, the first step is the isolation of the fragments from the digestive track. The most common method, especially for small marine organisms (zooplankton, bivalves, and oysters) is the digestion of the whole organism. There are two types of methods: enzymatic and chemical. While the enzymatic method has been used in only two studies (Cole et al., 2014; Loder et al., 2015), the chemical method has been used more frequently with several reactants, such as acids (Claessens et al., 2013; De Witte et al., 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014), hydroxides (Dehaut et al., 2016; Foekema et al., 2013) and peroxides (Li et al., 2015, 2016; Mathalon and Hill, 2014) as detailed in Table 1.

All these studies aimed to eliminate the maximum of organic matter, sand, and sediment from the organisms in order to decrease the time of visual sorting and identification. To optimize this step of separation between MPs and organic matter, a separation-step based on density is sometimes added using a dense solution. The addition of a saturated solution of sodium chloride after digestion was often used but seems not enough to separate from the matrix dense MPs such as polyvinyl chloride (PVC), polyethylene terephthalate (PET) which represented 10.3 and 7% respectively of the world production in 2014 (PlasticsEurope, 2015). Once the digestion, and eventually the sedimentation steps performed, the liquid samples are filtered in order to collect the MPs at the filter surface.

After MP collection, their identification is necessary as a visual inspection alone may conduct to a severe overestimation of the MPs concentration (Song et al., 2015). Identification of polymers can be performed using several techniques such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (Pyr-GC-MS) and Raman spectroscopy (Rocha-Santos and Duarte, 2015). Among these techniques, infrared spectroscopy displays several advantages as being a non-destructive method that can provide fingerprint spectra allowing a fast identification of each particle. Micro Fourier infrared spectroscopy (μ FTIR) was already proved to be an ideal method for MP identification in many studies (Harrison et al., 2012; Li et al., 2015; Thompson et al., 2004; Vianello et al., 2013;

 $\underline{\textcircled{O}}$ Springer

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

Loder et al., 2015). But some traces of organic matter may interfere with the signal of the studied particles and identification of MPs still requires a lot of time. For spectroscopic identification, two protocols are currently used: analysis after a visual sorting of MPs (Li et al., 2015, 2016) or a scanning of the whole filter surface (Loder et al., 2015).

In this work, mussels (Mytilus edulis) that are well-known as bioindicators for evaluation of the environmental contamination due to, in particular, their feeding mode (filter feeder) were selected to test and validate a protocol of MP quantification. This species was already investigated in other studies related to MP quantification (De Witte et al., 2014; Mathalon and Hill, 2014) but in these studies, a sorting of MPs for spectroscopic analysis was performed. This step is timeconsuming and can generate contaminations. The aims of the present work are (i) to compare several procedures (digestion, sedimentation, filtration) of tissue preparation to optimize MP analysis in mussels; (ii) to set up a simple and robust protocol allowing a direct identification of MPs on filters by µFTIR; and (iii) to generate preliminary data on the mussel contamination by MPs on the French Atlantic coast. These preliminary data will be compared to the four studies about MP contamination of mussels from the French side of the Atlantic (De Witte et al., 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015).

Materials and methods

Animals

Two groups of adult mussels (M. edulis) were considered: (i) commercial mussels from the Region of Pays de la Loire (France) bought in a supermarket at Nantes; (ii) wild mussels sampled in October 2015at Pen-Bé (N 47° 25' 33" W 2° 27' 46") which is near a mussel and oyster farming zone of the West of France without any known MP contamination sources (industry, estuary, etc.). The commercial mussels were only used for the protocol setup whereas the sampling wild mussels were analyzed in order to apply the protocol samples were placed in unused sealed freezer bags at -20 °C before analysis. In order to avoid MP contamination, all equipment used in the protocol was rinsed three times with demineralized water (PURLAB, Option R-7/15) before utilization. Demineralized water was also used whenever water was required during the different steps of the protocol. Moreover, for prevention of contamination, lab coats and gloves in nitrile were worn all the time and all sample processing was performed in a clean laminar flow hood. The mussels were taken out of the freezer just before preparation for analysis. After thawing during 1 h, their byssus was eliminated and the whole soft tissues were removed from the shells. For each analysis, soft tissues of three mussels were pooled.

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

Organisms	Reagent ^a	Volume	Operating procedure		Efficiency	References	_
			Contact and heating	Sedimentation			
Zooplankton	1 HCI 12.1 M HNO3, 15.9 M HCI 12.1 M–HNO3, 15.9 M (1/1) H ₂ O2,0.9 M HCI 12.1 M–H.O.0.6 M (1/1)	20 ml for 15 individuals	Ambient temperature or heating at 80 °C (1 to 3 h)	°Z	ри	Desforges et al., 2015	
Zooplankton	HCLI M HCLI M NaOH I M NaOH 2 M NaOH 2 M NaOH 10 M	20 ml for 0.2 g of sample	20 °C during 24 h 20 °C during 24 h 20 °C during 24 h 20 °C during 24 h 60 °C during 24 h	No	$\begin{array}{c} 82.6 \pm 3.7\%\\ 72.1 \pm 9.2\%\\ 90.0 \pm 2.9\%\\ 85.0 \pm 5.0\%\\ 91.3 \pm 0.4\%\end{array}$	Cole et al., 2014	
	Protéinase-K Protéinase-K	10 mg for 0.2 g of sample	37 °C during 0.5 h 50 °C during 2 h		88.9 ± 1.5% More than 97%		
Crustacean 3ivalvia	HNO ₃ 65%-HClO ₄ 68% (4/1)	5 ml for 1 g tissue	80 °C during 10 min then added water and heating 2nd time	No	Observation	Devriese et al., 2015 De Witte et al., 2014	_
Bivalvia Bivalvia Bivalvia Volvchaeta	41NO3 69%	20 ml for 3 mussels	Contact during 24 h then heating at 100 °C during 2 h	No	pu	Van Cauwenberghe and Janssen, 2014 Van Cauwenberghe et al., 2015	
Bivalvia	HNO ₃ 22.5 M H ₂ O ₂ 32.6 M NaOH 52.5 M HNO ₃ 22.5 M-HCI 32.3 M (3/1) HNO ₃ 22.5 M-H ₂ O ₂ 32.6 M (3/1)	20 ml for 3 mussels		No	99.52-99.85% 98.51-99.55% 95.95-99.54% 98.38-99.11% nd	Claessens et al., 2013	
Bivalvia Polychaeta	H ₂ O ₂ 30%	150-200 ml for 5 mussels 150 ml for 10 g tissue	55 to 65 °C up to H ₂ O ₂ all evaporate	NaCl 25% extraction 2 to 3 times	pu	Mathalon and Hill, 2014	_
Bivalvia Bivalvia	H ₂ O ₂ 30%	200 ml for 5 g tissue	65 °C during 24 h (agitation 80 rpm) then put in ambient temperature 24-48 h	Solution NaCl saturate	nd Up to 95%	Li et al., 2015 Li et al., 2016	
Fish	KOH 10%	Ratio of volume more than 3	Ambient temperature 2 to 3 weeks	No	pu	Foekema et al., 2013	_
Bivalvia Crustacean Fish 7ish gut	KOH 10% and K ₂ S ₂ O ₈ 0.27 M-NaOH 0.24 M	250 ml for 3 mussels 250 ml for 5-10 g tissue 500 ml for 3 fish 250 ml for 3 tracts	60 °C during 24 h	No 500 ml of Na ₂ WO ₄ 70%	Observation	Dehaut et al., 2016	

🙆 Springer

6137
6138

Chemicals and filters

All chemicals were purchased from Fisher chemical (HNO₃); PANREAC, Spain (NaOH); CARLOERBA reagents, France (HCl, H₂O₂ and KOH pellets); PROLABO, Paris France (HClO₄ and KI). For the filtration step, the membrane filters were provided by Whatman, Germany (filters of cellulose nitrate 5 and 12 μ m and aluminum oxide (Anodisc) 0.2 μ m).

Protocol setup

Digestion step

The main goal of this step was to proceed to the digestion of the mussel soft tissues (without preliminary depuration step), in order to obtain the minimum of organic residues on the filters used at the last step of the operating procedure. Firstly, different chemical reagents were tested to optimize the digestion process. This step was performed on commercial mussels. Each pool of 3 soft tissue mussels were initially weighed, then placed into a 150-mL conical flask and 20 mL was added either of a base (KOH and NaOH), or of an acid (HNO3), or of a mixture of HNO3 with H2O2, HCl or HClO₄. All tested mixtures are indicated in Table 2 with their concentrations. After a contact time of 24 h, the samples were heated on a heating block during 2 h at 80 °C. Then, a dilution (1:10, v/v) with hot demineralized water (80 °C) was performed. The warm solutions were then filtered on cellulose nitrate filter with 5 µm of porosity (Claessens et al., 2013). Finally, filters were dried at room temperature in glass Petri dish and weighted to evaluate the digestion efficiency by comparing the final mass to the initial mass of tissues weighted before the digestion. The results were expressed as percentages.

Secondly, only the two chemical mixtures allowing optimal digestion were selected and further tests were performed by changing different operating conditions that were identified to influence digestion efficiency, such as reagent volume, time of contact and/or heating and agitation. The aim was the optimization of the conditions leading to the lowest content of organic matter. Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

Density separation step

For the analysis of wild mussels, a density separation step before the filtration appeared to be necessary. Firstly, the solution obtained after the digestion step was transferred to a 125-ml separating funnel. The density of this solution was determined ($d = 1.07 \text{ g cm}^{-3}$; n = 3) and allowed the separation between floating MPs (e.g., polyethylene PE, polypropylene PP) and more dense particles (especially sand but also PVC, PET). After 4 h, 10 ml of the bottom solution (called fraction B) was transferred into a second separating funnel, whereas the top of the solution (called fraction A) was put into a 100-ml conical flask. In order to remove MPs potentially adsorbed onto the glass wall, the funnel was carefully rinsed three times with demineralized water and the rinsing water was added to the fraction A. In order to separate dense MPs from mineral particles, 20 ml of a KI 50% solution (m/v; density = 1.55 g cm^{-3}) was added to the fraction B. After a vigorous hand shaking, this solution was leaved for 4 h at room temperature. The top part of the solution was then added into the conical flask with fraction A. This mixed solution was then filtered.

Filtration step

Different types of filters were tested in order to use the more adapted one depending on the reflection and/or transmission modes used during the identification step (detailed in the next section). The tested filters were made of aluminum oxide (Anodisc) with 0.2 μ m of porosity or made of cellulose nitrate with pore diameters of 5 and 12 μ m. These filters were chosen mainly because they are commercially available. The aluminum oxide filters allowed the analysis of filters in transmission mode but the porosity was very small whereas the cellulose nitrate filters had higher pore diameters.

Identification by µFTIR

The aim of this work was to provide an easy protocol optimized for the fast quantification of MPs in mussels. To achieve this goal, an identification MPs directly on the

Table 2 The digestion efficiencies of commercial mussels by different reagents or mixtures

Reagents	Concentration	ıs	Remaining mussel soft tissues after digestion step % mean \pm standard deviation ($n = 3$	
	(%, m/v)	Molarity (M)		
HNO3	65	10.3	0.455 ± 0.010	
NaOH	30	7.5	1.957 ± 0.147	
HNO ₃ /HCl (3:1, v/v)	65/37	10.3/10.1	0.912 ± 0.264	
HNO3/HClO4 (4:1, v/v)	65/70	10.3/6.9	1.472 ± 0.636	
HNO ₃ /H ₂ O ₂ (3:1, v/v)	65/30	10.3/8.8	2.793 ± 0.466	
КОН	10	1.8	0.225 ± 0.009	

D Springer

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

membrane surface without the manual sorting of particles was preferred. The identification step was performed directly on the filters using μ FTIR (Spotlight 200i FT-IR microscopy system, PerkinElmer). A manual procedure of inspection of each membrane filter was run using the microscope associated to the system. The whole surface of each filter was inspected. For each particle found on the image, a spectrum was recorded and compared to the polymer database (library with 7171 reference spectrums) and all research scores in % were noted. Each measurement was performed with eight accumulations ranging from 600 to 4000 cm⁻¹ in reflection mode and from 1300 to 4000 cm⁻¹ in transmission mode.

Method validation and application

The method validation was performed using spiked samples with MPs of three types (PE, PP and PVC), representing the most abundant plastics reported in the literature (Phuong et al., 2016). MPs were generated from the cryo-milling of commercial polymers. Pieces of low density polyethylene from a cable, polypropylene from a plastic bag and PVC from a pipe were milled in order to generate micro-fragments. The fragments with sizes ranging from 50 to 400 µm were collected using metallic sieves. Then, 20 pieces of each type of polymer were first digested to check their preservation during the digestion protocol (positive blank). After that, the generated MPs were used to spike the mussel soft tissue samples: 20 pieces of each polymer were added to 3 replicates of mussel pools (n = 3) for both types of mussels (wild and commercial). Negative blanks were also performed (n = 3) by the application of the procedure without mussels and MPs in order to evaluate the contamination due to airborne.

The optimized digestion/sedimentation/filtration protocol was applied to evaluate the recovery rate of the whole procedure.

After the validation, the optimized protocol was applied on 5 pools of 3 mussels sampled on the Atlantic coast in West of France in order to generate preliminary data on MP contamination.

Results

Protocol setup

Digestion efficiency

The results of digestion efficiency of mussel soft tissues obtained using the different tested reagents or mixtures are reported in Table 2. The masses of remaining mussel tissues and particles, weighed after digestion and filtration relative to the initial masses of tissues, were calculated. The results are expressed in percentages. In the same tested conditions, at the respective concentrations 10 and 65%, KOH and HNO₃ are the two most efficient reagents for the digestion of mussel soft tissues with less than 1% of remaining organic matter on the filters.

Thus, using these two reagents, changes (volume of reagent, contact and heating times, with or without agitation) in the operating protocol were tested in order to decrease the remaining mass of organic matter. The obtained results are reported in Table 3.

The use of a volume of 50 ml of KOH with a heating time of 24 h under agitation appeared as the best operating condition since the lowest percentages of remaining masses were observed.

An optimization of the organic matter digestion was necessary. Using KOH 10% for this step, more than 99.9% of the mussel soft tissues could be eliminated, which is lower than all other reported results (details in Table 1) even if it remains difficult to compare digestion of different species.

Digestion efficiency

Figure 1 shows pictures of filter surfaces obtained after the digestion of the two types of mussels (commercial and wild). The microscopic observation showed a greater presence of particles in wild mussels compared with commercial ones. For wild mussels, despite the low remaining mass of organic matter left on the filter after digestion with KOH, the microscopic analysis of the filter revealed the presence of a high number of particles that led to a very long time of analysis, while these particles could not be identified as polymers. Due to the presence of a high number of particles in wild mussels, a density separation step before the filtration appeared to be necessary.

Thus, a sedimentation step using KI 50% was performed for wild mussel analysis allowing the reduction of particles filtered onto the membrane. The comparative results (with and without a sedimentation step) are shown in Table 4.

Regarding the results, the sedimentation step using KI 50% allowed reducing by almost 10, the mass of mussels remaining onto the filter after the sample preparation procedure, confirming the presence of mineral nature of these particles. By this way, the time of visual inspection of the filters was reduced during the next identification step.

Choice of the filter and identification

The choice of the filter and the identification way were chosen by the interpretation of some results obtained during the validation of the procedure with spiking with MPs of PE, PP and PVC. Depending on the filter used for MP analysis, reflection and/or transmission modes were tested (Table 5) for identification of the MP polymers (PE, PP and PVC) by the observation of squares of a few mm side.

Springer

6140

 Table 3
 The digestion

 efficiencies of commercial
 mussels by KOH and HNO₃ with

 different operating conditions
 tended

Reagents	Experime	ntal conditio	ns	Remaining mussel soft tissues after		
	Volume (ml)	Contact (h)	Heating (h)	Agitation	Porosity (µm)	% mean \pm standard deviation ($n = 3$)
HNO3	20	24	2	No	5	0.455 ± 0.010
	50	24	2	No	5	0.425 ± 0.025
	50	0	24	Yes	5	0.768 ± 0.126
KOH	20	24	2	No	5	0.225 ± 0.009
	50	24	2	No	5	0.092 ± 0.026
	50	0	24	Yes	5	0.064 ± 0.015

Table 4 presents the research scores obtained for the identification of PE, PP and PVC pieces when deposited on each one of the filters. The transmission mode could only be used with the Anodisc membrane as other membranes are not transparent to infrared. Not surprisingly, the transmission mode provided the best scores for PE and PP compared to the reflection mode. However, the PVC particles could not be identified due to the absorption of this matter in the range lower than 1300 cm⁻¹. The Anodisc filters allowing the use of the transmission mode could not be retained as the identification of polymers like PVC was not possible.

Using the reflection mode, the signal was much weaker than with the transmission mode. However, the three tested polymers were identified with scores higher than 70% (except of PVC) with all the tested filters. For cost reasons, the Anodisc membranes were discarded and nitrate cellulose filters were selected for the rest of the study as this type of membrane was commercially available with variable diameter and porosity sizes. Working in reflection mode indeed allows the use of a wide range of filters. The diameter and the pore sizes were chosen as a compromise between the quality of the spectra (and resulting identification score), the time of analysis, the clogging after digestion and the remaining organic matter. For a more rapid inspection of the membrane under FTIR microscope, the 25 mm diameter was preferred over the more common 47 mm diameter. In order to obtain less organic matter onto the filter, the pore size chosen was finally 12 µm. The resolution of the µFTIR being higher than 12 µm, this choice is not restrictive to the analysis of smaller particles. Consequently, under the chosen operating conditions (volume



Fig. 1 Filter surface 500 \times 500 μm after the digestion of commercial mussels (a) and wild mussels (b)

D Springer

of 50 ml of KOH with a heating time of 24 h under agitation), the use of a filter with a porosity of 12 μ m allowed a reduction by 30% of the remaining mussel soft tissue masses onto the filter compared to a porosity of 5 μ m (respectively 0.0409 and 0.0637% left with filter having porosity of 12 and 5 μ m).

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

Procedure validation

After spiking the mussels with 20 MPs of each type of polymers (PE, PP, PVC) and the performance of positive blanks, the quantities of MPs recovered and identified after the procedure setup are reported in Fig. 2.

In positive blanks, PP and PVC recoveries were similar when comparing digestion with KOH and HNO3 with values over 80% for PVC MPs. For PE, the average recoveries appeared higher using KOH (about 100% of particles recovered and identified) compared with HNO3 which only allowed the recovery of almost 80% of the MPs. This observation was mainly due to the fact that PE MPs were partially discolored after contact with HNO3 suggesting that KOH better preserves PE particles during digestion compared to HNO3. The results of the present study indeed showed that the digestion step with KOH did not strongly modify the color or structure of the three tested polymers, contrarily to HNO3 which discolored PE particles. This confirms the results of Claessens et al. (2013) who already described the influence of HNO3 on nylon fibers. These results are also in agreement with those of Dehaut et al. (2016) who demonstrated the high potential of KOH 10% (heating at 60 °C in 24 h) for tissue digestion with no damage of the majority of the tested polymers (14 over 15 types of polymers).

 Table 4
 Effect of sedimentation step on wild mussel preparation procedure

	Sedimentation	Remaining masses after filtration % mean \pm standard deviation ($n = 3$)
Wild mussel	No	0.1154 ± 0.0367
	Yes	0.0149 ± 0.0094

Environ	Sci	Pollut	Res	(2018)	25:6135-6144
---------	-----	--------	-----	--------	--------------

Filter	Analysis mode	Polymer	Research score (%)
Anodisc	Transmission	PE	91.5
		PP	97.3
		PVC	Not identified
	Reflection	PE	82.9
		PP	74.2
		PVC	75.2
Nitrate cellulose	Reflection	PE	76.9
		PP	83.6
		PVC	60.4

In the spiked mussel samples, the results obtained with KOH for the digestion were comparable with those obtained in the positive blank. On the contrary, no particle was observed whatever the type (PE, PP, PVC) after digestion with HNO₃. This result was very surprising and after a careful observation and a second step of digestion with KOH, MPs were finally observed. MPs were consequently hidden and/or covered by organic matters using HNO₃ as digestion reagent. This result was also pointing towards the use of KOH as the best reagent for efficient soft tissue digestion while preserving MPs. Taking into account this present advance, the studies using HNO₃ as reagent for tissue digestion could underestimate the MP quantity in the studied samples.

All the different steps details in the latter sections led to an optimized protocol for the quantification of MPs in wild mussels that is summarized in Fig. 3: digestion of soft tissues with KOH, sedimentation using KI, filtration on a nitrate cellulose membrane (diameter 25 mm–porosity 12 μ m) and direct identification on the filter by μ FTIR.

The results of recoveries ranging from 70 to 100% obtained for the three types of polymers that stand for nearly 60% of plastics products in 2014 (PlasticsEurope, 2015). It seems to



Fig. 2 Recoveries (in %) of the 20 spiked MPs per type (PE, PP, PVC) (error bars are standard deviations)

agree with the results reported by Li et al. (2016) who found 76 out of 80 MPs in the positive control and presented also high rates of digestion using H_2O_2 as reagent despite a partial discoloration of MPs. However, in their protocol, MPs were not directly identified on the filters and a step of visual sorting was necessary which is time consuming and probably induced bias.

About the negative blanks (n = 3), i.e., the analytical procedure performed without any sample and MPs, an average of 1 (±1) particle per filter was observed by microscopy but the identification by μ FT-IR of these particles lead to none plastic particle.

MP quantification in wild mussels from the Atlantic coast, west of France

In the 5 pools of 3 sampled wild mussels, many particles and fibers were detected onto the filters. Most of these particles were not defined as MPs either because they were not in plastic or because the small width (<20 µm) did not allow an identification by µFT-IR, particularly true for fibers. Among them, 14 were identified as MPs corresponding to four different types of polymers. PP and PE occupied up to 85.7% (12/14) of the identified MPs. Other types were identified as polyester and ABS with one particle of each type. All MPs were in the maximum size range from 30 to 200 µm, with a higher proportion ranging from 50 to 100 µm (11/14). It was quite difficult to categorize MPs as fragments or fibers because of a lack of practical definition. Nevertheless, 85.7% (12/14) of the MPs found in the wild mussels could be attributed to fragments and 14.3% (2/14) to fibers with sizes of $15 \times 50 \ \mu m$ (fourth picture of Fig. 4) and $15 \times 200 \ \mu m$. Most of the MPs found in the organisms had a light gray color. The concentration of MPs was calculated reaching an average of 2.8 ± 1.3 MP per pool of 3 mussels and 0.23 ± 0.09 MP per gram of mussel soft tissue. Some of the MPs found in wild mussels are presented in Fig. 4.

It remains difficult to quantitatively and qualitatively compare these results with those of the literature because of the lack of standardization of the protocol for MP analysis (Phuong et al., 2016). The quantitative differences between studies could be attributed to the MP contamination pressure of the media as well as the differences of experiments for the sample preparation and analysis. Nevertheless, the quantities and sizes of MPs found in the present study were completely in the range of other European studies. For instance, Van Cauwenberghe and Janssen (2014) found 0.36 ± 0.07 particles per gram of *M. edulis* from a mussel farm in Germany, with sizes ranging from 5 to >25 µm. Van Cauwenberghe et al. (2015) found 0.2 ± 0.3 MP per gram in *M. edulis* from the French, Belgian and Dutch North Sea coast, from 15 to 90 µm. Finally, De Witte et al. (2014) found from 0.26 to

Springer



Fig. 3 Diagram of sample preparation: from isolation to identification of MPs in blue mussels



0.51 fibers per gram of *M. edulis* from Belgium with size between 200 and 1500 µm.

Discussion

The isolation and identification of MPs from marine organisms are not easy. Many studies presented their own protocol as no standardized protocol was proposed so far for quantification of MPs in organic matrices. First protocols proposed in the literature did not rely on identification leading to a probable over-estimation of the MP concentrations (Mathalon and Hill, 2014). More recent studies proposed protocols with identification after manual sorting of the detected MPs, which is time consuming. At last, Kappler et al. (2016) proposed the automatic inspection of the membrane filter by µFTIR but the results could only be obtained using a special detector and generated long times of analysis with huge data set.

In the literature on analysis of MPs in bivalves, filters in nitrate cellulose are used in the majority of studies. The present work tested several different types of filters. The filters having small porosity (anodisc, fiber glass, and polycarbonate) were rapidly discarded in order to limit the amount of retained matters to be consequently identified by μ FTIR. Moreover, it appeared that the smallest size of particle that could be identified using μ FTIR in the reflection mode under manual inspection was 20 μ m. In consequence, a porosity of 12 μ m for the filtering membrane appeared as a good compromise for a direct identification on the filter with a certain gain of analysis time. The reduction of the number of particles retained on the filter appeared particularly important as even with a high porosity, many particles still remaining on the filter were not plastics with a ratio around 20 tries of



Fig. 4 MPs found in wild mussels from the French Atlantic coast. (From left to right: PE, PP, ABS and Polyester corresponding at a square measurement of 50×50 , 50×50 , 30×60 and 15×50 µm respectively)

D Springer

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

identification for one particle clearly identified as a MP. It confirms that the spectroscopic identification is necessary to approach the real level of contamination (Li et al., 2016). At last, mapping analysis as presented in Loder et al. (2015) allows the analysis of all the particles present on the membrane but 10.75 h for one filter of 11 mm diameter was necessary. In the present work, each whole filter was scanned in approximately 2 h. The gain of analysis time permits the application of this protocol to the study of a high number of samples while limiting contamination airborne during analysis which could influence the results (Michele et al., 2016). Moreover, the size of MPs that could be identified using our protocol was still limited to 20 µm. This is already a strong improvement compared to protocols that rely on visual sorting and identification in attenuated total reflectance mode which do not allow the identification of particles smaller than approximately 100 µm. This improvement appeared as an important step towards accurate quantification of MPs in bivalves as 11 particles over the 14 that were identified were smaller than 100 µm. For particles smaller than 20 µm, Kappler et al. (2016) demonstrated that FTIR imaging leads to significant underestimation of about 35% of MPs compared to Raman imaging, especially in the size range inferior to 20 µm. To quantify the smaller particles (inferior of 20 µm), a double procedure of filtration and an identification combining µFTIR and µRaman (for particles between 1 and 20 µm) would be possible but may lead to very long time of analysis. This was not the aim of this study.

Using this protocol, preliminary results on the contamination of MPs superior of 20 µm in wild mussels of the French Atlantic coast were obtained. The presence of MPs in mussels was already reported in other studies (Mathalon and Hill, 2014; De Witte et al., 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015; Li et al., 2015 and 2016). It is quite difficult to compare these data with the results obtained here due to the different sampling sites and to the differences in analysis protocols, especially as MP identification was not always provided. However, the results of the present study are in the range of data reported in the European literature with an average of 2.8 MPs per pool of 3 mussels and 0.23 ± 0.09 MP per g of soft tissue. Moreover, the majority of MPs found are inferior of 100 µm in size. It seems to not adapt for using of a gripper to select each particle on the filter then identify on other filter.

Conclusion

This study presents an optimized protocol for a fast quantification of MPs superior to 20 μ m in bivalves. The protocol relying on the succession of three steps of digestion, sedimentation and filtration necessitates about 36 h in order to obtain a filtering membrane that can be directly analyzed under a basic

µFTIR microscope in 2 h. This last step can still be improved using image analysis prior to infrared analysis, which is currently under development. The filters were chosen to allow the direct identification of MPs without manual sorting. The whole protocol was validated using PE, PP and PVC MPs to spike samples of mussels. High recovery rates were obtained especially for PE and PVC (more than 80% of recoveries). Applied for the analysis of 15 wild mussels, this protocol allowed to detect and identify MPs that were mostly with size ranging from 20 to 100 µm. The level of contamination was in the range of other European studies with an average of 2.8 MPs per pool of 3 mussels with a high rate of PE and PP (more than 85%). Thanks to this fast and reliable protocol, analysis of a higher number of organisms will be shortly done in order to determine the levels of MP contamination in different bivalves and to estimate the variability of concentrations among sampling sites.

Acknowledgements The authors greatly thank the PhuTho College of Pharmacy and government of Vietnam for the scholarship. The study was also financially supported by the region Pays de la Loire.

References

- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. In Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris, NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30.NOAA (p. 530). Silver Spring, September 9–11, 2008.
- Boerger CM, Lattin GL, Moore SL, Moore CJ (2010) Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. Mar Pollut Bull 60:2275–2278
- Bond AL, Provencher JF, Daoust PY, Lucas ZN (2014) Plastic ingestion by fulmars and shearwaters at Sable Island, Nova Scotia. Canada Mar Pollut Bull 87:68–75
- Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, Lowe DM, Thompson RC (2008) Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.) Environ Sci Technol 42: 5026–5031
- Carson HS, Colbert SL, Kaylor MJ, McDermid KJ (2011) Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. Mar Pollut Bull 62:1708–1713
- Claessens M, van Cauwenberghe L, Vandegehuchte MB, Janssen CR (2013) New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. Mar Pollut Bull 70:227–233
- Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway SC (2011) Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Mar Pollut Bull 62:2588–2597
- Cole M, Webb H, Lindeque PK, Fileman ES, Halsband C, Galloway TS (2014) Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. Sci Rep 4:4528
- De Witte B, Devriese L, Bekaert K, Hoffman S, Vandermeersch G, Cooreman K, Robbens J (2014) Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): comparison between commercial and wild types. Mar Pollut Bull 85:146–155
- Dehaut A, Cassone AL, Frère L, Hermabessiere L, Himber C, Rinnert E, Rivière G, Lambert C, Soudant P, Huvet A, Duflos G, Paul-Pont I (2016) Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. Environ Pollut 215:223–233

Springer

6144

Environ Sci Pollut Res (2018) 25:6135-6144

- Desforges JPW, Galbraith M, Ross PS (2015) Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. Arch Environ Contam Toxicol 69:320–330
- Devriese LI, Van de Meulen MD, Maes T (2015) Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. Mar Pollut Bull 98:179–187
- Eriksen M, Maximenko N, Thiel M (2013) Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Mar Pollut Bull 68:71–76
- Fockema EM, De Gruijter C, Mergia MT, van Franeker JA, Murk AJ, Koelmans AA (2013) Plastics in North Sea fish. Env Sci Technol 47:8818–8824
- Gall SC, Thompson RC (2015) The impact of debris on marine life. Mar Pollut Bull 92:170–179
- Harrison JP, Ojeda JJ, Romero-Gonzalez ME (2012) 2012. The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments. Sci Total Environ 416:455–463
- Hopewell J, Dvorak R, Kosior E (2009) Plastics recycling: challenges and opportunities. Phi Trans R Soc B 364:2115–2126
- Kappler A, Fisher D, Oberbeckmann S, Schernewski G, Labrenz M, Eichhom KJ, Voit B (2016) Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? Ana Bioanal Chem 408(29):8377–8391
- Laist DW (1987) Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. Mar Pollut Bull 18:319– 326
- Lee J, Hong S, Song YK, Hong SH, Jang YC, Jang M, Heo NW, Han GM, Lee MJ, Kang D, Shim WJ (2013) Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. Mar Pollut Bull 77:349–354
- Li J, Yang D, Li L, Shi H (2015) Microplastics in commercial bivalves from China. Environ Pollut 207:190–195
- Li J, Qu X, Su L, Zhang W, Yang D, Kolandhasamy P, Li D, Shi H (2016) Microplastics in mussels along the coastal waters of China. Environ Pollut 214:177–184
- Loder MGJ, Kuczera M, Mintenig S, Lorenz C, Gerdts G (2015) Focal plane array detector-based micro-fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples. Environ Chem 12:563–581
- Lucia GA, Caliani I, Marra S, Camedda A, Coppa S, Alcaro L, Campani T, Giannetti M, Coppola D, Cicero AM, Panti C, Baini M, Guerranti C, Marsili L, Massero G, Fossi MC, Matiddi M (2014) Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). Mar Environ Res 100:10–16

- Lusher AL, McHugh M, Thompson RC (2013) Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. Mar Pollut Bull 67:94–99
- Mathalon A, Hill P (2014) Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Mar Pollut Bull 81:69–79
- Michele T, Digka N, Anastasopoulou A, Tsangaris C, Mytilineou C (2016) Anthropogenic microfibres pollution in marine biota. A new and simple methodology to minimize airborne contamination Mar Pollut Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.07.050
- Moore CJ (2008) Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. Env Res 108:131–139
- PlasticsEurope, 2015. Plastics—the facts 2015: an analysis of European plastics production, demand and waste data.
- Phuong NN, Zalouk-Vergnoux A, Poirier L, Kamari A, Châtel A, Mouneyrac C, Lagarde F (2016) Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environ Pollut 211:111–123
- Rocha-Santos T, Duarte AC (2015) A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. Trends Anal Chem 65:47–53
- Song YK, Hong SH, Jang M, Han GM, Rani M, Lee J, Shim WJ (2015) A comparison of microplastic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. Mar Pollut Bull 93:202–209
- Tanaka K, Takada H, Yamashita R, Mizukawa K, Fukuwaka MA, Watanuki Y (2013) Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. Mar Pollut Bull 69: 219–222
- Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG, McGonigle D, Russell AE (2004) Lost at sea: where is all the plastic? Science 304:838
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. Phil Trans R Soc B 364, 1973–1976.
- Van Cauwenberghe L, Janssen CR (2014) Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environ Pollut 193:65–70
- Van Cauwenberghe L, Claessens M, Vandegehuchte MB, Janssen CR (2015) Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. Environ Pollut 199:10–17
- Vianello A, Boldrin A, Guerriero P, Moschino V, Rella R, Sturaro A, Da Ros L (2013) Microplastic particles in sediments of lagoon of Venice, Italy: first observations on occurrence, spatial patterns and identification. Estu Coast Shelf Sci 130:54–61
- Woodall LC, Sanchez-Vidal A, Canals M, Paterson GLJ, Coppock R, Sleight V, Calafat A, Rogers AD, Narayanaswamy BE, Thompson RC (2014) The deep sea is a major sink for microplastic debris. R Soc Open Sci 1:140317

 $\underline{\textcircled{O}}$ Springer

II.2 Article n°3 : Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or mode of life?

Une fois le protocole mis au point, validé et appliqué à la moule bleue (*Mytilus edulis*), il a été utilisé pour évaluer la contamination en MP d'organismes de cette espèce, et de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), prélevés sur la côte Atlantique de la région Pays de la Loire. En parallèle, l'influence potentielle de facteurs tels que le mode de vie des organismes (sauvages ou cultivés), le site et la saison d'échantillonnage a été évaluée. Le travail qui suit, publié dans « Marine Pollution Bulletin », est consacré entièrement à l'étude de ces paramètres. Le détail des caractéristiques des MP retrouvés dans les bivalves est disponible dans les annexes 1 à 4.

Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674



Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life?



Nam Ngoc Phuong^{a,b}, Laurence Poirier^a, Quoc Tuan Pham^b, Fabienne Lagarde^c, Aurore Zalouk-Vergnoux^{a,a}

^a Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, Nantes F-44000, France

^b PhuTho college of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong Boulevard, Viettri City, PhuTho Province 290000, Viet Nam ^c Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM, UMR CNRS 6283), Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, Le Mans F-72000, France

ARTICLE INFO

Keywords. Microplastics Mussel Oyster Influencing factor Qualitative and quantitative analysis

ABSTRACT

Monitoring the presence of microplastics (MP) in marine organisms is currently of high importance. This paper presents the qualitative and quantitative MP contamination of two bivalves from the French Atlantic coasts: blue mussel (Mytilus edulis) and the Pacific oyster (Crassostrea gigas). Three factors potentially influencing the contamination were investigated by collecting at different sampling sites and different seasons, organisms both wild and cultivated. Inter- and intra-species comparisons were also achieved. MP quantity in organisms was evaluated at 0.61 ± 0.56 and 2.1 ± 1.7 MP per individual respectively for mussels and oysters. Eight different polymers were identified. Most of the MPs were fragments; about a half of MPs were grey colored and a half with a size ranging from 50 to 100 µm for both studied species. Some inter-specific differences were found but no evidence for sampling site, season or mode of life effect was highlighted.

1. Introduction

Plastics have changed our life since their appearance in the middle of the last century (Thompson et al., 2009). They are massively used as they replaced traditional materials due to their multiple advantages. Actually, their worldwide production is increasing, reaching > 300 million tons last years (PlasticsEurope, 2015). In contrast, many damages by plastic wastes to ecosystems were observed and reported (Cole et al., 2011; Gall and Thompson, 2015) due to lacks in plastic waste management faced to the increase of plastic uses. A recent work of Jambeck et al. (2015) estimated that approximately 4.8 to 12.7 million tons of plastic wastes entered the ocean only in 2010.

Besides, plastic wastes are known as the main source of microplastics (MPs) which were defined as plastics with a size inferior to 5 mm by Arthur et al. (2009). The fragmentation of plastic wastes occurring in the environment and leading to MPs is due to mechanical, chemical and biological factors (Andrady, 2011; Costa et al., 2010; Zettler et al., 2013) and corresponds to the secondary source of contamination. The primary contamination of MPs is characterized by the microspheres used in the industry, in the personal care products for example. Because of their small size and their properties, MPs can be accumulated in the environment leading to a potential MP exposure of biota undergoing bioaccumulation and biological effects (Barnes et al.,

2009; Wright et al., 2013). The occurrence of MPs was reported in continental environments: air (Gasperi et al., 2015), freshwater (Dris et al., 2015b; Free et al., 2014; Jambeck et al., 2015), wastes and treated waters (Dris et al., 2015a), lake sediments (Fischer et al., 2016) and soil organisms (Huerta Lwanga et al., 2016; Rillig, 2012). Numerous studies focused also on marine environments, studying seawater (Cózar et al., 2015; Desforges et al., 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015); sand and sediment (Blaskovic et al., 2017; Graca et al., 2017; Woodall et al., 2014) and many marine animals (Besseling et al., 2015; Desforges et al., 2015; Karami et al., 2017). In marine ecosystems, many species of invertebrates are known to accumulate contaminants from seawater and marine sediments, representing valuable biological indicators of environmental pollution (Kaiser, 2001). Among these species, benthic suspension-feeding bivalves, such as mussels or oysters, have been widely used in biomonitoring surveys in coastal waters (e.g. the Mussel Watch program; Farrington et al., 1995; RNO, 2006), on account of their abundance and broad distribution, their suspended particle filter-feeding mode, their sedentary living and their importance for human food web. As for chemical hazards, these species may be good indicators of MP contamination in the water column (Avio et al., 2017). Published studies presenting data on MP contamination in marine bivalves are scarce at this moment even if many of them are currently performed. Comparisons are furthermore debatable because

* Corresponding author. E-mail address: aurore.zalouk-vergnoux@univ-nantes.fr (A. Zalouk-Vergnoux).

http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.054

0025-326X/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Received 26 July 2017; Received in revised form 20 October 2017; Accepted 20 October 2017 Available online 26 October 2017

N.N. Phuong et al.

of a lack of standardized protocols (Phuong et al., 2016).

In this context, the present study aimed to evaluate the MP contents of two filter-feeder bivalve species, the blue mussel, Mytilus edulis and the Pacific oyster, Crassostrea gigas, collected on the French Atlantic coast (Pays de la Loire, France) according to a validated protocol (Phuong et al., 2016). Mussels and oysters have a considerable socioeconomic weight in this regional area where 16 thousand tons are annually produced for national consumption. For both species, several sampling sites, seasons and modes of life (cultivated and wild) were investigated in order to determine the factors influencing the contamination and to run an inter-species comparison. The seasonality was evaluated through two sampling campaigns that were performed in autumn and spring, selected because these periods arise from times of high exposure of organisms. The beginning of autumn succeeds to summer which is a period of strong anthropic pressure due to tourism activities on the coast and it is after a warm period leading to higher rate of filtration of suspensivorous bivalves. Moreover, this time is included in the main commercialization periods of mussels (summer and autumn) and oysters (autumn and winter). The beginning of spring arises from the winter period marked by stormy climatic conditions which remobilize the contaminants stored in the sediments, increasing the risk of organism exposure.

Furthermore, the relation between MP contamination and the living environment of organisms was suggested by previous studies (Mathalon and Hill, 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Vandermeersch et al., 2015; Li et al., 2016). For example, Li et al. (2016) found significant differences between mussels sampling along about 20,000 km coastline showing that sampling location could be one important factor influencing MP content in marine ecosystems. The sampling sites chosen in this study are separated of 140 km at the maximum. They were selected because of the intensive and important shellfish aquaculture for regional and national socio-economy and because they are under different oceanic and terrigenous influences. Moreover, wild mussels were shown to be more contaminated than farmed ones in this latter study, while the opposite was found by Mathalon and Hill (2014). As numerous tools made of plastic are used in mussel and ovster farms for spat collection or on-growing stages, wild and cultivated organisms from different major farming areas along the Atlantic coast were analyzed in the present work to investigate the influence of farming practices on MP contents, and assess the spatial variations of MP contamination. Overall, it provides first data on the MP contamination level of the French Atlantic coast for these two chosen bivalve species, contributing to the global MP contamination assessment.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

KOH pellets were purchased from CARLOERBA reagents (France); KI pellets were from VWR (France) and the membrane filters of cellulose nitrate with pores of $12 \,\mu$ m and $25 \,m$ m of diameter were provided by Whatman (Germany).

2.2. Sample collection strategy

Fig. 1 shows the sampling locations of adult mussels (*M. edulis*) and oysters (*C. gigas*) on French Atlantic coasts (Pays de la Loire region, France). Oysters were sampled in the three points located on the map: Pen-Bé (N 47°25′33″ W 2°27′46″), Coupelasse (N 47°01′19″ W 2°01′59″) and Aiguillon Bay (N 46°16′26″ W 1°14′14″) while mussels were only sampled in Pen-Bé and Aiguillon Bay because of their absence in the third site. For each sampling site, wild and cultivated organisms were randomly collected at two different seasons: October 2015 (beginning of autumn) and March 2016 (beginning of spring).

The sampling site Pen-Bé is located in the Pen-Bé bay. The watershed of the bay is mainly represented by agriculture activities (60%) Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674

and urbanization (15%) (IFREMER, 2006). The urbanization is quite limited since the towns present in the watershed do not have > 2000 inhabitants. Activities of salt production are also present in the watershed (580 ha) as well as the aquaculture of mussels and oysters (280 ha). The supply of freshwater of the bay is limited. The impacts of the Loire estuary are negligible whereas those of the estuary of the Vilaine can be considered depending on weather conditions. In the bay, it was measured that about 41 to 92% of the water is renewed after 5 tidal cycles. The samples were collected at about 300 m of the coastline.

Coupelasse is located in the bay of Bourgneuf (340 km²). The watershed is mainly represented by protected zones (habitats and birds), in particular in the south where the marsh Breton is recognized for its biodiversity as 3rd national wetland (IFREMER, 1997). The main supply of freshwater is done by Millac, a small river draining a watershed composed of hedgerows, grasslands and 2 towns in its downstream part (Les Moutiers en Retz and Bourneuf en Retz: 1500 inhabitants and 3500 inhabitants respectively) (Schéma d'aménagement et de gestion des eaux du marais breton et du bassin versant de la baje de Bourgneuf, 2014). It is the main shellfish farming area in the Pays de la Loire region with high oyster farming activity (90%) and little mussel farming explaining why no mussels were sampled for this study. This area is separated from the ocean by the island of Noirmoutier which shelters it from the swell. It communicates with the ocean to the north through an opening of 12 km. The oceanic waters more salted than the waters of Bourgneuf lead to a difficult mixing of them. It was estimated that it takes about 2 months for the waters of the Bay of Bourgneuf to be renewed by ocean waters. The bay is to the south of the Loire estuary but its plume rarely penetrates the bay only by northerly wind or in low water period. The samples were collected at about 1 km of the coastline.

The samples taken in Aiguillon bay were collected just outside the bay to the north, remaining in the Pays de la Loire region. This site is exposed offshore and is under oceanic and terrigenous influences (IFREMER, 1996). The terrigenous influence is limited and comes from the bay where the residence times of the waters appear to be quite long and the exchanges relatively limited with the outside. Freshwater supply of the bay is due to the rivers Sèvre Niortaise and the Lay and less frequently to the Canal du Curé. All these rivers drain the watershed of the Poitevin marsh which is a protected zone. Along the coast, an extensive mussel farming activity occurs accounting for 15% of the national production. The samples were collected at about 300 m of the coastline.

Five samples, i.e. 5 oysters and 5 pools of 3 mussels, were analyzed per sampling location, per season and per mode of life, leading to a total of 180 marine bivalves: 60 oysters and 120 mussels.

2.3. Biometric parameters and sample preparation

After the collection, organisms were placed in sealed freezer plastic bags made of PE and conducted to the laboratory in a refrigerated enclosure. Organisms were then kept in bags at -20 °C until analysis. All of laboratory experiments were carefully performed with the aim of preventing MP contamination. Concerning sample preparation, the bivalves were taken out of the freezer for thawing during 1 h. Then, each oyster and mussel shell was individually measured and the individual total wet weight without internal water and soft tissue wet weight were determined after the elimination of the byssus for the mussels. Organisms sized from 3.5 to 5.8 cm and from 7.3 and 13.7 cm for mussels and oysters respectively. The condition index (CI) was calculated according to the recommendation of the French Association for Standardization (AFNOR, 1985) using the formula: CI = (soft tissue wet weight / total wet weight without internal water) \times 100. CI ranged from 22.3 to 53.5 for mussels and from 17 to 46.8 for oysters.

MP analyses were performed on individual oysters and on a pool of 3 mussels following the protocol elaborated by Phuong et al. (2017). In brief, the sample (one oyster or a pool of 3 mussels) was placed into a

N.N. Phuong et al.

Vanpes Le Morbinam Pen-bé Nantes Coupelasse Ca Roche-sur-Yon Aiguillon bay S0 km

150 mL conical flask. Then 50 mL of KOH 10% (m/v) were added. The mix was heated at 60 °C and at the same time, agitated during 24 h. After the digestion, the obtained solution went through a density separation step after the transfer to a 125 mL separating funnel. After 4 h, 10 mL of the bottom solution was transferred into a second separating funnel, whereas the top of the solution was put into a 100 mL conical flask. In order to separate dense MPs from mineral particles, 20 mL of a KI solution (50%, m/v) was added into the second separating funnel. After a vigorous hand shaking, this solution was left for 4 h at room temperature. After this second decantation time, the top of the solution was then added into the conical flask with the first one. The mix of solutions was then filtered on a cellulose nitrate filter with a porosity of 12 μ m. Filter was dried at room temperature in a glass Petri dish which was closed until analysis.

2.4. µFT-IR analysis

The identification of MP types on the filters was performed by using Fourier transform infrared microscopy system (µFT-IR; Spotlight 200i FT-IR microscopy system, PerkinElmer) in reflection mode. Each spectrum was recorded after 8 accumulations ranging from 600 to 4000 cm⁻¹ and the whole surface filter was inspected, each detected particles being individually analyzed. Each obtained spectrum was then compared to the polymer database (PerkinElmer Polymer database) and the type of plastic was determined when the research score was higher than 60%. Each identified plastic particle was analyzed in order to categorize MPs according to the size: < 50 µm; from 50 to 100 µm and > 100 µm. Their color and their form were recorded for their classification according to Galgani et al. (2013).

2.5. Quality control

The main concern in terms of quality control for the analysis of MP is the cross-contamination. The first point was to lead strategies to prevent it. All equipments used in the laboratory were previously rinsed with MilliQ water and dried at room temperature avoiding contact with the ambient air. Once dried, they were immediately kept under aluminum foil. During the analysis procedure, the contact of the digestion solution with the ambient air was limited by the use of aluminum foils. Once the filtration performed, the filters were kept in Petri dishes made of glass until the µFT-IR analysis. During the experiments, laboratory coats made of cotton and gloves were worn all the time. Because of a remaining risk of cross-contamination of the samples, different blanks were performed. The first ones were realized following the procedure of sample preparation and µFT-IR analysis without bivalves on 6 replicates. Then, two other types of blanks were performed to assess the potential cross-contamination due to the storage of bivalves in the plastic bags. Three plastic bags were kept with MilliQ water during 24 h and three other bags were filled of MilliQ water and frozen at -20 °C during 24 h. Water volumes were then filtered and the obtained filters analyzed by µFT-IR.

The other concern of the quality control is the validation of the analytical procedure which was previously performed by spiking with 20 particles of PP, PE and PVC with and without bivalves (N = 3 for each condition) as it was explained in a study carried on the laboratory (Phuong et al., 2017).

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using XLSTAT software. The conditions for applying parametric tests, i.e. homogeneity of variance and normality, were verified using Fisher and Shapiro-Wilk tests respectively. As result of these tests, non-parametric tests (Kruskal-Wallis ANOVA (KW)) were used in order to highlight significant differences of MP contamination in bivalves collected at different locations, seasons and with different modes of life. Differences between groups were considered as significant when p < 0.05. The KW test was followed by a post hoc test Multiple Comparisons of p-value (MCP) when it was significant at p < 0.05.

Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674

Fig. 1. Sampling locations in Pays de la Loire, France: Pen-Bé, Coupelasse, Aiguillon Bay.

N.N. Phuong et al.

3. Results

3.1. Quality control and MP identification

The whole analytical procedure was performed without any sample (N = 6) in parallel with bivalve samples to evaluate cross-contamination due to airborne, vessels and reagents. An average of 1.2 (\pm 0.8) particle per filter (N = 6) was observed by microscopy. Other types of blanks corresponding to plastic bags rinsed with MilliQ water during 24 h (N = 3) and placed in freezer with MilliQ water during 24 h (N = 3) respectively displayed 0.7 (\pm 0.6) and 1.3 (\pm 1.2) particles with the microscopic observation. The identification by µFT-IR of all the particles found on filters corresponding to the different types of blanks concluded to no particles made of plastic.

The results of the validation of the analysis procedure performed with and without bivalves by spiking 20 particles of PP, PE and PVC were published in a previous work (Phuong et al., 2017). The conclusion was that recoveries reached about 100%, 70% and 90% for PE, PP and PVC particles leading to the procedure validation.

In bivalves, a total of 199 particles were identified as plastics by μ FT-IR among 3285 measured ones on all particles observed by microscopy. The ratio of identified MPs/measured particles reached about 6%.

3.2. MPs in mussels

3.2.1. Quantitative analysis

The whole abundance of MPs found in mussels was about 0.23 \pm 0.20 MP per gram of wet weight soft tissues and about 0.60 \pm 0.56 MP per individual (N = 120). Quantitative results of each sampling location, season and mode of life are presented in Fig. 2.

The statistical tests applied to the obtained data showed no significant differences between the abundance of MPs related to the three studied influencing factors: sampling location, season and mode of life, whatever the way of result expression (MP/g or MP/mussel). Even if no significant difference between MP contaminations was highlighted concerning the mussel mode of life, a higher detection frequency was noticed in cultivated mussels compared to wild ones. Indeed, 90% of pools of cultivated mussels presented MP particles while just 65% for pools of wild mussels.

3.2.2. Qualitative analysis

The 73 MPs identified in the whole studied mussels were distributed according to their plastic type, their color and their size for a qualitative

study (Fig. 3).

Among the MPs found in mussels, seven different natures of plastics were determined with μ FT-IR spectroscopy. The majority of identified polymers were PP and PE with respective proportion of 47 and 38% (Fig. 31). The other plastic types reached 15% and were essentially represented by PE-PP copolymers (5.4%), polystyrene (4.1%), polymethyl methacrylate (PMMA; 2.7%), polyester (1.4%) and acrylonitrile butadiene styrene (ABS; 1.4%).

Galgani et al. (2013) proposed categorizes for shape and color of MPs. In the present study, the majority MPs was fragments reaching 82% and the remaining MPs were filaments. Several other filaments were also observed but could not be identified as polymeric fibers with μ FT-IR analysis. Regarding the color, most of MPs found in the mussels were grey-colored, counting for 51% of MPs (Fig. 3II). Then black, red, green and white MPs were observed reaching 23, 11, 8 and 7% respectively.

Concerning the size of MPs found in the mussels as shown in Fig. 3, the highest proportion up to 52% corresponded to MPs ranging from 50 to 100 μ m (Fig. 3III). Then, MPs from 20 to 50 μ m reached 37% and finally 11% of MPs were > 100 μ m. The largest particle found in mussels sized 400 μ m (a fragment of PP).

Fig. 4 is helpful in order to study the influence of the sampling site, the season and the mode of life of mussels. In Fig. 4I, the type of plastic seemed to be influenced by the mode of life of mussels in Pen-Bé. The wild mussels displayed only MPs made of PP and PE, this latter being largely predominant compared to all other sites, seasons and mode of lifes. On the same way, Fig. 4III shows that mode of life of mussels in Pen-Bé could have an influence on the size of MPs, since no MP larger than 100 μ m was observed in wild mussels. In Aiguillon Bay, no influence of season or mode of life can be noticed. Finally no trend was observed concerning MP color (Fig. 4III). Regarding correlations between type, size and color no trend could be highlighted except that 26/ 28 MPs made of PE were grey.

3.3. MPs in oysters

3.3.1. Quantitative analysis

The whole abundance of MPs in oysters was about 0.18 \pm 0.16 MP per gram of wet tissue and 2.10 \pm 1.71 MP per individual (N = 60). Quantitative results of each sampling site, season and mode of life of organisms are presented in Fig. 5.

The statistical tests applied to the data showed no significant differences between the groups of oysters related to the sampling location, the season and the mode of life of organisms, whatever the unit of result





Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674

N.N. Phuong et al.



Fig. 3. Qualitative analysis of MPs found in mussels. Distribution of MPs according to: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



Fig. 4. Distributions of MPs related to the sampling site, the season and the mode of life of mussels, according to: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

N.N. Phuong et al.

Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674



Fig. 5. MPs in oysters related to sampling location, season and mode of life expressed as MP number per gram of wet weight soft tissues of oysters (I) and as MP number per oyster (II). N = 5 and box-plots depicted minimum, first quartile, median, third quartile and maximum.

expression (MP/g or MP/oyster). Without statistical basis, some light effects of sampling locations and modes of life could be evidenced. Hence, 28/30 (93%) cultivated oysters contained MPs vs only 24/30 (80%) of wild oysters. Moreover, a total of 55 MPs were found at Coupelasse vs only 41 at Aiguillon and 30 at Pen-Bé.

3.3.2. Qualitative analysis

The 126 MPs observed in the whole studied oysters were distributed according to their plastic type, their color and their size for a qualitative study (Fig. 6).

Among the 126 MPs found in sampled oysters, seven different plastic types were identified with FT-IR spectroscopy. About half of the MPs were made of PE and a quarter of PP (Fig. 71). Then, ABS was also frequently found reaching 15% of the recovered MPs. The last 13% were PE-PP copolymers (6.6%), polyester (4.0%), polyisobutylene (PIB; 0.8%) and polystyrene (1.6%). No PVC were found in the oysters, neither PMMA.

About the shape categorizes from Galgani et al. (2013), the majority of MPs were fragments, with a distribution reaching 79% (99/126), the remaining MPs being filaments. Regarding the color, a lot of MPs found in the oysters were grey-colored, counting for 40% of MPs. Then green, red, black, white and blue MPs were observed reaching 22, 21, 11, 4 and 2% respectively (Fig. 6II).

Fig. 6III shows the distribution of MPs found in oysters related to their size. The highest proportion, up to 53%, corresponded to MPs ranging from 50 to 100 μ m. Then, MPs > 100 μ m reached 32% and finally 15% were MPs ranging from 20 to 50 μ m. The largest particle found in oysters sized 1300 μ m (a filament of polyester).

As for mussels, some trends could be highlighted about the influence of the sampling site, the season and the mode of life of oysters (Fig. 7). The patterns of plastic types and colors (Fig. 71 and II) found in wild oysters from Aiguillon bay in October were particular: it is the only



Fig. 6. Qualitative analysis of MPs found in oysters. Distribution of MP according to: (1): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

669



Fig. 7. Distributions of MPs related to the sampling site, the season and the mode of life of oysters, regarding: (I): the type of plastic; (II): the color; (III): the size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Studies dealing with MP contamination of marine bivalve species: location, type of digestion, identification method of MPs, quantity, predominant form and type found in bivalves with the corresponding references.

Species	Location	Digestion	Identification	Quantity	Predominant form (type)	References
Mytilus edulis	Canada	H ₂ O ₂ 30%	Observation	34–178 items/individual	Fibers	Mathalon and Hill (2014)
	China		µFT-IR spectroscopy	0.9-4.6 items/g	Fibers (CP ^a , PET ^a)	Li et al. (2016)
	Belgium	HNO ₃ /HClO ₄	Observation	0.26-0.51 items/g	Fibers	De Witte et al. (2014)
	Europe			0-0.32 items/g	Fibers, fragments	Vandermeersch et al. (2015)
	Germany	HNO3 69%	Raman spectroscopy	0.36 items/g	Fragments	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
	North Sea		. 51	0.2-0.3 items/g	Fragments	Van Cauwenberghe et al. (2015)
	England	Protease	Stereomicroscope	2.5 items/g	Fibers	Catarino et al. (2016)
	France	KOH 10%	µFT-IR spectroscopy	0.24 item/g	Fragments (PE ^a , PP ^a)	Phuong et al. (2017)
Mytilus galloprovincialis	Europe	HNO ₃ /HClO ₄ HNO ₃ 69%	Observation Observation	0.04-0.34 items/g 0.08-0.16 items/g	Fibers, fragments	Vandermeersch et al. (2015)
Nine bivalves	China	H ₂ O ₂ 30%	µFT-IR spectroscopy	2.1-10.5 items/g	Fibers (PE ^a , PET ^a)	Li et al. (2015)
Crassostrea gigas	France	HNO3 69%	Raman spectroscopy	0.47 items/g	Particles	Van Cauwenberghe and Janssen (2014)
Perna perna	Brazil	HNO3 69%	Polarized light microscope	Not estimated	Irregular shapes	Santana et al. (2016)

^a CP: Cellophane; PET: Polyethylene Terephthalate; PE: polyethylene.

N.N. Phuong et al.

condition where PP particles were absent and other types of plastics represented > 60% of the identified particles. Moreover, for these samples all the particles found being grey-colored. On the contrary, in Pen-Bé, other plastic types than PP and PE were present in very low proportions whereas high proportions of PE were observed in cultivated oysters. Finally, the season could have an effect on the patterns of MP size (Fig. 7III): the proportions of MPs from 20 to 50 μ m were not similar between the two studied seasons, they were higher in October.

Studying the correlations between type, size and color, it appears that all MPs in ABS were green while all green-colored MPs, except those made of ABS, were made of PP. Concerning other colors, no trend could be highlighted and no correlation was found implying the size.

4. Discussion

4.1. Quality control and analytical considerations

Associated to the care given to the experiments in order to avoid cross-contamination of samples, different types of blanks were performed. According to the low number of particles observed in the different types of blanks (extraction without mussel or oyster, MilliQ water in plastic bags with and without freezing), and their identification with FT-IR spectroscopy as non-plastic, the cross-contamination of the samples during the whole analysis procedure (storage, sample preparation, FT-IR analysis) could be considered as negligible.

The Table 1 reports literature data on MP contamination of marine bivalves around the world. The use of different methods for sample treatment and MP identification could represent a main source of heterogeneity of the results. Indeed, regarding our results, the ratio of identified MPs/analyzed particles was relatively low, reaching about 6%. Thus, a lot of particles were not identified as plastics and then, were not included in the set of data. This result implies that a microscopic observation is not enough for the determination of plastic-like or non-plastic particles. The identification step in studies about MPs is consequently necessary in order to avoid an overestimation of the MP contents, According to literature (Table 1), only 3 out of 9 studies about MP contents in bivalves achieved the characterization of the plastic nature of particles. Li et al. (2016) found 109 plastic-like particles among 129 particles randomly selected from a total of 1519 microscopically observed particles (ratio higher than 84%). In this latter study, authors used µFT-IR spectroscopy in transmission mode. This mode is not compatible with the cellulose nitrate filters, hence one needs to select the particles and place them on another type of IRtransparent substrate for the identification step. Spectra obtained in transmission mode allow higher research scores than in reflection mode leading probably to a higher proportion of particle identification (Li et al., 2016) which may be one reason for the differences in MP identification rates.

On the other hand, regarding sample treatment by chemical digestion, the use of different reagents as acids, hydroxides or peroxides leads to results hardly comparable (Dehaut et al., 2016). For example, digestions performed with acids were reported as destructing or damaging the surface, the color, the size of some types of MPs (Claessens et al., 2013; Catarino et al., 2016). For these reasons, it seems to not be suitable for the MP contamination assessment in bivalves. Our previous study (Phuong et al., 2017) reported that KOH (10%, m/v) appeared as one of the best reagent for the digestion step among others (NaOH, KOH, HNO3 or HNO3 mixed with H2O2, HCl or HClO4) for an application to the blue mussel Mytilus edulis. Moreover, KOH is reported as the best adaptable reagent for the majority of MP types among 15 different tested (Dehaut et al., 2016). Secondly, concerning MP identification, the observation by microscopy is not enough for the characterization of particles as plastic with a strong risk to overestimate the MP content in organisms. Two vibrational microspectroscopic methods (Raman and FT-IR) appeared so far as the most applicable identification methods for MPs in organisms. While Raman spectroscopy allows the Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674

identification of MPs with a smaller size than with μ FT-IR spectroscopy (inferior to 50 μ m), this latter is a faster method of identification (Kappler et al., 2016).

4.2. Variations of MP contents in bivalves

Beyond variations in analytical procedures, the qualitative and quantitative variations of MP contamination may be related to differences in sampled area pressures and interspecies physiology. Many scientific reports demonstrated that MP quantity is spatially different from pole to pole in global ocean (Cózar et al., 2015). In this study, the quantities of MPs found in mussels and oysters were comparable to quantities depicted in numerous previous studies (De Witte et al., 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Vandermeersch et al., 2015), even if the sample preparation protocols and the analysis methods were different. On the contrary, despite a protocol of analysis close to the one used in this study, Li et al. (2016) obtained levels of MP contamination in mussels sampled from the coast of China on average 10 times higher than the ones obtained here. As the coast of China is known to be a hotspot of MP contamination (Qiu et al., 2015), it appears that these high levels of contamination could be directly related to sampling location and bivalves could then be considered as good bioindicators of MP contamination. Significant differences were moreover noticed between the 22 studied sites covering about 20,000 km coastline. Mathalon and Hill (2014) found also high levels of contamination with 34-178 items per mussel. The difference with our results could be explained once a more by a spatial influence, but also, in this case, partially attributed to differences in the method used for MP analysis. Since the quantification by Mathalon and Hill (2014) was based only on observations, a probable over-estimation of the MP quantities could occur.

In the present study, no significant quantitative difference was observed between the two or three sampling sites studied on the Atlantic coast, whether for mussels or oysters. The anthropogenic pressures of the different sites, the maximum distance of 140 km between them and their oceanic and terrigenous influences did not lead to different MP contaminations. Nevertheless, a tendency of a higher number of MP particles in oysters from Coupelasse (55 items) than Pen-Bé (30 items) was noticed, Aiguillon bay being intermediate (41 items).

Regarding the sampling period, no clear influence on MP contents could be observed. October and March arising both from times of high exposure of organisms (summer pressure and higher filtration rates, remobilization of contaminants stored in the sediments during winter), it will be interesting to further investigate the MP contents in bivalve throughout a farming life cycle including, in this way, seasonal and age variables.

Mathalon and Hill (2014) demonstrated different MP contamination levels between wild and cultivated mussels as it is also suggested in the present study. Even if the differences were not significant, about 90% of pools of cultivated mussels contained MPs while just 60% of wild mussels contained some. The greater contamination of cultivated mussels could be explained by a proximity to MPs coming from the degradation of plastic materials (PE, PP, polyester) used in aquaculture as collectors, ropes, nets and pipes used from the spat collection to ongrowing steps. However, Li et al. (2016) showed the opposite trend displaying data on wild mussels being more contaminated than cultivated ones. But the levels of MP contamination in their case were very high compared to all other studies, which prevents any relevant comparison. Regarding oysters, similar results were found as the frequency of MP detection tend to be higher for cultivated oysters (93%) than for wild ones (80%). Even if this observation is less convincing than for mussels, we cannot exclude that oyster cages made in PE could participate to increase oysters' exposure.

From a qualitative point of view, PE and PP were highly predominant among identified plastic particles in all samples. This is consistent with production data as these two polymers account for

N.N. Phuong et al.

43.5% of the annual world production. These two polymers are indeed predominantly sampled in marine waters (Phuong et al., 2016). PS, PE-PP copolymers and ABS were also found in both bivalves representing respectively on average 2.9; 6.0 and 8.2% of the identified particles. This is not surprising for PS as it is the third most produced polymer. Industrial production of PE-PP copolymers has appeared more recently than PE or PP homopolymers (no data on the current production could be found) but they are more and more used for adhesives and packaging applications. Their presence in environmental samples is already scarce and an increase of the concentration can be expected in the future. ABS is less produced and by crossing results of color and type of MPs, all ABS MPs were found green-colored. Hence, it could mean that the ABS contamination in this study originate from a same source. This type of plastic is usually used in toys and in car industry. At last, although PVC production reaches 10% (PlasticsEurope, 2015) of the polymer production, this type of plastic was not found in the mussels and the oysters studied in this present work. It is in accordance with the literature, since PVC MPs have never been observed in bivalves until now. A postulate could be the density of PVC lead to the sinking of MPs which would not be in contact with the mussels or oysters, living in the water column. For all these reasons, the mussels and the oysters could be considered as good indicators of MP contamination of marine waters as shown by Avio et al. (2017) for mussels, even if they are less representative of benthic environments than surface waters.

For both bivalve species, the majority of MPs were fragments and grey-colored suggesting a long-time spent in the environment after fragmentation of wastes (secondary source of contamination). Contrarily to Li et al. (2015, 2016), no plastic pellets (primary origin of contamination) were found in the bivalves.

Finally, regarding the sizes, MPs found in the present study were on average bigger than those found in mussels by Van Cauwenberghe and Janssen (2014). In their study, the predominant size of MPs was in the range inferior to 25 μ m instead of MPs ranging from 50 to 100 μ m as in the present study. These variations of size could be attributed to a different mussel contamination but also to the different identification procedures used in the studies. Van Cauwenberghe and Janssen (2014) indeed used Raman spectroscopy for MP identification which allows a lower resolution and consequently the identification of MPs with size inferior to 20 μ m which is more difficult with μ FT-IR spectroscopy.

4.3. Comparison between bivalve species

Considering quantitative results, a great variation of MP quantities per individual were observed between mussels and oysters, with respectively 0.61 ± 0.56 and 2.10 ± 1.71 MP per individual. However, when expressed in MP/g of wet weight soft tissue, the results did not appear so different anymore, with 0.178 ± 0.160 MP/g and 0.228 ± 0.197 respectively for mussels and oysters. Even if the levels of MPs were approximatively one order of magnitude higher than in the present study, this observation seems in accordance with the report of Li et al. (2015). They found in nine commercial bivalves from China, relatively similar MP numbers when expressed in MP/g while significant differences between species were observed for results in MP/ item. These results showed that the number of MPs found in different bivalve species could be more or less proportional to the weight/size of organisms. About the differences of MPs/individual between mussels and oysters, the filtration rates could be an explanation since it reaches up to 1.8 L/h (Clausen and Riisgard, 1996) and 5 L/h (Barillé et al., 1997) for mussels and oysters respectively. Oysters filtering twice more water than mussels, they are supposed to be more exposed to MPs leading to a greater bioaccumulation per individual.

From a qualitative point of view, the comparison of Figs. 3I and 6I shows that the predominant plastic type is different for the two studied species. In mussels, PP was predominant while PE particles were the most abundant ones in oysters. This observation may be due to a selective absorption of MPs according to their type or to their position in

Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674

the water column. More investigation has to be done to confirm these differences. Another difference was a more important abundance of ABS MPs in oysters (15%) compared to mussels (1%). This higher presence of green colored ABS particles in oysters could be attributed to an alimentary confusion of the oysters. A similar observation was found in the study of De Sa et al. (2015), who showed a confusion between preys and MPs for fish species during laboratory exposures. The confusion could be attributed to the color of MPs.

The comparison of the MP sizes found in both bivalves (Figs. 3III and 6III) showed that the proportion of MPs from 50 to 100 µm were similar between both species (about 50%) and an inversion was observed for the other size ranges with more small MPs (from 20 to 50 µm) observed in mussels whereas a higher proportion of big ones (> 100 µm) was found in oysters. These differences in size distributions could be explained by the size of both bivalve species (shell length of 4.42 \pm 0.48 and 9.60 \pm 1.53 cm respectively for mussels and oysters). The oysters being bigger have also bigger gills and labial pulps which lead probably to the possible ingestion of bigger particles than mussels. For example, Dupuy et al. (1999) reported that mussels most effectively retained particles larger than 20 to 30 µm whereas Cognie et al. (2003) found that the oysters accepted food items larger than 150 µm. The sizes of the biggest MPs found in the bivalves, 400 and 1300 µm respectively for mussels and oysters, illustrate also this hypothesis. Nevertheless, these large particles were probably located in gills since it seems impossible that such fragments could be filtrated and penetrated into the organisms. It would be interesting to study the organotropism in order to answer this point. No correlation was found between the shell length and the MP quantity into each species, and it could also be interesting to link the quantity to the age of the organisms. For the cultivated bivalves, the age could be easily calculated but it would be more difficult for the wild ones. The shell length is not a good indicator of the age since the growth of the organisms is dependent on the local environmental conditions, especially the water quality and the nutrient contents.

Finally, the sampling site, the season, the mode of life or any combinations of these factors were not revealed as relevant influencing factors on the quantitative and qualitative analysis of MPs in bivalves since no systematic effect was highlighted for both species in this study.

5. Conclusion

This study provided interesting quantitative and qualitative results about the MP contamination of two bivalve species, the blue mussel (Mytilus edulis) and the Pacific oyster (Crassostrea gigas) from the French Atlantic coast. It contributes to the global MP contamination assessment through a large set of data allowing comparisons between the two species at same locations with the analysis of 180 organisms. Actually, the French Atlantic coast appears to not be under an important MP contamination pressure compared to other sites. Three influencing factors were investigated by the analysis of wild and cultivated bivalves collected at different sampling sites and different seasons. This is the first research work combining these three factors. Even if no evident intra-specific difference was highlighted related to the three influencing factors, some inter-specific differences were found either qualitatively or quantitatively. For example, MP quantity in organisms was higher in oysters than mussels when results were expressed in MP per individual, with values reaching 2.10 ± 1.71 and 0.61 ± 0.56 MP per individual respectively. Once expressed in MP per g of wet weight of soft tissues, quantitative results were quite similar with 0.178 ± 0.160 and 0.228 ± 0.197 items per gram respectively for mussels and oysters. About the qualitative results, different polymers were identified with a high predominance of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) and a noticed recurrence of green acrylonitrile butadiene styrene (ABS) fragments in oysters. Most of the MPs were fragments; about a half of MPs were grey colored. MP size ranging from 50 to 100 µm accounted for about 50% of recovered MPs for both studied species. Up to now, all

N.N. Phuong et al.

studies on MP contamination of bivalves focused on the whole organism. Hence for future works, it would be interesting to study the organotropism of MPs in these filter-feeder species. Are MPs translocated to the tissues or trapped in the gills and/or the digestive tract?

Acknowledgments

We would like to greatly thank the LEX (Laboratoire d'Ecotoxicologie) and the LER PC (Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais) of IFREMER for their advices and their help during the sampling campaigns. This study was partly supported by the region Pays de la Loire through the program Miplaqua. Great thanks to PhuTho college of Medecine and Pharmacy and government of Vietnam for the scholarship of N.N. Phuong.

References

- AFNOR, 1985. Norme Francaise. Huitres creuses. Dénominations et classification, NF V 45-056. 5 Publication de l'association francaise de normalisation (AFNOR). Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62. 1596 -1605
- Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. In Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris, NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30.NOAA. Silver Spring, pp. 530 (September 9-11, 2008).
- Avio, C.G., Cardelli, L.R., Gorbi, S., Pellegrini, D., Regoli, Prof.F., 2017. Microplastics pollution after the removal of Costa Concordia wreck: first evidences from a bio-monitoring case study. Environ. Pollut. 227, 207–214.
- Barillé, L., Prou, J., Héral, M., Razet, D., 1997. Effects of high natural seston concentra-tions on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Grassostrea gigas*
- (Thunberg). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 212, 149–172.
 Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Phil, Trans. R. Soc. B 364 (1526), 1985-1998.
- Besseling, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., Izerc, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: humpback whale Megaptera novaeangliae. Mar. Pollut Bull, 95, 248-252,
- Blaskovic, A., Fastelli, P., Cizmek, H., Guerranti, C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the Croatian marine protected area of the natural park of Telascica bay (Adriatic Sea). Mar. Pollut. Bull. 114, 583-586.
- Catarino, A.I., Thompson, R., Sanderson, W., Henry, T.B., 2016. Development and opti-mization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme
- digestion of soft tissues. Environ. Toxicol. Chem. 9999, 1–5. Claessens, M., Van Cauwenberghe, I., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2013. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected or
- ganisms. Mar. Pollut. Bull. 70, 227–233. Clausen, I., Riisgard, H.U., 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel Mytilus
- Clausen, L., Kutsgard, H. U., 1996. Growth, hitration and respiration in the mussel mythus edulis: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. Mar. Ecol. Prog. Ser. 141, 37–45.
 Cognie, B., Barille, L., Masse, G., Beninger, P.G., 2003. Selection and processing of large suspended algae in the oyster Crassostrea gigas. Mar. Ecol. Prog. Ser. 250, 145–152.
 Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, S.C., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597.
- Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., Araujo, M.C.B., Spengler, A., Tourinho, P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. Environ. Monit. Assess. 168, 299–304. Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubeda, B., Gálvez, J.Á.
- Irigoien, X., Duarte, C.M., 2015, Plastic accumulation in the Mediterranean sea, PLoS One. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121762. De Sa, L.C., Luís, L.G., Guilhermino, L., 2015. Effects of microplastics on juveniles of the
- mon goby (Pomatoschistus microps): confusion with prey, reduction of the p datory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. Environ. Pollut. 196, 359-362. De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K.,
- Robbens, J., 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): comparison between commercial and wild types. Mar. Pollut. Bull. 85, 146–155.
- Dehaut, A., Cassone, A.L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization. Environ. Pollut. 215, 223-233.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribun of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean, Mar. Pollut. Bull. 79, 94-99.
- Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 320-330
- Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., Tassin, B., 2015a. Microplastic ation in a urban area: a case study in Greater Paris, Environ, Chem, 12, 592-599.

Marine Pollution Bulletin 129 (2018) 664-674

- Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B., Laforsch, C., 2015b. Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. Environ. Chem. 32.
- Dupuy, C., Le Gall, S., Hartmann, H.J., Beret, M., 1999. Retention of ciliates and flagellates by the oyster Crassostrea gigas in Frech Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. Mar. Ecol. Prog. Ser. 177, 165-175.
- Farrington, J.W., Tripp, B.W., States, U., 1995. International Mussel Watch Project: Initial Implementation Phase, Final Report. U.S. Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Office of Ocean Resources Conservation and Assessment, Silver Spring, Md (22 p).
- Fischer, E.K., Paglialonga, L., Czech, E., Tamminga, M., 2016. Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments - a case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (Central Italy). Environ. Pollut. 213, 648-657. Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014.
- High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. Mar. Pollut. Bull. 85, 156-163.
- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R.C., VanFraneker, J., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J.M., Palatinus, A., Matiddi, M., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, H., Liebezeit, G., Hanke, G., Werner, S., Galgani, F., Veiga, J.M., Ferreira, M., 2013. Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. EUR – Scientific and Technical Research. Luxembourg Publications Office of the European Union (ISBN: 978-92-79-32709-4 series-ISSN 1831-9424 (online)).
- Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. Mar. Pollut. Bull. 92, 170-179.
- Gasperi, J., Dris, R., Mirande-Bret, C., Mandin, C., Langlois, V., Tassin, B., 2015. First overview of microplastics in indoor and outdoor air. In: 15th EuCheMS International conference on Chemistry and Environment.
- Graca, B., Szewc, K., Zakarzewska, D., Dolega, A., Szczerbowska-Boruchowska, M., 2017. Sources and fate of microplastics in marine and beach sediments of the Southern Baltic Sea - a preliminary study. Environ. Sci. Pollut. Res. http://dx.doi.org/10. 1007/s11356-017-8419-5
- Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., Van de Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016. Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). Environ. Sci. Technol. 2016 (50), 2685-2691,
- IFREMER, 1996. Qualité des eaux littorales des pertuis charentais, bilan et diagnostic. IFREMER, 1997. L'ostréiculture en baie de Bourgneuf, relation entre la croissance des
- huitres Crassostrea gigas et le milieu naturel: synthèse de 1986 à 1995, IFREMER, 2006. Etude des secteurs du Croisic et de Pen-Bé: estimation des apports
- continentaux et évaluation des stocks conchylicoles. Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., et al., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768-771. Kaiser, J., 2001. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk
- Assessment. illustrated edition ed. Taylor and Francis Inc. (240 pages). Kappler, A., Fisher, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.J.,
- Voit, B., 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational micro-
- spectroscopy: FTIR, Raman or both? Anal. Bioanal. Chem. 408 (29), 8377–8391. Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C.K., Romano, N., Ho, Y.B., Salamatinia, B., 2017. A Junn, e., GORGARIO, R., MIDU, K.A., FOILIRIO, N., 10, T.B., Salamathila, B., 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. Sci. Total Environ. 578, 485–494.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Shi, H., 2015. Microplastics in commercial bivalves from china. Environ. Pollut. 207, 190–195.
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., Shi, H., 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. Environ. Pollut. 214, 177-184.
- on, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding
- Mainauti, A., Hui, P., 2014. Micropustic notes in the internal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia, Mar. Pollut. Bull. 81, 69–79.
 Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environ. Pollut. 211, 111–123.
- 100g, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, A., Poirier, L., Lagarde, F., 2017. Quantificatio and characterization of microplastics in blue mussel Ph (Mytius edulis): protocol set-up and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. Environ. Sci. Pollut. Res (Article in press). PlasticsEurope, 2015. Plastics – The Facts 2015: An Analysis of European Plastics
- Production, Demand and Waste Data,
- Qiu, Q., Peng, J., Yu, X., Chen, F., Wang, J., Dong, F., 2015. Occurrence of microplastics in the coastal marine environ nent: first observation on sediment of China, Mar. Pollut. Bull. 98, 274-280.
- Rillig, M.C., 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? Environ. Sci Technol. 46, 6453-6454.
- RNO. 2006. Surveillance du Milieu Marin. Travaux du Réseau National d'Observation de qualité du milieu marin. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de laMer (IFREMER).
- tana, M.F.M., Ascer, L.G., Custódio, M.R., Moreira, F.T., Turra, A., 2016. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: rapid evaluation through bioassessment. Mar. Pollut, Bull, 106, 183-189. Schéma d'aménagement et de gestion des eaux du marais breton et du bassin versant de la
- baie de Bourgneuf, 2014. Plan d'aménagement et de gestion durable des ressources en eau et des milieux aquatiques.
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. Philos. Trans. R. Soc. B 364, 1973–1976.Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human
- consumption. Environ. Pollut. 193, 65-70.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre de thèse permettent de répondre aux objectifs fixés. Un protocole d'analyse des MP issus de bivalves a été développé, validé et appliqué à des moules et huîtres collectées sur la côte Atlantique de la région Pays de la Loire.

Chaque étape du protocole, préparation des échantillons, digestion, sédimentation, filtration et identification, a été optimisée. Les trois points forts de ce protocole, comparés à ceux de la littérature sont :

- La faible quantité de matières organiques et minérales retrouvées sur les filtres ce qui permet une bonne visualisation et identification des particules. En effet KOH 10% (m/v) est un bon réactif pour la digestion de la matière organique, notamment après optimisation des paramètres de digestion (température, temps de contact, agitation). Une étape de sédimentation permet d'éliminer la matière minérale dense restant après l'étape de digestion. Un filtre ayant une porosité en adéquation avec la résolution du µFT-IR permet de ne retenir que l'essentiel des particules pouvant être analysées avec le spectrophotomètre.
- 2. L'analyse des particules sur les filtres est relativement facile et rapide, comparée à la littérature. Le choix de la technique utilisée pour l'identification, associé au fait que, après filtration des solutions obtenues après digestion et sédimentation, les filtres sont peu chargés en matières organiques et minérales, permettent une durée d'analyse d'environ 2 heures par filtre.
- 3. Le protocole a été validé en réalisant des blancs et des dopages à l'aide de MP modèles. Ainsi, aucune contamination croisée n'a été mise en évidence tout au long du protocole. De bonnes valeurs de recouvrements ont été obtenues, assurant que le protocole répond aux objectifs d'un point de vue quantitatif. Pour l'aspect qualitatif, les observations microscopiques des MP et les spectres obtenus avant et après la procédure de traitement d'échantillon ne montre pas d'altération.

L'analyse de la contamination en MP de deux espèces d'intérêt, la moule bleue (*Mytilus edulis*) et l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), a été réalisée en appliquant le protocole validé. Un total de 180 organismes a été analysé (120 moules et 60 huîtres). Le niveau de contamination en MP dans ces espèces a donc pu être évalué sur la côte Atlantique de la région Pays de la Loire et comparé à d'autres sites d'étude de la littérature. Ce sont les premières données faisant état d'une contamination par les MP pour ces espèces, dans cette zone géographique.

Sur le volet quantitatif, dans les 180 organismes de moules et d'huîtres étudiés, tous facteurs confondus, 199 MP ($\geq 20 \mu m$ en taille) ont été retrouvés. Pour l'huître et la moule, les niveaux de contamination atteignent respectivement 2,10 ± 1,71 (N = 60) et 0,61 ± 0,56 (N = 120) MP par individu. Lorsque ces résultats sont exprimés en fonction de la quantité de matière, les valeurs sont plus homogènes et correspondent respectivement à 0,178 ± 0,160 et 0,228 ± 0,197 MP par g de poids frais. Ces niveaux de contamination sembleraient être en-deçà de valeurs trouvées pour d'autres sites d'étude à travers le monde mais les comparaisons restent difficiles, à cause d'un manque de standardisation des méthodes d'analyse. En considérant ces valeurs dans le régime alimentaire des français qui est constitué de 74 130 tonnes d'huître et 183 880 tonnes de moule pour l'année 2015 (FranceAgriMer, 2016), soit 30% de ces masses environ correspondant aux tissus frais, un calcul rapide mène à une ingestion de MP par l'homme pouvant atteindre plus de 240 MP par personne et par an, en considérant seulement la consommation de ces deux espèces. En prenant en compte tous les bivalves, une valeur d'exposition de l'homme à 11 000 MP par an avait été estimée dans l'étude de Van Cauwenberghe and Janssen, (2014).

Sur le volet qualitatif, une dizaine de différents matériaux de MP a été retrouvée, avec une grande proportion de PE et PP mais aucun PVC. Mise à part l'absence de PVC, cette répartition semble en accord avec les quantités utilisées pour chacun de ces types de matériaux plastiques. La forme prédominante est le fragment et la couleur la plus retrouvée est le gris. Ces critères traduisent probablement que le plastique sous forme de débris, puis de MP, a passé un long temps dans l'environnement. D'autre part, il est bien difficile de trouver l'origine de ces MP. Les tailles des MP retrouvés dans les huîtres sont plus grandes que celles retrouvées dans les moules, ce qui est adéquation avec la taille des organismes.

Finalement, à l'aide de la stratégie d'échantillonnage choisie, l'influence de différents facteurs tels que le mode de vie des organismes (cultivés ou sauvages), et le site et la saison d'échantillonnage a été estimée. Globalement, pas de différence marquante a été observée pour les facteurs étudiés.

En parallèle de la récolte des échantillons de bivalves, des sédiments des mêmes sites ont également été prélevés aux mêmes saisons. Par conséquent, la suite de ce travail doctoral est dédiée à l'analyse des MP dans les sédiments. Le chapitre suivant traite donc de l'évaluation de la contamination du sédiment issu du milieu dans lequel ont évolué les moules et les huîtres prélevées.

Chapitre III:

CONTAMINATION DES SEDIMENTS DES VASIERES INTERTIDALES PAR LES MICROPLASTIQUES

Liste des articles:

Article n°4 : Abundance and characteristics of microplastics in Atlantic coastal sediments

Publication soumise dans le journal "Environmental Pollution" en 2018

En 2004, Thompson et ses collègues ont alarmé la communauté scientifique sur les déchets plastiques « disparus » dans le milieu marin, les quantités observées dans l'eau de mer (à la surface et dans la colonne d'eau) étant très inférieures aux quantités totales atteignant le milieu marin. L'hypothèse de leur décantation vers les fonds sédimentaires a été évaluée par des études de plus en plus nombreuses (**figure 3.1**). Dans ce cadre, une diversité de procédures d'extraction et d'identification des MP dans les matrices minérales et organiques ont été développées. Peu d'entre elles ont fait l'objet d'une validation approfondie et des progrès sont encore attendus dans ce domaine d'analyse.



Figure 3.1: Evolution des études sur les microplastiques dans les sédiments (d'après Van Cauwenberghe et al., 2015)

La différence de composition de matrice entre les organismes et les sédiments implique des spécificités dans les procédures d'extraction des MP. Les échantillons de biote contenant une quantité importante de composés organiques, une étape de digestion est indispensable. En revanche, les procédures d'extraction des MP développées à partir de sédiments marins, matrice essentiellement minérale (moins de 7% de matière organique en général, Crichton et al., 2017) n'implique que rarement une étape de digestion. Cependant, les particules minérales présentes dans les sédiments sont très diverses, contenant principalement du quartz et de la calcite (CaCO₃), représentant à eux seuls de 13 à 70% et de 7 à 30% en masse respectivement (Preda and Cox, 2005). En complément, d'autres espèces minérales, telles que les oxydes et hydroxydes métalliques, les silicates et les argiles peuvent être observées en teneurs très variées (Basaham, 2008). Cette matrice minérale constitue une difficulté analytique et complique la

comparaison des données rapportées dans la littérature, en raison de la variété des protocoles d'extraction et d'identification mis en œuvre.

L'analyse des résultats rapportés dans la littérature révèle des valeurs s'échelonnant de quelques particules/kg de sédiment sec (Dekiff et al., 2014; Frere et al., 2017; Stolte et al., 2015) à plusieurs milliers de particules/kg de sédiment sec (Blumenroder et al., 2017; Lislie et al., 2017; Nel and Froneman, 2015). Les concentrations mesurées dans les sédiments sont le plus souvent exprimées en nombre de MP par masse de sédiment sec (g ou kg). Cette unité permet de s'affranchir des variations de teneur en eau dans l'échantillon sédimentaire, fluctuant fortement en fonction de la saison, de la profondeur et de la nature du sédiment prélevé. Parmi les facteurs liés au protocole de préparation d'échantillon, l'étape de séchage des sédiments (entre 40 et 80°C pour les diverses études publiées sur les sédiments) ne parait pas influencer la qualité du spectre des MPs (Claessens et al., 2013 ; Coppock et al., 2017). Cependant, le tamisage peut impacter fortement les résultats obtenus, en raison des différences de taille des tamis utilisés, excluant ainsi certaines classes de tailles de MP (exemple : 38 μ m à 1 mm dans l'étude de Claessens et al. (2011) ; entre 0,25 à 4 mm dans l'étude de Carson et al. (2011) ou bien inférieur à 1 mm dans l'étude de Dekiff et al. (2014)).

Au-delà de ces facteurs, purement analytiques, des différences dans les facteurs intrinsèques liés au site et à la profondeur de prélèvement sont également source de variabilité.

La localisation du site de prélèvement est un élément primordial qu'il faut considérer lors de la mise en place des études et des conclusions que l'on tire de ces études. Pour exemple, Matsuguma et al. (2017) ont mis en évidence, à l'aide d'un protocole d'extraction et d'identification identique, les différences de contamination en MP dans les sédiments de Thaïlande (100 MP/kg sédiment sec) et du Japon (1900 MP/kg sédiment sec). La direction des courants marins, la saison, la marée, et son intensité, sont les principaux facteurs abiotiques étudiés. Alomar et al. (2016) ont ainsi montré que les sédiments provenant des zones littorales protégées (sans activités de pêche) sont plus contaminés que ceux des zones urbanisées et peuplées, traduisant l'importance des courants marins sur le transfert de MP vers des zones de dépôt et sur le transport de la colonne d'eau vers les sédiments profonds et peu profonds.

L'influence des courants marins sur la concentration et la nature des MP dans les sédiments a également été étudiée de manière approfondie par plusieurs auteurs (Browne et al., 2010; Nel and Froneman, 2015; Peng et al., 2017).

En parallèle, la distance du site de prélèvement à la rive influence également fortement la concentration en MP. D'importantes concentrations en MP ont ainsi été mises en évidence pour les points de prélèvement les plus proches de la rive par Vianello et al. (2013). La même observation a été faite dans le travail de Graca et al. (2017) qui montre une diminution de la quantité de MP quand la distance à la rive augmente. D'autres facteurs influent sur la contamination tels que (i) la hauteur de prélèvement (teneurs en surface des sédiments (0 à 6 cm) supérieures à celles de sédiments plus profonds (8 à 10 cm) (Matsuguma et al., 2017) ; (ii) la marée (teneurs plus importantes après des phénomènes de marée de faible coefficient, Liebezeit and Dubaish, 2012; Mathalon and Hill, 2014) ; (iii) la saison (variation qualitative des MP, Stolte et al., 2015), (iiii) la submersion (Cannas et al., 2017).

L'étude des sources de MP présents dans les sédiments est complexe. La contamination n'est pas uniquement liée à la densité de population à proximité mais à la coexistence de diverses activités comme l'agriculture (Guerranti et al., 2017), les activités de loisirs (Ng and Obbard, 2006), le tourisme (Stolte et al., 2015). Les activités industrielles, le transport maritime et les activités aquacoles sont, également, majoritairement rapportées dans la littérature comme source de MP dans les écosystèmes littoraux (Blumenroder et al., 2017; Ng and Obbard, 2006; Reddy et al., 2006 ; Stolte et al., 2015).

Dans ce contexte, la nécessité de caractériser la contamination des vasières intertidales sur lesquelles se développent des activités aquacoles constitue un enjeu important. Dans ce chapitre sera présentée l'optimisation de la procédure analytique pour l'identification et la quantification des MP dans les sédiments, marins réalisée sur la base de protocoles existants, et dans un objectif de rapidité, simplicité et de coût analytique faible. Le protocole optimisé a, dans un second temps, été appliqué à l'analyse de la contamination des sédiments des vasières sur lesquelles évoluent les différentes espèces de bivalves étudiées dans le chapitre 2. Ceci nous permettra d'étudier, en partie, les relations entre la contamination des bivalves et celle de leur habitat.

Article n°4 :

Abundance and characteristics of microplastics in Atlantic coastal sediments

Nam Ngoc Phuong^{1, 2}; Laurence Poirier^{1,*}; Fabienne Lagarde³; Abderrahmane Kamari¹; Aurore Zalouk-Vergnoux¹

¹Laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS, EA 2160), Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, Nantes F-44000, France

²PhuTho college of Medicine and Pharmacy, 2201 Hung Vuong Boulevard, Viettri City, PhuTho Province 290000, Vietnam

³Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM, UMR CNRS 6283), Université du Maine, Avenue Olivier Messiaen, Le Mans F-72000 France

*Corresponding author: laurence.poirier@univ-nantes.fr

Abstract

The ubiquitous presence of microplastics (MPs) has been demonstrated in all environmental compartments in the recent years. They are detected in air, freshwater, soil, organisms and particularly in marine ecosystems. Since sediments are known to be the major sink of many organic and inorganic pollutants, this study aimed to evaluate the MP contamination of the sediments from French Atlantic coastal areas. Sediments were sampled at three locations (Pays de la Loire region, France) and two seasons: October 2015 and March 2016. The analysis protocol involved MP extraction from dried sediments using milliQ water and centrifugation technic. After a filtration step of supernatants, MPs were detected and identified directly on the membrane filters using µFTIR spectroscopy in reflection mode. For the first time, the replicate number allowing to obtain a satisfying representativeness of the whole sampled sediment was also evaluated at 10 replicates of 25g each. The average number of MPs in sediments was 67 (±76) MPs/kg dw (N=60) with no significant difference between sites and seasons. Ten different compositions of MPs were defined by µFT-IR with a high proportion of polypropylene (PP) and polyethylene (PE), 38 and 24% respectively. Among MPs, mainly fragments (84%) were observed with main size classes corresponding to [>100 µm] and [50-100 µm] but few particles > 1 mm could be found suggesting that mainly small microplastics (< 1 mm) are subject to vertical transport.

Keywords: microplastics; sediment; quantification; characterization; Gulf of Gascogne; μ FT-IR

I. Introduction

Applications and societal benefits of plastics have increased due to their advantages (Andrady and Neal, 2009). Three hundred and twenty two million tons of plastics are produced and the production is increasing annually since 2013 (PlasticsEurope, 2016). Most of them are used for single-use (Hopewell et al., 2009) and estimation of 10 per cent ends up in the ocean (Barnes et al, 2009). The plastic wastes assumed as a major source of microplastics (MPs, \leq 5 mm in size) by the fragmentation of plastic debris due to mechanical, chemical and biological factors (Andrady, 2011; Costa et al., 2010; Zettler et al., 2013). Consequently, damages in the marine environment due to the presence of MPs were reported (Andrady, 2011; Cole et al., 2011; Gall and Thompson, 2015). Hence, the assessment of MP levels in marine environments (waters, sand/sediment and animals) is focused by scientists for the last decade (Besseling et al., 2015; Cozar et al., 2015; Desforges et al., 2014, 2015; Mathalon and Hill, 2014; Phuong et al., 2018).

Among different environmental compartments, numerous studies concentrated on the sediment (Van Cauwenberghe et al., 2015b) because they are known to be a major sink of contamination of marine ecosystems as dense MPs can sink directly. However, most studies demonstrated that floating MPs (*e.g.* polyethylene and polypropylene, with a density lower than water) were also found in sediment (Carson et al., 2011; Dekiff et al., 2014; Frere et al., 2017). The sedimentation of these MPs could be explained by the change of their density due to biofouling action (Zettler et al., 2013; Lagarde et al., 2016) and/or sorption of organic matter (Bakir et al., 2012, 2014; Lee et al., 2014; Teuten et al., 2007). Rocha-Santos and Duarte (2015), highlighted the lack of standardized protocols for MP contamination assessment in 2015. It is always the case at this time, for all steps of analytical procedures including the sampling, extraction, identification and characterization of MPs. This lack of standardization leads to a difficult comparison of results from several studies using different protocols. For example, the use of a digestion step or not, different sizes of sieves, different spectroscopy methods (Raman *vs* FT-IR), are all sources of results variations between studies. **Table 1** shows the wide variety of protocols used in studies about MPs in sediments.

Table 1: Sources, procedures and references corresponding of MP contamination assessment in marine sediments (classification done by identification technics).

Sampling	Direction	Extraction		Identification	Procedure recovery (0/)	Pafarancas
area	Digestion	Reagents	Method	Identification	Flocedule lecovery (%)	References
Spain	No	H ₂ O	Shaking 15min	Observation	Nd*	Alomar et al., 2016
Italy	No	NaCl	-	Observation	Nd	Guerranti et al., 2017
Italy	No	NaCl	-	Observation	Nd	Cannas et al., 2017
USA	No	NaI	Stirring vigorously	Observation	Nd	Graham and Thompson, 2009
Belgium	No	NaI	Centrifugation (3500gx5min)	Observation	98-100% of PVC**	Van Cauwenberghe et al., 2013
Germany	No	CaCl ₂	Settle overnight	Observation	20-100% of PE spiked depend on color	Stolte et al., 2015
Adriatic Sea	No	NaCl	Shaking vigorously	Observation	Not reported	Blaskovic et al., 2017
North Sea	H_2O_2	ZnCl ₂	-	Observation	Nd	Liebezeit and Dubaish, 2012
Canada	H_2O_2	NaCl	Stirring 2min	Observation	Nd	Mathalon and Hill, 2014
South Africa	No	NaCl saturated	Stirring vigorously	Observation	Nd	Nel and Froneman, 2015
Canada	No	Na_2WO_4	Shaking vigorously	Observation (verified with Raman)	Nd	Ballent et al., 2016
Baltic Sea	No	NaCl	Shaking 2min	Observation (verified with µFTIR)	Nd	Graca et al., 2017
Portugal	No	NaCl	Stirring vigorously	Observation (verified with µFTIR)	Nd	Martins and Sobral, 2011
North Sea	No	NaCl	Stirring vigorously	Observation (verified with FTIR)	Nd	Leslie et al., 2017
China	H_2O_2	NaCl	Stirring manually	Observation (verified with µFTIR)	Nd	Peng et al., 2017
Hong Kong	H_2O_2	NaCl	Shaking vigorously	Observation (verified with FTIR)	3.3% of PVC and 100% of PP	Tsang et al., 2017
Germany	No	NaCl-NaI	-	TD-PYR-GC/MS	Nd	Dekiff et al., 2014
Germany	H_2O_2	NaCl-NaI	-	TD-PYR-GC/MS	68-99% depend on MP type	Nuelle et al., 2014
Western Europe	No	NaI	Centrifugation (3500gx5min)	Raman spectroscopy	98-100% of PVC**	Van Cauwenberghe et al., 2015a
Italy	No	ZnCl ₂	-	Raman spectroscopy	Nd	Imhof et al., 2013
France	No	NaCl-Na ₂ WO ₄	-	Raman spectroscopy	Nd	Frere et al., 2017
USA	No	NaCl	Stirring	FTIR spectroscopy	Nd	Carson et al., 2011
Canada	No	Canola oil	Settle 2min	FTIR spectroscopy	92-99% depend on MP form	Crichton et al., 2017
North Sea	No	Nile red, ZnCl ₂	Centrifugation (100gx60min)	FTIR – Fluorescence	85-98% depend on sediment sample	Maes et al., 2017a
England	No	NaCl saturated	Stirring 30s	FTIR spectroscopy	Nd	Blumenroder et al., 2017
England	No	ZnCl ₂	Stirring 3min	FTIR spectroscopy	92-98% depend on MP type	Coppock et al., 2017
Singapore	No	NaCl, Tween-80	Centrifugation (200 cycles/2min	FTIR spectroscopy (ATR)	55-72%	Nor and Obbard, 2014
Eastern Asia South Africa	H_2O_2	NaI	Centrifugation (2000x10min)	FTIR spectroscopy (ATR)	93%	Matsuguma et al., 2017

Chapitre III

CONTAMINATION DES SEDIMENTS DES VASIERES INTERTIDALES PAR LES MICROPLASTIQUES

England	No	NaCl saturated	Stirring 30s	FTIR spectroscopy (ATR)	Nd	Browne et al., 2010
Arctic	No	ZnCl ₂	Stirring 35-60min	µFTIR spectroscopy (ATR)	Nd	Bergmann et al., 2017
England	No	NaCl saturated	Stirring 30s	FTIR spectroscopy (transmission)	Nd	Thompson et al., 2004
India	No	NaCl saturated	Stirring 1-2h	FTIR spectroscopy (transmission)	Nd	Reddy et al., 2006
Atlantic ocean	No	NaCl	Stirring 30s	FTIR spectroscopy (transmission)	Nd	Woodall et al., 2014
Singapore	No	NaCl saturated	Centrifugation (200	FTIR spectroscopy (reflection)	Not reported	Ng and Obbard, 2006
			cycles/1min)			
Belgium	No	NaCl saturated	Stirring 2min	FTIR spectroscopy (reflection)	69-98% depend on MP type	Claessens et al., 2011
Italy	No	NaCl	Stirring 1.5min	µFTIR spectroscopy (reflection)	Nd	Vianello et al., 2013

*: Nd (not determined); **: results are belong to Claessens et al. (2013)

Besides the different analytical protocols, location of studied areas seems obviously to be a major factor influencing MP distribution in the field (Alomar et al., 2016; Ballent et al., 2016) and there are also many other reported influencing factors (Hanvey et al., 2017) such as season, sea current, the tide... Matsuguma et al. (2017) found that the MP abundance in sediment depended on the depth of sampling in Japan, Thailand, Malaysia and South Africa. Regarding the Table 1, all the protocols included three principal steps as digestion, extraction and identification of MPs. The digestion step was used in six studies over the 28 listed ones to remove organic matter, all using hydrogen peroxide. For MP extraction from sediments, most of studies used dense solutions, such as saturated NaCl, NaI, CaCl₂ or ZnCl₂ combined or not with centrifugation technic. Recently, several studies used physical and chemical properties of MPs, such as their hydrophobicity, using Colza oil for isolation or their adsorption capacity, using Nile Red, to facilitate microscopic observation (Crichton et al., 2017; Maes et al., 2017a). Nevertheless the colonization of micro-organisms or the sorption of amphiphilic/hydrophilic compounds on MP surface could lead to a more limited performance of these methods. As reported in **Table** 1, in many studies MPs identification was only performed using microscopic observation, without any spectroscopic method. It was demonstrated as not totally sufficient to assess the environmental MP contamination (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Some other studies extrapolated the number of MPs by spectroscopically analyzing only a part of the particles which were previously observed by microscopy, but this method seems to be not precise enough since the determined number could be very different to the real number of MPs in the sample. Each technic displayed different advantages and disadvantages, mainly according to the limited size of analyzed MPs and time consumption (Kappler et al., 2016). Finally, as the MP distribution in sediment sample is assumed to be not homogeneous, the number of sample replicates is also a parameter to examine to ensure the representativeness of the data. The aim of this study was to develop and validate a fast and cheap methodology to assess the MP contamination in intertidal sediments from the Gulf of Gascogne coast (Pays de la Loire region, France). This littoral region gathers significant areas of aquaculture at national level, for which the characterization of MP contamination is of great concern. For the first time the representativeness of the data obtained, according to the number of analyzed replicates was investigated. Finally, a comparison of our results with previous data obtained along the French North-East Atlantic coast, in seawater, sediments and marine organisms was considered, to highlight relationships between the contamination in both environmental compartments, *i.e.* physical and biotic.

II. Materials and methods

II.1. Studied sites and sediment sampling

In order to assess the MP contamination in the shellfish habitats, sediments were sampled in the production zones. Three locations were selected in the region of Pays de la Loire: Pen-Bé (N 47°25'33" W 2°27'46"), Coupelasse (N 47°01'31" W 2°01'99") and Aiguillon Bay (N 46°16'26" W 1°14'14"). They are three important spots of shellfish production at regional and national scales, leading to important socio-economic concerns. The strategy and the description of sampling areas are detailed in a previous study (Phuong et al., 2018b). For each sampling site, sediments were collected on intertidal mudflats, close to farming areas, at two different seasons: October 2015 (beginning of autumn) and March 2016 (beginning of spring). In autumn at Aiguillon bay, the surface sediments (20 cm of depth) were sampled using a boxcorer from a boat, because of high tide. For all the other samplings, the surface sediments (10 cm of depth) was picked-up with a spatula, at low tide, on three 50 cm length squares. Collected sediments were placed in glass-boxes, then conducted to the laboratory in a refrigerated enclosure. Nitrile gloves were used all the time of sampling.

II.2. MP Analysis

II.2.1 Good laboratory practices

In laboratory, sediments were kept in a freezer at -20°C until analysis. All experiments were carefully performed with the aim of preventing MP contamination. Materials were previously rinsed three times with MilliQ water (PUBLAB, Option R-7/15) before of their use. Laboratory coats in cotton and nitrile gloves were worn all the time. Sample handling was performed in a clean hood.

II.2.2 Sample treatment

The sediments were taken out of the freezer and thawed just before their preparation for analysis. They were kept under aluminum foil and dried during 24 h, at 80°C, in an oven. Then, they were sieved with 1 mm stainless steel metal.

II.2.3 MP extraction

The protocol of extraction was performed on dried and sieved sediments (fraction < 1 mm). The remaining matter on the 1 mm stainless steel metal sieve was also analyzed to ensure the absence of MPs in this fraction. Sediment matters were introduced into centrifuge tubes of 50 mL (Nalgene tube – Thermo Fisher Scientific).

A preliminary set-up including a step of digestion before centrifugation was considered using KOH (10%) or HNO₃ (65%). These reagents were added in ratio 2:1 v/m (20 mL reagent for 10 g of dried sediment). The results obtained during these tests were not conclusive.

Then a simple extraction method, using 20 mL of demineralized water or KI 50 % solution added in the tubes, was preferred and tested. After a careful stirring, using a stainless-steel spoon, the samples were centrifuged. Some conditions of temperature, duration and speed of centrifugation were tested. The better conditions of centrifugation based on the maximum of recovered MPs during the validation of the method were: 18° C, during 5 min at 500 cycles/min (Centrifuge, jouan MR23i). The surface of supernatants were then collected using Pasteur pipettes and filtered on cellulose nitrate membranes with pore diameters of 12 µm and a diameter size of 25 or 47 mm. Finally, filters were dried at room temperature in glass Petri dishes remained closed until analysis.

II.2.4 MP Identification

The identification and characterization of MP was performed directly on the filters by using Fourier transform infrared microscopy system (μ FT-IR; Spotlight 200i FT-IR microscopy system, PerkinElmer) in reflection mode. The size, the color and the form of MP were determined. The color and size were recorded according to Galgani et al. (2013). The MP were then categorized in 3 ranges of size: 20-50 μ m; 50-100 μ m and >100 μ m. The whole surface of each filter was inspected and for each particle, a measurement was realized with 8 accumulations ranging from 4000 to 600 cm⁻¹. The microscope had a magnification of about 300x. For the first measure, an aperture 60 x 60 μ m was used and then changed depending on the size of interesting particles. The spectrum of the particle was then compared to the polymer database (PerkinElmer library about of 8000 reference spectrums) and the type of polymer was determined when the research score was higher than 60 %.

II.2.5 Protocol validation

The protocol of analysis was validated by spiking sediment samples with MPs. The MPs were employed as references and should represent the different possible densities of MPs. That point explain why MPs with density lower than the water were chosen PE (d = 0.91-0.94 g.cm⁻³) and PP (d = 0.83-0.85 g.cm⁻³) as well as higher than water PVC (d = 1.38 g.cm⁻³) and PET (d = 1.37 g.cm⁻³). These MPs were generated from the cryo-milling of commercial polymers in

laboratory. MPs of PE, PP and PVC were respectively made from a cable, a bag and a pipe. PET MPs were made from a water bottle. All of these MPs ranged from 50 to 400 μ m after a separation step using metallic sieves. Ten fragments of each polymer were used for spiking the sediment samples. After analysis, the recoveries were calculated for each polymer. In parallel, blanks (without sediment) were also performed following the same protocol for the evaluation of the cross-contamination due to airborne, manipulation... Once validated, the protocol was applied to the sediment samples and the results were expressed as MP number (average \pm standard deviation) per kg of sediment dry weight (dw).

II.3. Representativeness of the sample

The aim was to determine the number of replicates needed to give results representative of the whole sediment sample. For this test, the sediment of one site and one season was randomly selected. The validated protocol of MP analysis was applied to 20 sub-samples of 25 g each, called replicates, and the MP abundance was measured for each replicate. The average number of MPs in the sediment was calculated depending on the number of replicates, successively and randomly added one by one. The minimum of replicates leading to a good representativeness of the whole sediment was graphically determined.

II.4. Statistical analysis

Data were analyzed using XLSTAT software. Non-parametric tests (Kruskal-Wallis test (KW)) were used in order to highlight significant differences of MP contents in sediments collected at different sites and seasons. Differences between sediment types were considered as significant when p < 0.05. The KW test was followed by a post hoc test Multiple Comparisons of p-value (MCP) when it was significant at p < 0.05.

III. Results and discussion

III.1. Protocol set-up and validation

For the protocol set-up, a step of digestion before the extraction was first considered using KOH, which is known as a good reagent for the digestion of organic matter (Dehaut et al., 2016; Phuong et al., 2018). However, these tests were not conclusive because precipitation appeared in the solution, even after centrifugation. The substitution of KOH by HNO₃ was tested for this digestion step. Recoveries from 66 to 100% were found for PE and PP but only 3.3% at the best of PVC MPs were detected in spiked samples, respectively with and without sediments. HNO₃ probably reacted with the surface of PVC MPs leading to changes of their

surface properties. Moreover, this acid was reported as damaging nylon (Claessens et al., 2013) and discoloring PE (Phuong et al., 2018). Finally, no step of digestion was considered as marine sediments analyzed contained little organic debris. Thus, the following tests were only based on flotation separation technics. Tests using KI 50 % instead of water for the centrifugation step were performed, but a lot of matter in suspension and at the surface of the solution was observed after the centrifugation. As a consequence, larger filters (47 mm) had to be used leading to a time of μ FT-IR analysis longer, without any improvement of the spiked MPs recovery. Finally, the optimized procedure of MP extraction involved 20 mL of demineralized water added to 25 g of 1 mm-sieved sediments and a centrifugation step followed by a filtration step on a 12 μ m pore-size filter of 25 mm. This procedure could be characterized as cheap, "green" and rapid which is valuable for the assessment of the environmental contamination.

The results obtained after the analysis of sediments spiked with MPs and extracted according to the optimized procedure showed good recoveries for the 4 MPs tested (PE, PP, PVC and PET), whatever their relative density to the water. The recoveries with sediment (107 ± 6 , 83 ± 6 , 93 ± 6 and $83\pm6\%$ respectively for PE, PP, PVC and PET; N=3) were not significantly different to recoveries without sediment (respectively 97 ± 6 , 87 ± 15 , 87 ± 6 and $93\pm6\%$ for PE, PP, PVC and PET; N=3). The flotation of plastics is not completely based on the density. This process was shown to be influenced by other factors such as the size, the shape, the chemical and physical properties of the surface (wettability, free energy level, polarity etc.) (Shen et al., 2001; 2002; Wang et al., 2014). The flotation of high density MPs was already observed and discussed for MPs made of PVC (1.14 - 1.38 g.cm⁻³), polyurethane (PU, 1.20 - 1.26 g.cm⁻³), polyamide (PA, 1.12 - 1.15 g.cm⁻³) in seawater of Atlantic Ocean (Enders et al., 2015) or PET (1.38 - 1.41 g.cm⁻³) in the sea surface microlayer of Korea coast (Song et al., 2014).

Regarding identification, three out of the four MP types (PE, PP and PVC) provided satisfactory identification score through FT-IR analysis, about 80% for PE and PP and 65% for PVC. For MPs made of PET, the first given identification comparing spectra to the library was "polyester" with a research score around of 94%. The identification as PET was only reaching 65%. Nevertheless, it is important to consider that polyester corresponds to a large group of polymers which include PET. The low evidence for PET identification may be due to the possible presence of additives in the PET MPs.

Globally, for spiked or raw sediment samples, only about 10% of particles visualized on filters were confirmed as made of plastic by µFT-IR, as previously highlighted in previous studies

(Hidalgo-Ruz et al., 2012, Phuong et al., 2018). To complete the validation, 10 blanks were performed by using 25 mL of demineralized water instead of 25 g of sediment. After drying, centrifugation and filtration steps, the microscopy allowed the quantification of an average of 1 (±1) items per filter. Three out of the fourteen items detected in these blanks were small filaments with a thickness inferior to 15 μ m. The chemical identification was only possible for particle size > 20 μ m due to the limited focalization on measurement point using μ FT-IR in reflection mode. When achievable, the identification of items concluded to no particles made of plastics. This experiment allowed to ensure no cross-contamination by MPs considering a size superior to 20 μ m. The difficulty to identify fibers, since they have a small size, was also reported in the work of Wesch et al. (2017).

III.2. Representativeness of the sample

After the analysis of 20 sub-samples of 25 g of the same dry sediment (replicate), the results were expressed for each replicate as the number of MPs per kg of dry sediment. Then, the average of the MP number was calculated after taking into account successively the addition of another replicate result randomly selected. The **Figure 1** represents the average of MP number per kg of dry sediment related to the number of replicates considered for the calculation of the average.



Fig. 1: Average of MP number found in sediment related to the number of replicates (dry sediment sub-sample of 25 g)

Although the sediment was mixed before analysis, the **Figure 1** demonstrates that the MP number in replicates was highly variable. When the number of replicates was low, *i.e.* 2 to 9, the average of MP number was increasing from 0 to 80 MP/kg of dry sediment. Then, when

the number of replicates was between 10 and 20, the average of MP number reached a plateau with values ranging from 75 to 100 MP/kg of dry sediment. The **Figure 1** highlights that it was essential to analyze a minimum of 10 replicates, in the case of this study, to ensure the representativeness of the whole sediment sample. These 10 replicates correspond to a total mass of sediment of 250 g. In other studies, the number of replicates was lower than 10 (Blaskovic et al., 2017; Carson et al., 2011; Claessens et al., 2011) but the mass of sediment analyzed was also higher. In fact, if the quantity of MPs in the different replicates would be similar, the representativeness would be ensured and 3 replicates could be enough for statistical tests. However, this is not the case because the variable 'MP distribution' is discontinue. Due to these results, 10 replicates of 25 g of dry sediment were performed for sediments of each site and season.

III.3. MPs in the sediments

III.3.1. Quantitative results

No plastic item was observed in the > 1 mm sediment fractions from each site and season. This observation highlighted than the accumulation of large MPs (> 1 mm) in intertidal mudflats is limited. It seems to be consistent with the model describing the MP distribution in seawater (Enders et al., 2015). These authors demonstrated that buoyant polymers like PE and PP of sizes \geq 1mm are floating on the surface in a similar manner as it is expected for the macroplastic debris. The small MPs (10 and 100 µm) are expected to be found deeper in the water column (average of 24 m for 100 µm MP, and 33 m for 10 µm MP). The residence time of large MPs in the surface ocean is then considered to be longer than for small MPs.

In the sieved sediment samples (< 1 mm), the average concentration for all the considered samples was 67 (\pm 76) MPs per kg of dry sediment (N=60). Moreover, all sediment samples contained MPs. This result corroborates the ubiquity of MPs in marine environment (Browne et al., 2011; Eriksen et al., 2014).
The **Figure 2** shows the results of MP abundance in sediments according to the site and the season.



Fig. 2: MP abundance in sediments related to the sampling site and season expressed as number of particle/kg of dry sediment. N=10 and box-plots depicted minimum, first quartile, median, third quartile and maximum values.

The medians ranged from 28 to 88 MPs per kg of dry sediment. The **Figure 2** shows a great variability of the results because of the MP number in sediments is a discontinuous variable as explained above. Thus, no significant difference was highlighted between sediments from the different sampling sites collected at both seasons. The anthropogenic pressures of the different sites, the maximum distance of 140 km between them and their oceanic and terrigenous influences did not lead to different MP contaminations as already shown in bivalves from the same sampling sites (Phuong et al., 2018b).

In order to compare the results of the present study to those reported in the literature, **Table 2** reports MP abundance found in sediments from different sampling locations around the world.

Chapitre III

CONTAMINATION DES SEDIMENTS DES VASIERES INTERTIDALES PAR LES MICROPLASTIQUES

		MP	S	
Continent	Sampling area	Quantity in sediment (nb of particles/kg dw)	Characteristics	References
America	USA	79-165	Fragments	Graham and Thompson, 2009*
	Canada	83-161.8	Fibers (77%)	Crichton et al., 2017
	Canada	760	PE, PS	Ballent et al., 2016
	Canada	2000 - 8000	Fibers	Mathalon and Hill, 2014
Africa	South Africa	400 - 1750	PE, copolymer	Matsuguma et al., 2017
	South Africa	161-759	Blue/black fibers	Nel and Froneman, 2015*
Antarctica	Arctic ocean	42 - 6595	< 25µm (80%)	Bergmann et al., 2017
Asia	China	121 ± 9	Fibers	Peng et al., 2017
	Hong Kong	47 - 279	PE, PP	Tsang et al., 2017
	Singapore	36.8 ± 23.6	PE, PP, PVC	Nor and Obbard, 2014
	Eastern Asia	100 - 1900	PE, PP (fragments)	Matsuguma et al., 2017
	Singapore	0 - 16	PE, PS	Ng and Obbard, 2006
Europe	Baltic Sea	25 - 53	Polyester, fibers	Graca et al., 2017
-	North Sea	100 - 3600	Spheres	Leslie et al., 2017
	Germany	1.3 - 2.3	PE, PP	Dekiff et al., 2014
	Western Europe	6.0 ± 5.7	PE, PS	Van Cauwenberghe et al., 2015
	France	0.97 ± 2.08	PE, PP	Frere et al., 2017
	Belgium	7.2 - 20.4	Fibers, granules	Van Cauwenberghe et al., 2013
	Germany	0 - 7	Fibers	Stolte et al., 2015
	England	3030	Fibers, blue, PTFE	Blumenroder et al., 2017
	England	67.4 ± 13.2	PE and PE copolymer	Coppock et al., 2017
	North Sea	210 - 461	Granule, fibers	Liebezeit and Dubaish, 2012
	England	322	PVC, polyester	Browne et al., 2010*
	England	86	Fibers, 9 natures	Thompson et al., 2004
	Atlantic ocean	200	Polyester (fibers)	Woodall et al., 2014*
	Belgium	97.2 ± 18.6	Fibers	Claessens et al., 2011
	Italy	672 ± 2175	PE, PP	Vianello et al., 2013
	Spain	900 ± 100	Black, blue	Alomar et al., 2016*
	Italy	45 - 1069	Filament	Guerranti et al., 2017
	Italy	62 - 1069	Black, blue	Cannas et al., 2017
	France	38-102	PP. PE (fragment)	This study

Table 2: MPs with size inferior to 5 mm per kg of dried sediments from different sampling locations around the world

*: quantities in sediment were recalculated with an averaged sediment density of 1600 kg.m⁻³ (Fettweis et al., 2007) and an averaged wet sediment/dry sediment ratio of 1.25 PE: Polyethylene; PP: Polypropylene; PVC: Polyvinyl chloride; PTFE: Polytetrafluoro ethylene and PS: Polystyrene.

When the results were not expressed as the number of particles per kg of dried sediment, the calculations were done to transform the unit using an averaged sediment density of 1600 kg.m⁻³ (Fettweis et al., 2007) and the averaged wet sediment/dry sediment ratio of 1.25. The present results appeared to be of the same order of magnitude than those depicted in numerous previous studies (Coppock et al., 2017; Peng et al., 2017 and Thompson et al., 2004). However, huge differences were also observed comparing to other ones, with present values higher in some cases (Dekiff et al., 2014; Stolte et al., 2015) or lower (Matsuguma et al., 2017; Nel and Froneman, 2015). As it was already discussed in the previous article about MP contamination of bivalves from this area (Phuong et al., 2018b), the similarities and differences of the results could be due to spatial variations of the MP distribution depending on different factors, *i.e.* anthropogenic pressures or water currents. But the analytical procedures of MP analysis could also be an explanation of the variations leading, theoretically, to an impossible comparison of results.

III.3.2. MP characteristics

• General characteristics

MPs found in all sediments whatever the site and the season were mainly fragments (84%) and some filaments (16%), no granule nor pellet. They were made of ten different polymers, with a majority of PP and PE, with respective proportions of 38% and 24%. Five polymers (PP, PE, PS, PVC, and polyester) represented more than 90% of MPs (respectively 38, 24, 9, 9 and 7%). The compositions of the MPs found in the sediments seemed to be a good illustration of both worldwide and European production of plastic (PlasticsEurope, 2016). The 2 predominant polymers (PP and PE) are usually used in cars, toys, housewares production and food packaging with a high demand at the European level which corresponds to 19.3 and 29.8% for PP and PE polymer type (PlasticsEurope, 2017). Besides, both of them have a short usage lifetime (Hopewell et al., 2009) contributing to their presence in environment and notably in marine compartments. PP and PE have a lower density than water and thus they should be buoyant. Their detection in sediment is the consequence of sedimentation processes as described by Enders et al. (2015) for small buoyant MPs and discussed above. Besides, the colonization of MP by micro-organisms/algae (Zettler et al., 2013), the sorption of organic matter (Teuten et al., 2007), the aggregation of MPs (Lagarde et al, 2016) or their integration in marine snow (Long et al., 2015) could lead to an increase of their density and their surface hydrophobicity. This phenomenon of sedimentation probably occurs also for polystyrene (PS) which presents a large range of density (0.16 to 1.05 g.cm⁻³; Engler, 2012). This polymer is

mainly used for drink cups, packing materials, and electronics because of its insulation properties. Concerning PVC, its presence in sediment could be expected due to its density higher than water. PVC is used in pipe (40%), cables, and food packings. Considering polyester, it represents a group of polymers, including the polyacrylate, the polyglycolide and especially the PET, mainly used as textile yarn. Thereby, according to Song et al. (2014), 75% of polyester MPs found in the sediments were filaments, probably coming from textiles. The rest of the polyester MPs (25%) were fragments maybe coming from the fragmentation of drink bottles or industrial paints. Other MPs, found in a small proportion in the sediments, were copolymers including PP or PE, acrylonitrile butadiene styrene (ABS), polyamide (PA), polyacrylonitrile (PAN) and polyvinylpyrrolidone (PVP).





Fig. S1: MP particle size distribution by length of all analyzed sites (number of particles = 55).

The smallest particle found was 40 μ m in length and the longer one was a fiber of 2000 μ m (N=55). The majority, 44 %, of particles are comprised between 100 and 250 μ m. To allow comparison with previous results obtained in bivalves (Phuong et al, 2018b), only three size ranges [>100 μ m], [50-100 μ m] and [<20-50 μ m] were considered in the following work. The MP abundances according to these three ranges reached 47%, 45% and 7% respectively.

Regarding color, the predominant colors were grey (60%) and white (13%). This result could be in line with a hypothesis of a long time past in environment. A total of 8 colors (grey, red, white, green, black, blue, pink and yellow) were observed.

• Spatial and temporal variations of MP contamination in sediments

Characteristics of MPs (type of polymer, size and color) found in the sediments from the different sampling sites collected at both seasons are given in the **Figure 3**.



Fig. 3: Distribution of MPs according to the polymer, the size and the color, identified in sediments from different sites of the French Atlantic coast and at two seasons (N=10).

Regarding the variations of the MP contamination according to the site and the season, some trends are emerging. For the polymer type, PP and PE were present in all sediments. PVC MPs were found only at Pen-Bé. This is also the site where no other polymer than PE, PP, PVC and polyester was found. PS MPs were only found in March at Coupelasse and Aiguillon bay. These sites and this season correspond also to no founding of polyester. About size classes, no clear trend really appeared. The main observation is that few MPs under 50 µm were found, whatever the site and the season (maximum on the Aiguillon bay in October with 16.67%).

III.3.3. MPs in the French North-East Atlantic coast

The MP contamination of the French North-East Atlantic coast was assessed in a few publications on water, sediment or biota compartments as shown in the **Table S2** (supplementary material).

Chapitre III

CONTAMINATION DES SEDIMENTS DES VASIERES INTERTIDALES PAR LES MICROPLASTIQUES

Commontmont		MPs	Location	Deferences	
Compartment	Levels	Qualitative	-	References	
Seawater	600 ± 300	PE, PS	North Sea	Van Cauwenberghe et al., 2015a	
(item/m ³)	0.24 ± 0.35	PE, PP (fragments)	English Channel	Frere et al., 2017	
Sediment	481 ± 587	Sphere predominant	English Channel	Maes et al., 2017b	
(item/kg dw)	4.2 ± 3.0	PE, PS	North Sea	Van Cauwenberghe et al., 2015a	
	0.97 ± 2.08	PE, PP (fragments)	English Channel	Frere et al., 2017	
	143-156	Blue and black (78-92%)	English Channel	Lots et al., 2017	
	38 - 102	PE, PP (fragments)	Gulf of Gascogne	This study	
Bivalves	0.18-0.23	PE, PP (fragments)	Gulf of Gascogne	Phuong et al., 2018b	
(item/g ww)	0.06 ± 0.13	Fibers	English Channel	Vandermeersch et al., 2015	
	0.2 ± 0.3	Particles	North Sea	Van Cauwenberghe et al., 2015a	

Table S2: MP contamination of the French North-East Atlantic coast

Results of MP contamination are really different depending on the study, *i.e.* the studied site or the performed analytical procedure. For seawater, the variations could be explained by difference in sampling locations and methods. Frere et al. (2017) sampled in bay of Brest, using a standard Malta trawl, with a 335 μ m mesh net, while Van Cauwenberghe et al. (2015a) sampled in Nord Sea, using a bucket. As a result, the MP size found in these studies was very different with MPs ranging from 30 to 300 μ m in Van Cauwenberghe et al. (2015a) study and from 335 to 5 000 μ m in Frere et al. (2017).

About sediment, the variability of the results is great too, with levels from 0.97 to 481 items/kg of dried sediment. The results of this work were higher than those reported by Frere et al. (2017) and Van Cauwenberghe et al. (2015a) for English Channel and North Sea respectively, but lower than those of Lots et al. (2017) and Maes et al. (2017b) for English Channel. It may be a consequence of spatial variations between studies locations but also the result of different identification technics (observation in Maes et al., (2017b); Raman spectroscopy in Frere et al. (2017), Lots et al. (2017), Van Cauwenberghe et al. (2015a) and μ FT-IR in this study). The predominant shape found in the present study was fragment while it was sphere in the study of Maes et al. (2017b), showing a probable difference of contamination source. Although the sediment sampled in both studies was superficial, others factors could influence the results obtained, such as the sampling date, the exposure to ocean currents (Alomar et al. 2016) and the side distance (Vianello et al. 2013, Graca et al. 2017).

Few studies were performed on bivalves from the French North-East Atlantic coast (Vandermeersch et al., 2015; Van Cauwenberghe et al., 2015a; Phuong et al., 2018b). A higher homogeneity of MP levels could be observed for bivalves, compared to sediments. Some differences could be however highlighted in the methods used for sample treatment and MP identification (Phuong et al., 2018b). This last study concerns bivalves collected at the same sampling sites and at the same dates. MPs found were identified with the same method than those used for the sediments analyzed in the present study. As oysters and mussels are two filter-feeding organisms, their MP content should be the result of the filtration of MPs suspended or floated in seawater column. However, it appears also interesting to compare the MP contents in bivalves with the results obtained in sediments from the same area, as the MPs were likely to be present in seawater column before sedimentation. This sedimentation process was observed to occur for all MP particles with size under 100 μ m (Enders et al., 2015), naturally and also promoted by MP colonization with microorganisms or by adsorption of organic matter (Teuten et al., 2007).

In Phuong et al. (2018b), the whole abundances of MPs reached 0.23 ± 0.20 and 0.18 ± 0.16 MPs/g of wet weight of soft tissues, in mussels and oysters respectively. By considering a water level of about 70% in soft tissues of mussels and ovsters, the contamination could be evaluate at 0.77 \pm 0.67 and 0.60 \pm 0.53 MPs/g dry weight of mussels and oysters respectively. In the present study, the MP content in sediments was evaluated at 0.067 ± 0.076 MPs/g dw. The MP content in bivalves from the same location and seasons was ten times higher than those in sediment showing an accumulation of MPs by filter-feeding species. Karlsson et al. (2017) found also an accumulation of MPs by mussels in a larger proportion as MP content in mussels were approximately a thousand fold higher than those in sediments and seawater from the North Sea coast. About the MP particle size distribution, the proportion of 20-50 µm MPs was more than twice and five times lower in sediments than in oysters and mussels respectively. The proportion of MPs ranging from 50 to 100 µm was relatively similar with 53, 52 and 45% for oysters, mussels and sediments respectively. Thus, the lower proportion of small MPs (20-50 µm) in sediments was balanced with a higher proportion of MPs with size equal or superior to 100 µm, compared to bivalves. These results could suggest a potential selective filtration by the bivalves, according to the MP size, and in favor of particles with sizes ranging from 20 to 50 µm. Regarding the quality of MPs, high predominance of PE and PP proportion are showed in both matrices (sediment and bivalves) sampled on the same locations. These results seem in agreement with previous studies such as Karlsson et al. (2017) who also found PP and PE as predominant polymers in sediments and mussels, Frere et al. (2017) and Van Cauwenberghe et al. (2015a) who observed that PVC polymer was found only in sediment samples.

IV. Conclusions

A cheap, green and fast analytical procedure for MP extraction and identification from sediment was optimized and validated with good recoveries by spiking with MPs made of 4 different polymers with size superior to 20 μ m and a large range of density. The protocol corresponded to 4 successive steps: drying of sediments, centrifugation with milliQ water, filtration through nitrate cellulose (12 μ m) and direct observation/identification using μ FT-IR spectroscopy. The optimum number of sediment replicates, to achieve the representativeness of the sample, was also determined to be 10 replicates of 25 g each. Quantitative and qualitative results about MP contamination were provided for sediments from the French Atlantic coast at 3 sites and 2 seasons. The average number of MPs in sediments was 67 (±76) MPs/kg dw (N=60) with no significant differences between sites and seasons. Among MPs, mainly fragments (84%) were observed, filaments representing 16%. MPs were made of ten different

polymers, with a majority of PP, PE. The main size classes of MPs were [>100 μ m] and [50-100 μ m] with the predominant colors of grey (60%). These observations highlighted than the accumulation of large MPs (> 1 mm) in intertidal mudflats is limited. MP contents in seawater, sediments and bivalves from the French Atlantic coast sampled at the same location were discussed showing a potential selective filtration of small MPs (<50 μ m) by the bivalves which should be confirmed by laboratory experiments. Once again, this study highlights the ubiquity of MPs in marine environment. After the regulation of the use of MPs in personal care products of some countries, it remains urgent to find out solutions for managing plastic wastes.

V. Acknowledgments

We would like to greatly thank the LEX (Laboratoire d'Ecotoxicologie) and the LER PC (Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais) of IFREMER for their advices and their help during the sampling campaigns, the BASEMAN project (CSA Oceans 2, UE H2020, N° 696324) for providing the PET MPs. This work was supported by the region Pays de la Loire (Miplaqua project, 2014-2018) and by PhuTho college of Medecine and Pharmacy and government of Vietnam (scholarship of N.N. Phuong).

References

Alomar, C., Estarellas, F., Deudero, S., 2016. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. Marine Environmental Research. 115, 1-10.

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62, 1596-1605.

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 1977–1984.

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2012. Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 64, 2782-2789.

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. Environ. Pollut. 185, 16-23.

Ballent, A., Corcoran, P., Madden, O., Helm, P.A., Longstaffe, F.J., 2016. Sources and sinks of microplastics in Canadian Lake Ontarino nearshore, tributary and beach sediments. Mar. Pollut. Bull. 110, 383 – 395.

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 1985-1998.

Bergmann, M., Wirzberger, W., Krumpen, T., Lorenz, C., Primpke, S., Tekman, M.B., Gerdts, G., 2017. High quantities of microplastics in Arctic deep-sea sediments from the HAUSGARTEN observatory. Environ. Sci. Technol. 51(19), 11000 - 11010. Besselinga, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzerc, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. Mar. Pollut. Bull. 95, 248-252.

Blumenroder, J., Sechet, P., Kakkonen, J.E., Hartl, M.G.J., 2017. Microplastic contamination of intertidal sediments of Scapa Flow, Orkney: A first assessment. Mar. Pollut. Bull. 124(1), 112 - 120.

Blaskovic, A., Fastelli, P., Cizmek, H., Guerranti., C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the Croatian marine protected area of the natural park of Telascica bay (Adriatic Sea). Mar. Pollut. Bull. 114, 583–586.

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. Environ. Sci. Technol. 44, 3404–3409.

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of Microplastic on Shorelines Woldwide: Sources and Sinks. Environ. Sci. Technol. 45, 9175-9179.

Cannas, S., Fastelli, P., Guerranti, C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the coasts of south Tuscany (Tyrrhenian Sea). Mar. Pollut. Bull. 119, 372-375.

Carson, H.S., Colbert, S.L., Kaylor, M.J., McDermid, K.J., 2011. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. Mar. Pollut. Bull. 62, 1708–1713.

Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Mar. Pollut. Bull. 62, 2199–2204.

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. Mar. Pollut. Bull. 70, 227–233.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, S.C., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597.

Coppock, R.L., Cole, M., Lindeque, P.K., Queiros, A.M., Galloway, T.S., 2017. A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. Environ. Pollut. 230, 829-837.

Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., Araujo, M.C.B., Spengler, A., Tourinho, P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. Environ. Monit. Assess. 168, 299–304.

Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubeda, B., Gálvez, J.Á., Irigoien, X., Duarte, C.M., 2015. Plastic accumulation in the Mediterranean Sea. PLOS ONE, 10(4), e0121762.

Crichton, E.M., Noel, M., Gies, E.A., Ross, P.S., 2017. A novel, density-independent and FTIR-compatible approach foor rapid extraction of microplastics from aquatic sediments. Anal. Methods. 9, 1419-1428.

Dehaut, A., Cassone, A.L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. Environ. Pollut. 215, 223–233.

Dekiff, J.H., Remy, D., Klasmeier, J., Fries, E., 2014. Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. Environ. Pollut. 186, 248–256.

Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. Mar. Pollut. Bull. 79, 94–99.

Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 320-330.

Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C. A., Nielsen, T. G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \ \mu m$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Mar. Pollut. Bull. 100(1), 70–81.

Engler, R. E., 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environmental science & technology, 46(22), 12302-12315.

Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, et al. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. PLoS ONE 9(12): e111913.

Fettweis, M., Du Four, I., Zeelmaekers, E., Baeteman, C., Francken, F., Houziaux, J. S., et al. (2007). Mud origin, characterisation and human activities (MOCHA).

Frere, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffre, J., Bihannic, I., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., 2017. Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: A case study of the Bay of Brest (Brittany, France). Environ. Pollut. 225, 211-222.

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R. C., VanFraneker, J., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J.M., Palatinus, A., Matiddi, M., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, H. & Liebezeit, G., 2013. Guidance on monitoring of marine litter in European seas. EUR – Scientific and Technical Research series-ISSN 1831-9424 (online), Luxembourg Publications Office of the European Union, eds. Hanke G, Werner S, Galgani F, Veiga JM, Ferreira M., (ISBN: 978-92-79-32709-4).

Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. Mar. Pollut. Bull. 92, 170–179.

Graca, B., Szewc, K., Zakarzewska, D., Dolega, A., Szczerbowska-Boruchowska, M., 2017. Sources and fate of microplastics in marine and beach sediments of the Southern Baltic Sea – a preliminary study. Environ. Sci. Pollut. Res. 24(8), 7650 - 7661.

Graham, E.R., Thompson, J.T., 2009. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 368, 22–29.

Guerranti, C., Cannas, S., Scopetani, C., Fastelli, P., Cincinelli, A., Renzi, M., 2017. Plastic litter in aquatic environments of Maremma Regional Park (Tyrrhenian Sea, Italy): Contribution by the Ombrone river and levels in marine sediments. Mar. Pollut. Bull. 117, 366-370.

Hanvey, J.S., Lewis, P.J., Lavers, J.L., Crosbie, N.D., Pozo, K., Clarke, O., 2017. A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. Anal. Methoods. 9, 1369.

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 2115-2126.

Hidalgo-Ruz, V., Gutow. L., Thompson. L.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. Environ. Sci. Technol. 46, 3060–3075.

Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R., Laforsch, C., 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. Current. Biology. 23, 867-868.

Kappler, A., Fisher, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.J., Voit, B., 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?. Ana Bioanal Chem. 408(29), 8377-8391.

Karlsson, T. M., Vethaak, A. D., Almroth, B. C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., & Leslie, H. A. (2017). Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. Mar. Pollut. Bull. 122(1-2), 403-408.

Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hidard, S., Caruuso, A., 2016. Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. Environ. Pollut. 215, 331-339.

Lee, H., Shim, W.J., Kwon, J.H., 2014. Sorption capacity of plastics debris for hydroophobic organic chemicals. Science of the Total Environment. 470-471, 1545-1552.

Leslie, H.A., Brandsma, S.H., Van Velzen, M.J.M., Vethaak, A.D., 2017. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. Environment International. 101, 133-142.

Liebezeit, G., Dubaish, F., 2012. Microplastics in beaches of East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate. Bull Environ Contam Toxicol. 89, 213-217.

Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., Soudant, P., 2015. Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. Marine Chemistry, 175, 39-46.

Lots, F. A., Behrens, P., Vijver, M. G., Horton, A. A., Bosker, T., 2017. A large-scale investigation of microplastic contamination: Abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment. Mar. Pollut. Bull. 123(1-2), 219-226.

Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., Mayes, A.G., 2017a. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Scientific Reports. 7, 44501.

Maes, T., Van der Meulen, M. D., Devriese, L. I., Leslie, H. A., Huvet, A., Frère, L., et al. (2017b). Microplastics baseline surveys at the water surface and in sediments of the North-East Atlantic. Frontiers in Marine Science, 4, 135.

Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Mar. Pollut. Bull. 81, 69–79.

Martins, J., Sobral, P., 2011. Plastic marine debris on the Portuguese coastline: A matter of size? Mar. Pollut. Bull. 62, 2649-2653.

Matsuguma, Y., Takada, H., Kumata, H., Kanke, H., Sakurai, S., Suzuki, T., Itoh, M., Okazaki, Y., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Weerts, S., Newman, B., 2017. Microplastics in Sediment Cores from Asia and Africa as Indicators of Temporal Trends in Plastic Pollution. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1-10.

Nel, H.A., Froneman, P.W., 2015. A quantitative analysis of microplastic pollution along the southeastern coastline of South Africa. Mar. Pollut. Bull. 101, 274-279.

Ng, K L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. Mar. Pollut. Bull. 52, 761–767.

Nor, N.H.M., Obbard, J.P., 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. Mar. Pollut. Bull. 79, 278-283.

Nuelle, M.T., Dekiff, J.H., Remy, D., Fries, E., 2014. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. Environ. Pollut. 184, 161-169.

Peng, G., Zhu, B., Yang, D., Su, L., Shi, H., Li, D., 2017. Microplastics in sediments of the Changjiang Estuary, China. Environ. Pollut. 225, 283-290.

PlasticsEurope, 2016. Plastics – the Facts 2016: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

PlasticsEurope, 2017. Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, A., Poirier, L., Lagarde, F., 2018. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol set-up and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. Environ. Sci. Pollut. Res, 25, 6135-6144.

Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? Mar. Pollut. Bull. 129, 664-674.

Reddy, M.S., Basha, S., Adimurthy, S., Ramachandraiah, G., 2006. Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. Estu. Coast. Shelf Sci., 68, 656–660.

Rocha-Santos, T., Duuarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 65, 47-53.

Shen, H., Forssberg, E., Pugh, R. J., 2001. Selective flotation separation of plastics by particle control. Resources, Conservation and Recycling, 33(1), 37-50.

Shen, H., Pugh, R. J., Forssberg, E., 2002. Floatability, selectivity and flotation separation of plastics by using a surfactant. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 196(1), 63-70.

Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Kang, J. H., Kwon, O. Y., Han, G. M., Shim, W. J., 2014. Large accumulation of micro-sized synthetic polymer particles in the sea surface microlayer. Environmental science & technology, 48(16), 9014-9021.

Stolte, A., Forster, S., Gerdts, G., Schubert, H., 2015. Microplastic concentrations in beach sediments along the German Baltic coast. Mar. Pollut. Bull. 99, 216-229.

Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. Environ. Sci. Technol. 41, 7759–7764.

Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., Mc Gonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? Science, 304, 838.

Tsang, Y.Y., Mak, C.W., Liebich, C., Lam, S.W., Sze, E.T.P., Chan, K.M., 2017. Microplastic pollution in the marine waters and sediments of Hong Kong. Mar. Pollut. Bull. 115, 20-28.

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deepsea sediments. Environ. Pollut. 182, 495-499.

Van Cauwenberghe, L., Claessens. M., Vandegehuchte. M.B., Janssen, C.R., 2015a. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. Environ. Pollut. 199, 10-17.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C. R., 2015b. Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects. Marine environmental research, 111, 5-17.

Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., et al. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. Environmental research, 143, 46-55.

Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., Da Ros, L., 2013. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification. Estu. Coast. Shelf Sci. 130, 54–61.

Wang, C., Wang, H., Fu, J., Gu, G., 2014. Effects of additives on PVC plastics surface and the natural flotability. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 441, 544-548.

Wesh, C., Elert, A.M., Worner, M., Braun, U., Klein, R., Paulus, M., 2017. Assuring quality in microplastic monitoring: About the value of clean-air devices as essentials for verified data. Scientifics Reports, 7.

Woodall, L.C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G.L.J., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy, B.E., Thompson, R.C., 2014. The deep sea is a major sink for microplastic debris. R. Soc. Open Sci. 1, 140317.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. Environ. Sci. Technol. 47, 7137–7146.

Conclusions

Afin de pouvoir déterminer les concentrations en MP et leurs natures dans les sédiments du littoral atlantique, une procédure analytique peu coûteuse, « verte » et rapide a été optimisée et validée sur la matrice sédimentaire. Les rendements de récupération des particules plastiques ont été estimés par dopage avec des MP constitués de quatre polymères différents de taille supérieure à 20 μ m et d'une large gamme de densité (PE, PP, PVC et PET). Le protocole d'analyse développé implique quatre étapes successives: le séchage des sédiments, la centrifugation avec de l'eau milliQ, la filtration sur filtre de nitrate de cellulose (12 μ m) et l'observation / identification directe par spectroscopie μ FT-IR.

Deux points forts de ce protocole peuvent être soulignés:

- la procédure est rapide et peu coûteuse. L'analyse d'un échantillon dure moins de 30 heures, la majeure partie implique une étape de séchage de 24 heures, les étapes d'extraction, de filtration et d'identification représentant les 6 heures restantes.
- 2. l'utilisation de l'eau pour l'extraction des MP permet une procédure « verte » et sans risque pour l'environnement.

Le nombre optimal de réplicas à extraire pour atteindre une représentativité satisfaisante de l'échantillon a également été déterminé (10 réplicas de 25 g chacun).

La mise au point de cette méthode analytique a permis la quantification des MP dans des échantillons de sédiments superficiels prélevés sur différentes vasières intertidales du littoral atlantique, afin d'obtenir une première estimation de la contamination de ces zones. Des résultats quantitatifs et qualitatifs ont été obtenus sur trois sites et deux saisons. Le nombre moyen de MP dans les sédiments était de $67 (\pm 76)$ MP / kg poids sec (N = 60). Aucun effet significatif du site ou de la saison n'a été mis en évidence. Les MP observés présentent une forme majoritairement fragmentaire (84%) et, dans une moindre mesure, filamenteuse (16%). La majorité d'entre-eux (44 %) présentent une taille comprise entre 100 et 250 µm et moins de 4%, une taille supérieure à 1 mm. Dix polymères différents ont été mis en évidence, incluant une majorité de PP et de PE, avec les couleurs prédominantes de gris (60%). Ces observations sont en cohérence avec l'utilisation majeure de PE et de PP par notre société. Elles soulignent également l'accumulation limitée des particules de MP de grande taille (> 1 mm) dans les sédiments superficiels des vasières intertidales, ce qui corroborent des études de modélisation sur le transport et la distribution des MP de différentes tailles dans l'eau de mer et les sédiments (Browne et al., 2010; Enders et al., 2015; Isobe et al., 2014).

Les données obtenues ont été comparées aux données disponibles sur la contamination en MP dans les sédiments, l'eau et les bivalves de la côte Atlantique Nord-Est. Une importante variabilité dans les résultats peut être observée, pour les sédiments superficiels, avec des concentrations s'échelonnant de 0,97 à 481 MP/ kg de sédiments secs, du Golfe de Gascogne à la Mer du Nord. Celle-ci peut s'expliquer à la fois par des différences méthodologiques (techniques d'identification) rendant difficile la comparaison des données d'une étude à l'autre, mais également par des facteurs abiotiques (courants marins, distance de la côte, pression de contamination...). Les teneurs dans les bivalves paraissent plus homogènes, avec des valeurs s'échelonnant de 0,06 à 0,23 MP/g de poids frais, de la Manche au Golf de Gascogne. Dans la présente étude, la comparaison des teneurs mesurées dans les organismes et les sédiments superficiels fait apparaitre une accumulation des MP par les bivalves filtreurs. En effet, des concentrations moyennes de $0,77 \pm 0,67$ et $0,60 \pm 0,53$ MP/g poids sec ont été calculées dans les tissus de moules et d'huitres respectivement, alors qu'une teneur moyenne de $0,067 \pm 0,076$ MP/g poids sec a été obtenue pour les sédiments superficiels prélevés sur les mêmes sites et à la même saison. Dans les deux matrices (sédiments et organismes), une forte proportion de PE et PP est observée, sans corrélation significative en fonction du site et/ou de la saison. D'autre part, la proportion de MP présentant une taille comprise entre 20 et 50 µm est deux à cinq fois plus faible dans les sédiments, comparativement aux huitres et aux moules, respectivement. A l'inverse, la proportion de MP de taille supérieure à 100 µm est significativement supérieure dans les sédiments, comparés aux deux espèces de bivalves. Ces résultats suggèrent une potentielle filtration sélective des petits MP ($<100 \mu m$) par les bivalves qui devra être confirmée par des expériences en laboratoire.

Chapitre IV:

ETUDE DE LA SORPTION DE POLLUANTS ORGANIQUES SUR LES MICROPLASTIQUES

Lors d'une étude écotoxicologique, il convient de réaliser l'évaluation de la contamination des milieux, parallèlement à celle des effets sur les organismes, afin de déterminer des risques environnementaux potentiels. Le pari scientifique régional auquel était associé ce travail doctoral avait pour objectif de répondre à ces deux volets. Le travail doctoral présenté dans les chapitres 2 et 3 correspondait à l'évaluation de la contamination environnementale en MP. Puis, dans le cadre d'un travail post-doctoral, des tests de toxicité ont suivi pour mesurer les effets des MP sur les moules et les huîtres. Les concentrations d'exposition en MP ont été déterminées grâce aux données présentées précédemment. À la suite de cette exposition, il était envisagé de réaliser une seconde série de tests de toxicité en contaminant des milieux d'exposition de moules et d'huîtres par des MP sur lesquels serait sorbé un contaminant organique. Les contaminants organiques candidats à la sorption étaient deux estradiols et quatre alkylphénols (AP : 4-t-butyphénol (4-t-BP), 4-t-octyphénol (4-t-OP), 4-n-octyphénol (4-n-OP), 4-n-nonylphénol (4-n-NP)). C'est pourquoi, dans ce contexte, la sorption de ces contaminants organiques a été étudiée sur des MP modèles et constitue le chapitre 4 de ce manuscrit de thèse.

IV.1 Introduction

Les chapitres précédents ont fait état de la présence de MP dans différents compartiments du milieu marin : eau, sable/sédiment et animaux marins. L'omniprésence et la persistance des MP dans les milieux aquatiques sont particulièrement préoccupantes car elles représentent une menace potentielle croissante pour les organismes et les écosystèmes marins. Plusieurs effets délétères des plastiques déchets (MP, méso, macro-débris) sur les animaux marins ont été rapportés dans la littérature (Andrady, 2011; Phuong et al., 2016; Wright et al., 2013). Outre des conséquences physiques visibles à l'œil nu sur les organismes, les MP peuvent indirectement conduire à des effets au niveau de la reproduction, la réponse immunologique, le système nerveux etc. (Law, 2017). En effet, ces effets peuvent être causés par les contaminants organiques transportés et vectorisés par les MP. Ces contaminants organiques ont deux origines différentes, voire une combinaison des deux. Ils peuvent être inclus dans la composition des plastiques, en tant qu'additifs. C'est par exemple le cas des phtalates, du BPA, des PBDE, des alkykphénols, etc. D'autre part, ils peuvent provenir du milieu environnemental et être sorbés sur les MP. La quantité sorbée sur les MP dépend de certains paramètres comme la surface spécifique des MP, leur hydrophobicité, leur état de surface, etc. Des contaminants organiques hydrophobes tels que les PCB, les HAP, le DDT, le NP, ont été particulièrement sorbés aux MP retrouvés dans des échantillons environnementaux, comme indiqué dans l'état de l'art de ce manuscrit (tableau 1.7). Les MP contenant ces contaminants organiques,

concentrés dans et/ou en surface, jouent alors un rôle de puits ou de réservoirs de contaminants chimiques, présentant ainsi un risque potentiel pour les animaux marins, et à plus long terme, pour l'homme, via son alimentation.

Même si des teneurs en contaminants organiques ont été mesurées sur/dans MP et rapportées depuis 2001 (**tableau 1.7**), les études portant sur les mécanismes de sorption sont plus récentes, la plus ancienne datant de 2007 (**tableau 1.8**). Malgré tout le nombre d'études est limité, et par conséquent les conditions d'étude également. Le chapitre 1 sur l'état de l'art, et précisément le **tableau 1.8**, a permis de présenter les différentes études réalisées et de discuter sur les facteurs influençant les mécanismes de sorption, comme les propriétés physico-chimiques des MP, la nature des contaminants organiques et les conditions de travail (temps de contact, salinité, agitation, matières organiques, etc.).

Les études manquent pour définir vraiment les types d'interactions qui se produisent entre les contaminants organiques et les MP. Le terme sorption est utilisé car il englobe les phénomènes d'adsorption et d'absorption. Il faut distinguer les deux puisque l'adsorption correspond aux interactions entre la surface des MP et les contaminants organiques, alors que l'absorption reflète plutôt la présence des contaminants organiques à l'intérieur des MP. Concernant l'étude des phénomènes d'adsorption, plusieurs modèles d'étude existent comme la détermination de l'isotherme de Langmuir ou de Freundlich, voire encore le modèle Brunauer-Emmett-Teler (BET) ou Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Mais l'absorption n'est pas prise en compte dans ces modèles.

L'évolution de la teneur en contaminants organiques dans le temps permet de déterminer le temps d'équilibrage de la sorption et également la capacité de sorption de ces contaminants organiques sur les MP testés. Cette capacité est exprimée par le coefficient de distribution (K_d) qui est le rapport entre la concentration des contaminants organiques dans la phase liquide et la concentration en contaminants organiques dans la phase solide. L'unité de la concentration en phase liquide est souvent une masse par volume alors que celle de la concentration en phase solide une masse par masse. Par conséquent, l'unité de K_d standardisée est le L/kg. L'utilisation de la valeur de K_d permet de déterminer l'affinité d'un contaminant organique pour des MP dans des conditions expérimentales fixées. En effet, les conditions expérimentales vont jouer sur les mécanismes de sorption, comme cela a été explicité dans la partie bibliographique de ce manuscrit.

Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle, possédant la capacité d'interférer avec le système hormonal (ou endocrinien). Ils peuvent avoir des effets nocifs sur des fonctions aussi essentielles que la reproduction, la croissance, le développement ou encore le métabolisme. Cette propriété de certains contaminants organiques est primordiale en écotoxicologie. Ceci est un premier argument dans le choix des contaminants organiques pour cette étude. Par ailleurs, l'état de l'art concernant les contaminants organiques retrouvés sorbés sur les MP trouvés dans l'environnement (**tableau 1.7**) montre que certains alkylphénols sont fréquemment retrouvés dans les MP alors qu'ils ne sont pas cités dans les études sur les mécanismes de sorption (**tableau 1.8**). Ce chapitre de thèse a donc porté sur cette famille de contaminants organiques largement utilisés, à la fois comme additifs aux matériaux plastiques, mais aussi comme additifs dans les carburants, les lubrifiants et comme précurseurs de détergents, etc. De plus, le fait que, d'une part, peu de molécules pharmaceutiques aient été étudiées, et d'une part, la volonté, dans le cadre de cette étude, de travailler avec des composés présentant une large gamme de polarité, ont également orienté le choix vers la famille des estradiols.

Après avoir déterminé les contaminants organiques à cibler pour l'étude, il a fallu définir les concentrations de travail. Pour cela, un état de l'art a été réalisé et est synthétisé dans le **tableau 4.1.** Il porte à la fois sur les niveaux de contamination du milieu marin en octylphénol et en nonylphénol, qui sont les alkylphénols les plus répandus, et en 17β -estradiol (E2) et l'autre d'origine synthétique : le 17α -éthinylestradiol (EE2), qui sont des estradiols fréquemment retrouvés dans l'environnement, le premier étant d'origine naturelle et le second d'origine synthétique.

Tableau 4.1: Niveaux de concentration en octylphénol (OP), en nonylphénol (NP), en 17β -estradiol (E2) et en 17α -éthinylestradiol (EE2) retrouvés dans l'environnement marin.

Matriaa	Cita d'étada/aguidana	Darra	С	oncentrations ⁽¹	1)		Déférences	
Matrice	Site d'etude/espèces	Pays	4-OP	4-NP	E2	EE2	References	
	Thessalonique	Grèce	t-OP: 8-29; n-OP: nd	181-915	nd	nd	Arditsoglou and Voutsa, 2008	
		Singapour	t-OP : nd-800	280-2760	-	-	Basheer et al., 2004	
			n-OP : nd-650					
	Mer du Nord	Allemagne	-	6-33	-	-	Bester et al., 2001	
		Angleterre	-	100-2600	-	-	Blackburn et al., 1999	
		Taiwan	t-OP : 61-66	270-370	-	-	Cheng et al., 2006	
L)	Baie de Jamaïque	Etats-Unis	2-8	77-416	-	-	Ferguson et al., 2000 et 2001	
ng/	Mer du Nord	Allemagne	<1,6	0,8-63	-	-	Heemken et al., 2001	
) n		Pays-Bas	-	31-934	-	-	Jonkers et al., 2003	
Ea		Japon	-	<0,1	-	-	Kannan et al., 1998	
	Baie de Masan	Corée du Sud	-	10-928	-	-	Li et al., 2008	
	Méditerranée	Espagne	nd	300-4100	-	-	Petrovic et al., 2002	
	Venise	Italie	-	4-211	1-175	0,8-34,0	Pojana et al., 2007	
	Florida du Sud	Etats-Unis	-	-	nd-1,8	-	Singh et al., 2010	
	Golf de Gdansk	Pologne	t-OP: 1-835	4-229	-	-	Staniszewska et al., 2015	
	Mer du Nord	Allemagne	t-OP : <0,3	<1,4	-	-	Xie et al., 2006	
	Mer du Nord	Allemagne	-	13-55	-	-	Bester et al., 2001	
	Sydney	Australie	-	-	0,2-2,5	0,1-0,5	Braga et al., 2005	
		Taiwan	27-49	130-190	-	-	Cheng et al., 2006	
	Mer Jaune	Chine	t-OP : 0,8-9,3	350-1643	-	-	Duan et al., 2014	
	Mer de Chine	Chine	t-OP : 0,7-11,1	31-1424	-	-		
â	New York	Etats-Unis	8,1	846	-	-	Ferguson et al., 2000	
/gu	Baie de Jamaïque	Etats-Unis	-	7-13700	-	-	Ferguson et al., 2001	
nt (Itacorubi	Brésil	-	-	0,9-41,0	134	Froehner et al., 2012	
neı	Tokyo	Japon	t-OP : 6-100	120-640	-	-	Isobe et al., 2001	
íjbů	Tokyo	Japon	-	-	<0,6	<0,4	Isobe et al., 2007	
Sé		Pays-Bas	-	0,9-1080	-	-	Jonkers et al., 2003	
	Baie de Masan	Corée du Sud	4-179	113-3890	-	-	Khim et al., 1999	
	Baie de Tokyo	Japon	-	142-20700	<0,7	-	Kurihara et al., 2007	
	Baie de Masan	Corée du Sud	-	92-557	-	-	Li et al., 2008	
	Méditerranée	Espagne	nd	18-590	-	-	Petrovic et al., 2002	
	Atlantique côte	Espagne	nd	23-1050	-	-		

	Vanica	Italia		47 102		2.41	Doiona at al 2007
ent	California	Italle Etata Unia	1082	47-192	0 16 0 45	2-41	Soblark at al. 2007
lime /g) ite)	Camornie	Etats-Ullis	1,9-0,2	10.18	0,10-0,43	-	Southi Kumar at al. 2008
Séd (ng (su	Viemen Lieun Vundena	China	2,0-0,9	10-18		-5 1	Zhang at al. 2000 at 2011h
	Manathin manathing	Singerour		-	<3,7	<3,1	Zhang et al., 2009 et 2011b
		Singapour	44,9	44,0	-	-	Basheer et al., 2004
	Anaaara granosa"		0,7 20,2	54 102	-	-	
	Portunus pelagicus ^a		20,2	103	-	-	
	Penaeus monodon"		20,4	197	-	-	
	Loligo sp ^a .		10,2	54	-	-	
	Decapterus russelli ^a		31,4	65	-	-	
	Carassostrea gigas ^b	Taiwan	20-1460	130-5190	-	-	Cheng et al., 2006
	Thais clavigera ^ь	Taiwan	-	66-3840	-	-	
	Mytilus	Italie	4,4-4,9	254-265	-	-	Ferrara et al., 2001
(s	galloprovincialis ^b						
sec	Chamelea gallina ⁶		2,7-2,8	243-252	-	-	
sn	Loligo vulgaris ^b		3,9-11,5	389-696	-	-	
iss	Sepia officinalis ^b		3,6-3,8	67-566	-	-	
/g t	Mytilus edulis ^a	Allemagne	-	1,1-4	-	-	Gunther et al., 2001
a a	Trachinotus blochii ^b	Malaisie	0,124	0,023	-	-	Ismail et al., 2018
es (Perna viridis ^b	Inde	2-8	72-202	-	-	Isobe et al., 2007
me		Indonésie	3-16	75-643	-	-	
mis		Malaisie	1-16	18-663	-	-	
rga		Singapour	7	605	-	-	
0		Thaïlande	2	201	-	-	
		Cambodge	-	27-92	-	-	
		Vietnam	1	94-121	-	-	
		Philippine	1-14	457-578	-	-	
		Japon	0,7-54,4	47-1347	-	-	
	Moule ^b	Corée du Sud	-	51-290	-	-	Li et al., 2008
	Mytilus galloprovincialis	Italie	-	-	-	3-38	Pojana et al., 2007
	Mytilus ^c	Espagne	t-OP : nd-44,4 ; n-OP :	n-NP : nd-175	-	-	Salgueiro-Golzalez et al., 2016
	galloprovincialis ^b	10	nd	4-NP : 9-2441			C , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
	Carassostrea virginica ^b	Etats-Unis	2,3-10	1,5-20	-	-	Senthi Kumar et al., 2008

(1): nd : non détecté ; - : non déterminé; Résultats exprimés en masse de ^a : masse fraiche, ^b : masse sèche et ^c : masse de lipides.

La présence de nonylphénol dans l'environnement a été rapportée dans un grand nombre d'études du milieu marin comme le montre le tableau 4.1. Moins d'études portent sur les octylphénols. Il est important de souligner qu'il est rarement mentionné, de facon précise, la nature du composé étudié. Cette information semble pourtant primordiale. En effet, il existe plusieurs isomères d'octylphénols et de nonylphénols en fonction de la position et des ramifications possibles sur les chaînes alkyles. Lorsque le composé étudié est indiqué précisément, l'information a été ajoutée dans la colonne. Alors que le nonylphénol est quasiment toujours détecté, l'octylphénol n'est pas toujours retrouvé et ses concentrations sont presque systématiquement inférieures à celles du nonylphénol. Les concentrations en octylphénol et en nonylphénol retrouvées dans les eaux marines sont variables, allant respectivement de 800 ng/L dans le Golf de Gdansk en Pologne (Staniszewska et al., 2015) jusqu'à plus de 4 µg/L, en mer Méditerranée (Petrovic et al., 2002). Les niveaux de nonylphénol retrouvés dans les sédiments marins secs sont tout aussi hétérogènes que ceux de la colonne d'eau, avec des teneurs comprises entre 7 et 13700 ng/g, rien qu'au niveau de la baie de la Jamaïque (NY, USA) (Ferguson et al., 2001) et une teneur maximale de 20,7 μ g/g mesurée dans la baie de Tokyo (Kurihara et al., 2007). Les teneurs en octylphénols sont bien moins élevées avec une valeur maximale de 179 ng/L relevée dans la Baie de Masan, en Corée du sud (Khim et al., 1999). Dans les organismes marins, des concentrations de nonylphénol entre 18 et plus de 5000 ng/g des tissus secs ont été mesurées en fonction des espèces. Une seule étude a mesuré les concentrations en divers AP (4-n-butyl, 4-t-butyl, 4-n-pentyl, 4-nhexyl, 4-n-heptyl, 4-n-octyl, 4-t-octyl et 4-n-nonylphénol) dans l'eau de mer et les organismes, à Singapour (Basheer et al., 2004). Le 4-n-nonylphénol est celui qui est le plus retrouvé dans l'eau de mer. Il a été détecté sur tous les 28 sites étudiés à des concentrations comprises entre 280 et 2760 ng/L tandis que les autres AP sont en concentrations plus faibles (inférieures à 0,5 µg/L). Dans cette même étude, la concentration des AP a également été mesurée dans six organismes différents (tableau 4.1). Pour cette autre matrice, le 4-n-nonylphénol atteint des valeurs les plus élevées, entre 47 à 197 ng/g de tissus frais. Puis, ce sont le 4-t-butyl et le 4-toctyl dont les concentrations maximales sont de 24,0 et 44,9 ng/g de tissus frais respectivement, alors que les autres AP présentent des concentrations inférieures à 10 ng/g de tissus frais.

Pour ce qui concerne les deux estradiols précédemment cités, le **tableau 4.1** montre que leur présence dans les eaux marines a été peu étudiée et que les concentrations retrouvées sont de l'ordre du ng/L à la centaine de ng/L d'eau de mer. Les sédiments présentent quant à eux des teneurs la plupart du temps inférieures à la dizaine ng/g, excepté dans deux études réalisées au

Brésil et en Italie. Enfin une seule étude a mis en évidence leur bioaccumulation par une espèce de moule collectée en Italie.

Le choix des types de MP à utiliser pour cette étude, de leur taille et de leur concentration a été réalisé en fonction des types de matériaux plastiques utilisés au niveau national, des résultats sur les MP retrouvés dans les bivalves et les sédiments présentés dans les chapitres 2 et 3, mais aussi en s'appuyant sur les études de sorption réalisées au préalable (Bakir et al., 2012; 2014a ; Teuten et al., 2007).

L'objectif de ce 4^{ème} chapitre est de mieux comprendre les mécanismes de sorption des six composés appartenant aux deux familles de contaminants organiques choisies (4 alkylphénols et 2 estradiols) sur des MP modèles. Les résultats de cette étude seront replacés dans un contexte plus global qui est l'utilisation d'un des candidats de contaminants organiques pour des tests de toxicité. Dans un premier temps, une étude de la cinétique de sorption a été réalisée, pour définir les temps d'équilibre de sorption. Puis, les coefficients de distribution (eau de mer/MP) des six composés choisis ont été estimés sur des MP de PE. Enfin, un des six contaminants organiques a été choisi pour une étude comparative des quantités retrouvées sur/dans des MP de PE et de PP.

IV.2 Matériels et méthodes

IV.2.1 Réactifs et matériel

L'acétonitrile Scharlau (ACN) et le dichlorométhane (CH₂Cl₂) sont de grade HPLC (≥99,9%) et fournis respectivement par Atlanticlabo (Nantes, France) et VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau MilliQ est obtenue à partir d'un appareil Merk (Direct> 8). L'eau de mer (EDM) a été reconstituée au laboratoire à 30 PSU (unité de salinité pratique) à partir de sel marin (Tropic Marin) acheté chez Aquarium Bulle (Poissy, France) et d'eau déminéralisée obtenue grâce à un appareil de chez Elga (PURELAB Option R7/15). Le diméthylformamide (DMF) a été acheté chez Atlanticlabo.

Les propriétés et origines des six composés sélectionnés pour cette étude de sorption sont répertoriées dans le **tableau 4.2**. Ils correspondent à quatre alkylphénols : 4-t-butyphénol (4-t-BP), 4-t-octyphénol (4-t-OP), 4-n-octyphénol (4-n-OP), 4-n-nonylphénol (4-n-NP), et deux estradiols : 17β -estradiol (E2) et 17α -éthinylestradiol (EE2).

Propriótós (1)		Alkyl		Estradiols		
Flopfieles	4-t-BP	4-t-OP	4-n-OP	4-n-NP	EE2	E2
Formule brute	$C_{10}H_{14}O$	$C_{14}H_{22}O$	$C_{14}H_{22}O$	$C_{15}H_{24}O$	$C_{20}H_{24}O_2$	$C_{18}H_{24}O_2$
Log Kow	3,29	3,70	4,12	4,48	3,67	4,01
Solubilité dans						
l'eau (mg/L à	610	12,6	7,0	5,4	11,3	3,9
25°C)						
N° C.A.S	98-54-4	140-66-9	1806-26-4	104-40-5	50-28-2	57-63-6
Fournisseur	Fluka	Sigma	-Aldrich	Alfa Aesar	Sigma-	Aldrich

Tableau 4.2: Propriétés et origine des composés organiques sélectionnés pour l'étude de leur sorption sur MP.

(1) Valeurs de K_{ow} et de solubilités issues de l'INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques), des fournisseurs ou du site internet : pubchem.ncbi.nlm.nhi.gov. 4-t-BP : 4-t-butyphénol ; 4-t-OP : 4-t-octyphénol, 4-n-OP : 4-n-octyphénol, 4-n-NP : 4-n-nonylphénol, E2 : 17β -estradiol et EE2 : 17α -éthinylestradiol.

La concentration en contaminants organiques choisie pour réaliser l'étude était de 100 ng/mL. Elle est relativement proche des concentrations retrouvées dans le milieu environnemental et est bien inférieure aux solubilités des alkylphénols et des estradiols dans l'eau. Par ailleurs elle sera détectable avec les outils analytiques à disposition (voir limites de détection et quantification dans le **tableau 4.3**).

Les MP de PE et PP utilisés dans cette étude ont été fabriqués au Laboratoire des Molécules et des Matériaux du Mans (IMMM). Ils ont été obtenus grâce à un cryobroyeur de chez SPEX (6770). Les objets broyés étaient un câble de PE et un sac en PP. Après broyage, les particules ont été tamisées et seule la fraction comprise entre 53 et 100 μ m a été utilisée pour les expérimentations. Les MP ont ensuite été conservés au sec et à l'abri de la lumière. La concentration de travail choisie était de 10 mg de MP pour 25 mL de solution de contaminants organiques à 100 ng/mL dans l'EDM.

Les trois types de filtres d'un diamètre de 25 mm (en nitrate de cellulose d'une porosité de $12 \mu m$, en fibre de verre d'une porosité de $0,7 \mu m$ et en oxyde d'aluminium d'une porosité de $0,2 \mu m$) ont été fournis par Merck-Millipore.

Toute la verrerie utilisée pour réaliser cette étude a été lavée puis pyrolysée à 550°C pendant 24 heures afin d'éliminer toute trace de composés organiques.

IV.2.2 Protocole d'étude de la sorption

Le protocole suivi pour d'étudier la sorption est explicité sur la figure 4.1.



Figure 4.1: Protocole suivi pour l'étude de la sorption des contaminants organiques (CO) sur les MP

Les MP ont été mis en contact avec les contaminants organiques sous agitation, à 22°C et à l'obscurité. Après un temps défini, la solution a été filtrée sur un filtre de nitrate de cellulose de 25 mm de diamètre et présentant une porosité de 12 μ m.

 Afin de déterminer les quantités de contaminants organiques sorbées sur les MP, le filtre et ce qui a été retenu à sa surface ont subi deux extractions solide-liquide successives avec
mL (2 fois 5 mL) de CH₂Cl₂.

2. Pour déterminer la concentration de contaminants organiques restant en solution, le volume du filtrat a été ajusté puis il a été traité parallèlement de deux façons différentes, afin d'obtenir des concentrations supérieures aux limites de quantification pour tous les composés étudiés, des plus polaires aux plus apolaires :

2.1 : 1 mL a été analysé directement en HPLC,

2.2 : les 24 mL restants ont subi deux extractions liquide-liquide successives avec 5 mL de CH_2Cl_2 .

3. Finalement, dans le but de faire un bilan de matière, les tubes utilisés lors de la mise en contact des MP avec les contaminants organiques ont été rincés avec 2 mL de CH₂Cl₂ puis, 2 mL d'ACN. Cette partie du protocole n'a pas été faite systématiquement pendant toute l'étude. Une fois que le bilan de matière a été calculé et qu'il a été validé, cette étape n'a plus été réalisée.

Tous les échantillons solubilisés dans le CH_2Cl_2 ont été préparés de manière à pouvoir être injectés en HPLC en évitant une évaporation à sec, afin de préserver les composés les plus volatils. Par conséquent, comme la phase mobile, constituée d'eau milliQ et d'ACN, n'est pas miscible avec le CH_2Cl_2 , 100 µL de DMF ont été ajoutés à ces solutions, puis, le CH_2Cl_2 a été évaporé sous flux d'azote. En effet, le DMF n'est pas miscible au CH2Cl2 et il est plus dense il n'est donc pas évaporé. Le volume final de la solution a ensuite été ajusté à 1 mL avec de l'ACN, avant injection en HPLC.

En parallèle, des blancs expérimentaux ont également été préparés. La même procédure a été réalisée sans MP et également sans contaminants organiques à partir d'eau de mer. Les résultats obtenus sans MP ont permis de déduire les quantités des contaminants organiques adsorbés sur le filtre et les parois de la verrerie, aux résultats obtenus avec MP. Ainsi, les quantités considérées correspondent bien à celles sorbées sur les MP uniquement.

IV.2.2.1 Vérifications préalables

Afin de pouvoir envisager l'utilisation du protocole présenté ci-dessus, quatre vérifications préalables ont été nécessaires :

- La première est la stabilité des contaminants organiques en solution d'eau de mer. En effet, une dégradation des molécules pourrait rendre impossible la vérification du bilan de matière, suite à la sorption des contaminants organiques sur les MP. Pour cela, une solution à 100 ng de chaque contaminant organique/mL d'EDM à 30 PSU a été préparée. Un aliquot a été analysé immédiatement. D'autres ont été laissés sous la hotte, à température ambiante, avec et sans agitation (200 tpm) et injectés en HPLC après 24h. Le calcul des taux de recouvrement ont permis de mettre en évidence la stabilité des composés en solution ;
- La deuxième est la quantification de l'adsorption des contaminants organiques sur le filtre. Afin de pouvoir réaliser un bilan de matière, il est nécessaire d'évaluer cette adsorption. Pour cela, des solutions à 100 ng de chaque contaminant organique/mL d'EDM à 30 PSU ont été préparées. Un aliquot a été injecté directement et le reste des solutions a été filtré sur différents type de filtres : nitrate de cellulose, fibres de verre et oxyde d'aluminium (Anodisc[®]). Comme pour l'étude de la stabilité des composés, l'évaluation de l'adsorption potentielle des contaminants organiques sur les filtres a été faite en calculant les taux de recouvrements ;

- La troisième est l'évaluation des rendements d'extraction des contaminants organiques dans l'EDM par extraction liquide-liquide au CH₂Cl₂. Cette étape d'extraction liquide-liquide s'est avérée indispensable car les concentrations en contaminants organiques les plus apolaires dans l'EDM après filtration étaient inférieures aux limites de quantification de l'appareillage analytique. En effet pour pouvoir calculer un coefficient de distribution, il fallait pouvoir évaluer les concentrations dans le milieu aqueux. Par conséquent, pour augmenter leur concentration et dépasser les limites de détection (**tableau 4.3** plus bas), une extraction liquide-liquide a été réalisée avec du CH₂Cl₂ comme le présente la **figure 4.1**. Ce solvant a été choisi car il est non miscible à l'EDM, apolaire et volatil Par ailleurs les composés étudiés sont solubles dans ce solvant. Une solution à 50 ng/mL a été préparée et 25 mL ont été extraits 2 fois successives avec 10 mL de CH₂Cl₂ en triplicats. Les rendements d'extraction ont été calculés en rapportant les concentrations en contaminants organiques dans le CH₂Cl₂ après extraction à celles dans l'EDM avant extraction.
- La quatrième est le calcul du bilan de matière. L'ajout de l'étape 3 au protocole et les trois vérifications préalables évoquées plus haut, ont permis de calculer les bilans de matière sans MP. Autrement dit, à l'issue de ces expériences, le but était d'arriver à retrouver les quantités de matière en contaminants organiques introduites initialement dans l'EDM.

IV.2.2.2 Cinétique de sorption

La réalisation d'une cinétique de sorption avait pour objectif de suivre l'évolution des concentrations en contaminants organiques afin de déterminer le temps d'équilibre de la distribution des contaminants organiques entre la phase aqueuse et la phase solide. En effet, pour évaluer les coefficients de distribution, il est indispensable de se placer à l'équilibre. Pour cela, neuf temps de contact entre les contaminants organiques et des MP de PE ont été étudiés : 0, 1, 2, 4, 8, 24, 32, 72 et 96h. À l'issue de ces temps, le protocole présenté en **figure 4.1** a été appliqué. Les blancs (sans contaminants organiques et sans MP) ont été réalisés uniquement aux temps 0, 1 et 96h. Les courbes d'évolution de la sorption en fonction du temps ont ensuite été tracées.

IV.2.3.2 Coefficients de distribution

Après avoir défini un temps d'équilibre de sorption, les coefficients de distribution (K_d) ont pu être calculés pour chaque contaminant organique sur les MP de PE à l'aide des résultats de l'étude de la cinétique de sorption.

IV.2.3.3 Quantités de 4-n-nonylphénol sorbés sur des microplastiques

La réalisation des études de sorption des contaminants organiques sur les MP et les calculs des coefficients de distribution ont permis de déterminer quel serait le contaminant organique le plus adapté pour évaluer les effets sur les organismes par des expositions en laboratoire. Le 4n-NP a montré une capacité à se sorber aux MP de PE supérieure comparée aux autres contaminants organiques étudiés. Pour déterminer la quantité maximale de 4-n-NP qui pourrait être sorbée sur des MP de PE et PP, une expérience a été réalisée avec une solution saturée en 4-n-NP (100 fois plus concentrée : $10 \mu g/mL$) et 2 fois plus concentrée en MP (20 mg dans 25 mL). Pour se rapprocher des conditions d'expositions, la durée de contact contaminants organiques/MP était de 72 heures à une température de 15°C. Des triplicats ont été réalisés pour les échantillons et les blancs.

IV.2.3 Méthode d'analyse des contaminants organiques

IV.2.2.1 Appareillage

Les six composés choisis pour cette étude ont été analysés en chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplée à un détecteur de fluorescence. Le système utilisé (LC Ultimate 3000 Dionex Thermo Scientific) comprend deux pompes à gradient ternaire (DGP – 3600 RS), un passeur à échantillons thermostaté à 10°C (WPS – 3000 TRS), un four à colonne (TCC-3000SD) maintenu à 40°C et un détecteur de fluorescence (FLD 3400 RS). La colonne utilisée est une colonne greffée en C₁₈ (Kinetex - 150 x 2,1 mm – particules de 2,6 μ m). Le volume d'injection était de 3 μ L. La phase mobile était un mélange d'ACN et d'eau MilliQ, en mode gradient d'élution, à un débit de 0,48 mL/minute. Le pourcentage d'ACN dans la phase mobile était de 37% de 0 à 4,2 minutes, puis il atteint 80% à 13,8 minutes et enfin 100% à 14,9 minutes et reste à 100% jusqu'à la fin de l'acquisition (à 17,6 minutes). Les couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour la détection des composés sont 271/334 nm pour le 17 α -ethynylestradiol et 290/340 nm pour tous les autres contaminants organiques. Le pilotage de la chaîne HPLC et le retraitement des résultats ont été réalisées grâce au logiciel Chromeleon 7.

IV.2.2.2 Etalonnage et limites de détection et quantification

La quantification des contaminants organiques a été réalisée par étalonnage externe, à l'aide de droites d'étalonnage à 8 niveaux de concentrations, comprises entre 1 et 200 ng/mL (**tableau 4.3**). Deux droites d'étalonnages ont été réalisées par composé, l'une dans l'ACN, l'autre dans l'eau de mer 30 PSU (voir plus bas la justification). Elles ont été utilisées en fonction du milieu dans lequel se trouvaient les composés à analyser.

Les limites de détections (LOD) et les limites de quantification (LOQ) associées sont également présentées dans le **tableau 4.3**. Sur les chromatogrammes obtenus pour 6 injections de blancs analytiques, les aires ont été mesurées aux temps de rétention des contaminants organiques. Les LOD ont ensuite été calculées en multipliant par 3 la moyenne des aires des 6 blancs et en divisant par la pente de l'équation de droite d'étalonnage. Puis la LOQ a été calculée en multipliant par 3,3 la valeur de LOD.

Tableau	4.3	Caractéristiques	des	droites	d'étalonnages	à	8	points	utilisées	pour	la
quantifica	tion d	les contaminants o	rgani	ques.							

		Pente \pm ET	Ordonnée à	R²	LOD-LOQ
			l'origine \pm ET		(ng/mL)
4-t-BP	ACN	$900,1 \pm 152,8$	$1894,4 \pm 527,2$	>0,99	0.20.1.00
	EDM	$1097,2 \pm 293,7$	$2649,7 \pm 2229,1$	>0,99	0,50-1,00
4-t-OP	ACN	$2066,3 \pm 130,8$	$9305,3 \pm 2863,8$	>0,99	0 14 0 47
	EDM	$1470,6 \pm 113,1$	$-2238,7 \pm 3896,1$	>0,99	0,14-0,47
4-n-OP	ACN	$2081,4 \pm 168,8$	$10634,4 \pm 3558,4$	>0,99	0 22 0 77
	EDM	$665,3 \pm 89,6$	$-1993,6 \pm 3105,7$	>0,99	0,25-0,77
4-n-NP	ACN	$2168,4 \pm 210,8$	$3787,6 \pm 5790,3$	>0,99	072240
	EDM	$311,3 \pm 115,8$	$-4223,3 \pm 2769,8$	>0,96	0,75-2,40
E2	ACN	$1358 \pm 231,1$	$6421,7 \pm 1863,4$	>0,99	0 14 0 45
	EDM	$1248,7 \pm 127,3$	$3084,3 \pm 444,3$	>0,99	0,14-0,43
EE2	ACN	$116,9 \pm 4,8$	$545,7 \pm 414,7$	>0,99	1 15 12 70
	EDM	$171,9 \pm 36,3$	$754,4 \pm 265,6$	>0,99	4,13-12,70

ET : écart-type ; R² : coefficient de détermination ; LOD : limite de détection ; LOQ : limite de quantification ; 4-t-BP : 4-t-butyphénol ; 4-t-OP : 4-t-octyphénol, 4-n-OP : 4-n-octyphénol, 4-n-NP : 4-n-nonylphénol, E2 : 17β -estradiol et EE2 : 17α -éthinylestradiol.

Les pentes des droites obtenues dans l'ACN et l'EDM sont assez semblables pour les trois composés les plus polaires (4-t-BP, E2 et EE2). Par contre, pour les quatre autres plus apolaires, les pentes sont bien différentes, en fonction du solvant de solubilisation. Ces différences pourraient être dues au fait qu'en présence d'EDM, les composés apolaires ont tendance à avoir plus d'interactions avec la verrerie, augmentant ainsi leur sorption en surface, ce qui mènerait à une diminution de leur concentration dans la solution.

IV.2.2.2 Justesse et répétabilité

La répétabilité et la justesse ont été évaluées en préparant et en injectant trois solutions à 100 ng/mL le même jour. La moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation ont été calculés et sont présentés dans le **tableau 4.4**.

Tableau 4.4 : Réponses aux critères de répétabilité et justesse de la méthode analytique dans l'eau de mer (N = 3).

	Moyenne	Biais relatif	ET	CV (%)
	(ng/mL)	(%)	(ng/mL)	C ((/0)
4-t-BP	73,7	26,3	1,1	1,5
4-t-OP	82,8	17,2	1,5	1,9
4-n-OP	83,7	16,3	0,4	0,5
4-n-NP	112,7	12,7	10,5	9,3
E2	85,2	14,8	1,1	1,3
EE2	101,5	1,5	2,7	2,6

ET : écart-type ; CV : Coefficient de variation ; 4-t-BP : 4-t-butyphénol ; 4-t-OP : 4-t-octyphénol, 4-n-OP : 4-n-octyphénol, 4-n-NP : 4-n-nonylphénol ; E2 : 17 β -estradiol et EE2 : 17 α -éthinylestradiol.

Mis à part pour le 4-t-BP, le biais relatif obtenu est en-deçà de 17,2% ce qui tolérable mais tout de même assez élevé. La méthode analytique est donc assez peu juste, particulièrement pour le 4-t-BP. Pour autant, les résultats sont plutôt répétables avec des coefficients de variation inférieurs à 2,6%, excepté pour le 4-n-NP avec un CV de près de 10%. La difficulté d'atteindre la concentration cible pourrait provenir des effets de sorption des composés comme cela a été évoqué dans la partie précédente pour le 4-n-NP.

IV.3 Résultats

IV.3.1 Vérifications préalables

IV.3.1.1 Stabilité des contaminants organiques en solution

La stabilité des contaminants organiques dans l'eau de mer a été évaluée en calculant des taux de recouvrements entre les concentrations d'une solution fraîchement préparée et celles obtenues après l'avoir laissée à température ambiante, sous hotte avec ou sans agitation. Les résultats sont présentés dans le **tableau 4.5**.

Tableau	4.5 :	Taux	de	recouvrement	des	contaminants	organiques	dans	l'eau	de	mer	à
100 ng/m	L, ap	rès 241	h de	e stockage sous	s hot	te, à températur	re ambiante,	avec	ou san	s ag	itatio	n
(exprimés	s en %	6, moy	enn	$e \pm écart-type$,	N =	3).						

Taux de recouvrement (en %) après de 24h									
Agitation		Alkylt	Estradiols						
	4-t-BP	4-t-OP	4-n-OP	4-n-NP	EE2	E2			
Avec	92 ± 6	107 ± 4	135 ± 15	104 ± 27	90 ± 1	94 ± 8			
Sans	103 ± 2	95 ± 1	93 ± 1	85 ± 1	105 ± 2	105 ± 2			

 $4-t-BP: 4-t-butyphénol; 4-t-OP: 4-t-octyphénol, 4-n-OP: 4-n-octyphénol, 4-n-NP: 4-n-nonylphénol, E2: 17\beta-estradiol et EE2: 17\alpha-éthinylestradiol.$

Les taux de recouvrement obtenus sont satisfaisants puisqu'ils sont compris entre 90 et 110%, excepté pour le 4-n-OP et le 4-n-NP avec et sans agitation respectivement. Malgré ces exceptions, il semble acceptable de considérer que la dégradation des composés est négligeable sur une durée de 24h.

IV.3.1.2 Adsorption des contaminants organiques sur les filtres

L'adsorption des composés sur les filtres a été évaluée en calculant les taux de recouvrement des contaminants organiques après filtration. Les résultats sont présentés dans le **tableau 4.6** pour trois types de filtres différents. Le but était de choisir le filtre menant aux adsorptions les plus faibles, c'est-à-dire aux taux de recouvrement les plus grands.

Tableau 4.6: Taux de recouvrement des contaminants organiques après filtration avec 3 différents types de filtres d'un diamètre de 25 mm : nitrate de cellulose (NC ; porosité : 12 μ m), fibres de verre (FV ; porosité : 0,7 μ m) et oxyde d'aluminium Anodisc[®] (AD ; porosité : 0,2 μ m), exprimés en % (moyenne ± écart-type, N = 3).

	Taux de recouvrement (en %)										
		Alkyl		Estra	diols						
	4-t-BP	4-t-OP	4-n-OP	4-n-NP	EE2	E2					
NC	93 ± 1	85 ± 4	64 ± 8	47 ± 17	94 ± 4	100 ± 4					
FV	95 ± 1	94 ± 4	65 ± 9	44 ± 15	105 ± 4	98 ± 1					
AD	86 ± 1	79 ± 4	54 ± 7	45 ± 16	90 ± 1	93 ± 4					

 $4-t-BP: 4-t-butyphénol; 4-t-OP: 4-t-octyphénol, 4-n-OP: 4-n-octyphénol, 4-n-NP: 4-n-nonylphénol, E2: 17\beta-estradiol et EE2: 17\alpha-éthinylestradiol.$

Les taux de recouvrement des contaminants organiques obtenus sont compris entre 47 et 100% après filtration sur filtre de nitrate de cellulose. Ils sont corrélés à la polarité des contaminants organiques. C'est-à-dire que plus le composé est apolaire, plus le taux de recouvrement est faible, autrement dit, plus il s'adsorbe sur le filtre et le système de filtration. Plus de la moitié du 4-n-NP est retenu sur le filtre et le système. Le changement de la nature du filtre n'a pas permis d'augmenter de façon significative les taux de recouvrement de tous les contaminants organiques. Par conséquent, les filtres de nitrate de cellulose ont continué à être utilisés. Étant

donné les importantes quantités de contaminants organiques sorbés sur le filtre et le système de filtration, des blancs sans MP ont systématiquement été réalisés en parallèle afin de déterminer réellement les quantités de contaminants organiques sorbées sur les MP, en prenant en compte celles adsorbées sur le filtre et le système de filtration.

IV.3.1.3 Rendements d'extraction liquide-liquide

Les rendements d'extraction liquide-liquide des contaminants organiques contenus dans l'eau de mer après deux extractions successives avec 5 mL de CH_2Cl_2 sont présentés dans le **tableau 4.7**.

Tableau 4.7: Rendements d'extraction liquide-liquide des contaminants organiques contenus dans l'eau de mer par du CH_2Cl_2 (exprimés en %, moyenne ± écart-type, N = 3).

		Alkylp	Estradiols			
	4-t-BP	4-t-OP	4-n-OP	4-n-NP	EE2	E2
Rendements d'extraction (%)	77 ± 6	87 ± 9	66 ± 9	48 ± 7	75 ± 8	81 ± 9

 $\begin{array}{l} \mbox{4-t-BP}:\mbox{4-t-octyphénol},\mbox{ 4-n-OP}:\mbox{4-n-OP}:\mbox{4-n-NP}:$

Les valeurs obtenues sont comprises entre 48 à 87%. Le faible rendement d'extraction du 4-n-NP est probablement dû à l'adsorption de ce composé sur la verrerie utilisée comme cela a déjà été évoqué plus haut. L'utilisation d'un solvant plus apolaire, comme l'hexane, aurait peut-être permis d'améliorer les rendements.

IV.3.1.4 Bilan de matière

Le **tableau 4.8** présente les bilans de matière obtenus sans MP pour chacun des contaminants organiques. Comme cela a été montré précédemment, des quantités importantes sont adsorbées sur le filtre et le système de filtration, notamment pour le 4-n-NP. Ces quantités doivent être prises en compte pour réaliser les bilans de matière. Pour ce faire, les contaminants organiques adsorbés sur le système de filtration et le filtre ont été extraits avec du CH₂Cl₂, de même que ceux adsorbés sur la verrerie. Puis, ils ont été quantifiés. Le bilan de matière a été calculé en les additionnant aux quantités retrouvées dans le filtrat.

Bilans de matière (en %)						
	Alkylphénols				Estradiols	
	4-t-BP	4-t-OP	4-n-OP	4-n-NP	EE2	E2
Extraction						
filtre, système	1 ± 0	4 ± 1	10 ± 2	14 ± 3	1 ± 0	1 ± 0
et verrerie						
Filtrat	89 ± 3	71 ± 15	58 ± 9	46 ± 12	84 ± 3	90 ± 6
Total	90 ± 3	75 ± 16	68 ± 11	60 ± 15	85 ± 3	91 ± 6

Tableau 4.8: Bilans de matière des contaminants organiques (exprimé en %, moyenne \pm écart-type, N = 3).

 $4-t-BP: 4-t-butyphénol; 4-t-OP: 4-t-octyphénol, 4-n-OP: 4-n-octyphénol, 4-n-NP: 4-n-nonylphénol, E2: 17\beta-estradiol et EE2: 17\alpha-éthinylestradiol.$

Les bilans de matière obtenus sont compris entre 59,7 et 90,2%. À nouveau, la difficulté de retrouver des bilans de matière proches de 100% apparaît pour les trois composés les plus apolaires. En considérant les taux de recouvrement des contaminants organiques après filtration, il semblerait que le CH₂Cl₂ ne permette pas d'extraire les composés sorbés sur la verrerie, le filtre et le système de filtration. Par exemple, pour le 4-n-NP moins de 50% était quantifié dans le filtrat lors de l'expérience permettant de calculer les taux de recouvrement après filtration, ce qui suggérait que le reste était sorbé sur la verrerie et le filtre, alors que seuls 14% sont récupérés par le CH₂Cl₂ pour cette expérience. Les bilans de matière n'atteignent peut-être pas valeurs souhaitées, mais au regard des précédents résultats obtenus lors des expériences préalables, ils semblent cohérents et satisferont à l'étude.

IV.3.2 Cinétiques de sorption

L'évolution dans le temps de la quantité des contaminants organiques sorbés sur les MP de PE a été suivie dans le temps. Il faut noter que ces résultats ont été obtenus en prenant en compte les quantités de contaminants organiques sorbés sur le filtre et la verrerie en soustrayant les valeurs obtenues pour les blancs sans MP à celles trouvées avec les MP. Pour les composés les plus polaires, c'est-à-dire le 4-t-BP et le 17 β -estradiol, les quantités de matière désorbées des MP n'ont pas pu être quantifiées. Au regard des limites de quantification de la méthode d'analyse, les quantités sorbées sont respectivement inférieures à 0,1 ng/mg et 0,05 ng/mg pour le 4-t-BP et le 17 β -estradiol. En parallèle, les quantités retrouvées dans la solution d'EDM étaient stables dans le temps, ce qui montre bien une sorption très limitée de ces composés sur les MP de PE. En revanche, pour le 4-t-OP, le 4-n-OP et le 17 α -éthinylestradiol, des quantités de matière ont été observées à la fois dans la solution d'EDM, après filtration des MP et dans l'extrait au CH₂Cl₂ des MP. Enfin, pour ce qui est du 4-n-NP, malgré une extraction liquideliquide au CH₂Cl₂ de la solution d'EDM filtrée et une concentration de la solution, il n'a pas été possible de le quantifier dans l'EDM. Grâce aux résultats obtenus aux différents temps d'analyse, il a été possible de tracer des courbes de cinétique de sorption sur les quatre composés présentant cette capacité. La **figure 4.2** illustre ces résultats.



Figure 4.2 : Courbes de cinétique de sorption des contaminants organiques sur des microplastiques de polyéthylène (NP : nonylphénol, OP : octylphénol, EE2 : 17α-éthinylestradiol)

Les quantités des composés sorbées sur les MP sont quasiment proportionnelles à leur Log de Kow. Cela montre bien que, plus les composés sont apolaires, plus ils vont présenter d'interaction avec la surface des MP. Par contre, le fait que la sorption du 17 β -estradiol sur les MP ne soit pas détectable est assez surprenant étant donné que son Log de Kow est plus élevé que celui du 17 α -éthinylestradiol. Pour les quatre composés présentant une capacité de sorption détectable, une augmentation de la sorption sur les MP de PE a été observée avec une augmentation de l'apolarité. Cette augmentation s'est accompagnée d'une diminution des composés en solution dans l'EDM filtrée à partir de la 30h environ. En observant l'allure des courbes, il apparaît que l'augmentation de la sorption est rapide et que le plateau est atteint dès 8h de mise en contact des MP avec les contaminants. Ainsi, il est possible de considérer que l'équilibre de sorption dans les conditions de l'expérience est atteint après 8h. Ces données ont ensuite été utilisées pour déterminer des valeurs des coefficients de distribution (K_d).
IV.3.3 Coefficients de distribution

Parmi les six contaminants étudiés, il n'a pas été possible de déterminer de coefficient de distribution pour le 4-t-BP, le 17 β -estradiol et le 4-n-NP puisqu'il manque soit la concentration sur les MP pour les deux premiers, soit la concentration dans la solution d'EDM pour le dernier. Les sorptions du 4-t-BP et du 17 β -estradiol sur les MP de PE sont trop faibles pour être détectées, à l'inverse du 4-n-NP qui est sorbé en trop grande quantifé menant à une détection impossible dans l'EDM. En prenant en compte la limite de quantification du 4-n-NP, la concentration dans l'EDM était inférieure à 2 ng/mL. Grâce à l'étude des cinétiques de sorption, il a été déterminé que l'équilibre est atteint après 8h. Le calcul des K_d a été fait avec l'ensemble des données des autres pas de temps, c'est à dire supérieurs à 8h de façon à obtenir une moyenne et un écart-type pour chaque contaminant. Les données obtenues et calculées sont présentées dans le **tableau 4.9**.

Tableau 4.9: Concentrations et valeurs de K_d calculées pour les contaminants organiques après sorption sur des microplastiques de polyéthylène entre 8 et 96h de mise en contact (N = 4).

	Alky	Estradiol	
	4-t-OP	4-n-OP	EE2
C _s (ng/mg)	$7,1 \pm 3,0$	$44,\!88 \pm 6,\!0$	$2,7 \pm 1,4$
C _w (ng/mL)	$48,1 \pm 14,8$	$34,4 \pm 13,8$	$62,3 \pm 26,8$
K _d (L/kg)	171 ± 120	1580 ± 1004	45 ± 22

 C_s : concentration sur la phase solide ; C_w : concentration dans la phase liquide ; K_d : coefficient de distribution ; 4-t-OP : 4-t-octyphénol, 4-n-OP : 4-n-octyphénol, EE2 : 17 α -éthinylestradiol.

Comme discuté dans la partie sur la cinétique, les valeurs de K_d obtenues sont cohérentes avec la polarité des composés. La valeur du 4-n-OP est supérieure à celle du 4-t-OP, puis du 17 α -éthinylestradiol. Il faut tout de même garder un esprit critique envers ces résultats puisqu'une certaine quantité des composés de départ se sorbe sur le filtre et la verrerie, ce qui va forcément influencer les valeurs des coefficients de distribution.

IV.3.4 Quantités de 4-n-nonylphénol sorbées sur des microplastiques

Le 4-n-NP est le composé étudié qui a présenté le plus d'interactions avec les MP de PE. En effet, comme évoqué plus haut, les quantités sorbées étaient les plus importantes. Malgré les difficultés qu'il présente avec une forte tendance à se sorber sur les filtres et la verrerie, il a été choisi pour pousser les investigations, notamment car il est le composé, parmi les six composés étudiés, qui est le plus retrouvé dans le milieu marin, comme le montre le **tableau 4.1**. Afin d'estimer les quantités maximales qui pourraient se sorber sur des MP de PE et PP, dans le but

ETUDE DE LA SORPTION DE POLLUANTS ORGANIQUES SUR LES MICROPLASTIQUES

de les utiliser lors d'expositions d'organismes en laboratoire, pour évaluer le pouvoir de vectorisation des MP, une autre expérience a été menée en triplicats en changeant les conditions de contact et les concentrations du contaminant et des MP. La température était de 15° C avec un temps de contact de 72h pour se rapprocher des conditions d'exposition des organismes. Les concentrations ont été multipliées par 2 et par 100 respectivement pour les MP et le 4-n-NP. Pour le PE, une quantité moyenne de 2260 ± 199 ng/mg de MP a été déterminée. Alors que pour le PP, la quantité moyenne atteignait seulement 200 ± 25 ng/mg de MP. Les propriétés physico-chimiques de la matière plastique étudiée jouent donc un rôle primordial sur la sorption des contaminants organiques. Toutefois, la cinétique de sorption des composés sur les MP de PP n'a pas été étudiée. Il faut donc rester critique vis-à-vis de la quantité sorbée. En effet, 72h l'équilibre pourrait ne pas être atteint même si l'état de l'art montre le contraire (Teuten et al., 2007 ; Zhan et al., 2016).

IV.4 Discussion

Afin de réaliser l'évaluation de la capacité de sorption d'un composé sur les MP, les concentrations de ce composé sur chaque phase (solide et liquide) doivent être mesurées parallèlement, pour vérifier que l'un diminue quand l'autre augmente. Deux études (Karapanagioti and Klontza, 2008; Zhan et al., 2016), parmi les dix qui traitent du sujet et qui sont présentées dans le tableau 1.8, ont estimé la sorption en mesurant seulement la concentration des contaminants organiques dans la phase liquide. Conclure sur leur sorption sur les MP sans mesurer leur quantité sorbée sur la phase solide peut sembler limité, étant donné que les contaminants organiques sont susceptibles de se sorber sur d'autres supports, comme la verrerie, jusqu'à 40% dans l'étude de Bakir et al. (2014a) et plus de 50% dans cette étude. Les huit autres études ont utilisé une étape de filtration pour séparer les deux phases et quantifier les contaminants organiques en solution et sorbés sur les MP. La nature et la porosité des filtres sont variables. La nature est choisie en fonction de la polarité des contaminants organiques et la porosité en fonction de la taille des MP à filtrer. Néanmoins, les contaminants organiques sont également susceptibles de se sorber sur le filtre et le système de filtration, comme cela a été observé lors de cette présente étude. Il est donc indispensable d'évaluer les quantités sorbées lors de cette étape. La réalisation de blancs sans MP, peut permettre de quantifier la sorption sur les filtres et la verrerie mais les conditions d'expérience n'étant pas strictement identiques, les équilibres de sorption peuvent être légèrement déplacés. Il en découle une estimation de la sorption potentiellement erronée. Réaliser le rinçage du filtre et de la verrerie peut également être une possibilité mais il est difficile de récupérer la totalité des

ETUDE DE LA SORPTION DE POLLUANTS ORGANIQUES SUR LES MICROPLASTIQUES

composés comme l'a montré cette présente étude. A la suite de cette étape de filtration, le filtrat peut être quantifié directement, subir une extraction liquide/liquide ou liquide/solide voire une concentration en fonction des contaminants organiques et la technique de quantification à suivre. Une potentielle perte des composés peut se produire lors d'une extraction. L'évaluation de celle-ci est alors nécessaire et en calculant les rendements d'extraction et en vérifiant qu'ils sont répétables, ils peuvent alors être pris en compte dans le calcul. En fonction de la nature des contaminants organiques et de leur concentration, la méthode d'analyse peut être de la chromatographie liquide ou gazeuse couplée, le plus souvent, à la spectrométrie de masse. La plupart des études de l'état de l'art sur le sujet a utilisé une étape d'extraction du filtrat permettant de travailler à des concentrations faibles, représentatives de l'environnement en concentrant les contaminants organiques avant analyse. Cependant, travailler à des concentrations trop proches des limites de quantification est une difficulté car les composés peuvent ne pas être détectés ou être quantifiés avec une justesse et une répétabilité à peine acceptables. Dans aucune des études de l'état de l'art n'apparaît un bilan de matière. Cette étude a tenté de les réaliser pour chacun des composés. Les résultats montrent qu'il est effectivement assez difficile, en fonction des propriétés physico-chimiques des composés et des nombreuses étapes du protocole, d'arriver à atteindre des valeurs proches de 100%. Compte tenu du protocole et de la méthode d'analyse utilisée, les bilans de matière peuvent être considérés comme satisfaisants et apportent des informations sur le devenir des composés au sein du système expérimental.

En ce qui concerne les coefficients de distribution (K_d), afin de pouvoir confronter les résultats obtenus lors de cette étude à ceux retrouvés dans la littérature, le **tableau 4.10** fait état des différentes études. Il montre également les temps d'équilibre de sorption.

Contaminant	Log	MP	Temps	K _d (L/kg)	Références	
	Kow		d'équilibre (h)	_		
		PE	24	38 100		
		PP	24	2 190	Teuten et al., 2007	
		PVC	24	1 650-1 690		
	4,5	PE	24	51 532	Bakir et al., 2012	
Phénanthrène		PVC	24	2 285		
		PE	>80 jours	13 000		
		PP	20-40 jours	380	Karapanagioti and Klontza, 2008	
		POM	>80 jours	7 400		
		PEP	>80 jours	>12 000		
Dichlorodiphényltrichloroéthane	6.26	PE	48	96 892		
(DDT)	0,50	PVC	24	104 785	– Bakir et al., 2014a; b –	
Acide perfluoro-octanoïque	07	PE	24	496		
(POFA)	0,7	PVC	24	7		
Phtalate de bis(2-éthylhexyle)	75	PE	24	98 494		
(DEHP)	7,5	PVC	24	11 917		
PCB 77	6,72	PP	8	1183	Zhan et al., 2016	
Carbamazépine	2,45	PE	48	191		
4-methylbenzylidene camphre	5,1	PE	48	53 225		
(4-MBC)					Wu et al., 2016	
Triclosan	4,76	PE	48	5 140	_	
17α-éthinylestradiol	3,67	PE	48	312		
17β-estradiol	4,01	PE	48	2,5	Daughety, 2017	

Tableau 4.10: Valeurs des coefficients de distribution (K_d) de contaminants organiques sur des microplastiques trouvées dans la littérature.

Les temps d'équilibre de sorption observés dans les différentes études du **tableau 4.10** sont compris entre 8h et plus de 80 jours. Dans cette étude, il a été déterminé à 8h ce qui correspond aux résultats de Zhan et al. (2016).

Le **tableau 4.10** montre que le phénanthrène est le contaminant le plus étudié, avec trois études, la première datant de 2007. Depuis 2014, d'autres contaminants ont été étudiés. Des valeurs de K_d pour une large étendue de polarité de composés sont maintenant disponibles. Cependant, il n'y a jamais plus d'une étude par composé, excepté pour le phénanthrène. Il est donc impossible de comparer les valeurs entre études pour en déduire la variabilité. Il est possible de faire cela uniquement pour le phénanthrène sorbé sur des MP de PE. Si l'ordre de grandeur des valeurs de K_d obtenues dans les trois études est similaire, la valeur déterminée par Bakir et ses collègues en 2014 est tout de même environ 4 fois plus élevée que celle Karapanagioti et Klontza en 2008. Cette différence peut provenir des différentes concentrations en MP et contaminants utilisées, des conditions expérimentales, de la taille des MP ou encore de la méthode utilisée pour évaluer cette valeur. En effet, Bakir et al. (2014a ; 2014b) ont choisi l'isotopie radioactive pour quantifier la sorption, ce qui a permis d'obtenir de bons résultats de

ETUDE DE LA SORPTION DE POLLUANTS ORGANIQUES SUR LES MICROPLASTIQUES

recouvrements qui atteignaient jusqu'à 97%. Ils ont aussi montré qu'une quantité importante de contaminants organiques, jusqu'à 40% pour le DEHP, était sorbée sur la paroi des tubes.

Aucune étude sur les AP n'a été recensée à ce jour. Il ne sera donc pas possible de comparer les résultats de cette étude pour ces derniers. Néanmoins, des travaux ont été publiés sur les deux estradiols. Les résultats présentés dans ce chapitre semblent comparables à ceux de la littérature. Pour le 17α -éthnylestradiol sorbé sur des MP de PE, le K_d de cette étude d'une valeur de 45 ± 22 L/kg est un peu moins élevé que celui calculé par Wu et al. (2016) de 312 L/kg, mais il est du même ordre de grandeur, compte tenu des aléas analytiques. En ce qui concerne le 17β -estradiol, Daughety (2017) trouve une valeur de 2,5 L/kg qui est faible et qui n'a pas pu être déterminée dans cette étude à cause des limites de quantification de la méthode analytique.

Une différence notable de cette étude avec celles de la littérature réside dans le fait que les expériences de cinétique de sorption et de détermination de K_d ont été réalisées, dans le cadre de cette thèse, avec les contaminants organiques en mélange. Seuls Bakir et al. (2012) ont travaillé avec un mélange tout comme la présente étude. Ils ont montré qu'il pouvait se produire une compétition entre les contaminants organiques dans certains cas. Alors que les quantités de DDT sorbées sur des MP étaient inchangées en présence ou non de phénanthrène, seulement 30 à 40% de phénanthrène étaient sorbés sur les MP en présence de DDT comparativement à l'expérience sans mélange. La présence des six contaminants dans la solution peut donc avoir engendré des phénomènes de compétition de sorption les uns envers les autres qu'il faudrait évaluer.

Enfin, grâce aux précédentes études répertoriées dans le **tableau 4.10**, il est possible de mesurer l'effet de la nature du matériau plastique sur la sorption. Avec le même protocole que celui utilisé pour cette étude, Teuten et al. (2007) ont montré que la valeur de K_d du phénanthrène avec des MP de PE était près de 20 fois supérieure à celle obtenue avec des MP de PP de même taille (200 à 250 µm). De même, avec d'autres contaminants organiques dont le phénanthrène, Karapanagioti and Klontza, (2008) ont trouvé des valeurs de K_d de près de 40 fois plus importantes avec des MP de PE comparées à du PP pour des tailles de particules plus grandes, allant de 2 à 3 mm. La différence entre le PE et le PP apparaît non négligeable. Et tous ces résultats corroborent ceux de cette étude sur les quantités de 4-n-NP sorbées sur les MP de PE (celles-ci étant plus de 10 fois plus élevées que sur les MP de PP).

Conclusion

À propos de la sorption de contaminants organiques sur les MP, la stratégie mise en œuvre lors de cette étude a permis d'obtenir des résultats intéressants et parfois nouveaux au regard de la littérature (alkylphénols), tout en mettant en avant les difficultés pour réaliser ce travail et qui n'apparaissent pas vraiment à la lecture des travaux publiés sur le sujet. Le choix de travailler avec plusieurs contaminants organiques, ayant des propriétés physico-chimiques différentes, a été fait dans le but de caractériser les différentes interactions des composés avec les MP, en fonction de leur polarité notamment. Ils ont diverses origines : industrielles, pharmaceutiques, urbaines, naturelles et sont couramment rencontrés dans le milieu naturel, à l'échelle du globe. De plus, ils ont aussi été utilisés en mélange de manière à recréer ce qui est retrouvé dans l'environnement. Enfin, ils présentent, pour la plupart, des capacités de perturbation endocrinienne, qui doivent être considérées de près en écotoxicologie.

Les performances du protocole d'étude de la sorption ont été testées en calculant les bilans de matière. Ces derniers étaient compris entre 60 et 91%, ils pouvaient donc être considérés comme satisfaisants, étant donné les difficultés rencontrées. En effet, les moins bons bilans de matière ont été trouvés pour les composés les plus apolaires, qui présentaient une grande capacité à se sorber sur la verrerie et le filtre. La multiplicité des étapes du protocole et les faibles concentrations de travail, qui sont être représentatives de l'environnement, mais par conséquent proche des limites de quantification de l'appareillage analytique, ont également été des verrous. Malgré tout, des résultats ont été obtenus en termes de concentrations des contaminants organiques dans l'eau de mer et sur les MP permettant de calculer des coefficients de distribution (K_d).

Les résultats ont bien mis en évidence une augmentation de la sorption des contaminants organiques sur/dans les MP avec la diminution de la polarité. Par exemple, après sorption sur les MP, il était impossible de détecter le composé le plus apolaire (4-n-NP) dans l'eau de mer, et ce, même après une extraction liquide-liquide au dichlorométhane et une concentration de l'échantillon, alors que la sorption aux MP du composé le plus polaire (17 β -estradiol) n'a pas pu être mise en évidence avec les outils analytiques à disposition. Ainsi, il était impossible de calculer leur K_d mais cela a été fait pour les autres contaminants : le 4-n-OP, le 4-t-OP et le 17 α -éthinylestradiol. Aucune valeur concernant les alkylphénols n'ont été publiées à ce jour, cela montre l'originalité de cette étude et en même temps rend impossible la comparaison avec les résultats obtenus. En revanche, les résultats obtenus pour les deux estradiols étudiés sont

proches de ceux de la littérature, ainsi que les différences de sorption du 4-n-nonylphénol observées en fonction de la matière plastique PE ou PP.

Tous les résultats de ce travail doctoral présentés à travers les trois derniers chapitres de ce manuscrit font état de la contamination du compartiment sédimentaire marin par les MP, leur bioaccumulation par des bivalves et leur capacité de sorption de contaminants organiques. La prochaine et dernière partie de ce manuscrit va permettre de confronter tout ce qui a été discuté jusqu'alors en terminant par la présentation de nouvelles perspectives.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux de cette thèse se sont inscrits dans le projet de recherche régional MIPLAQUA dont l'un des objectifs majeurs est l'évaluation de la contamination des zones côtières de la région des Pays de la Loire par les microplastiques. Les prélèvements ont été conduits sur trois sites soumis à des influences océaniques et terrigènes diverses et présentant des activités ostréicoles et/ou conchylicoles importantes : Pen-Bé, au nord, Coupelasse, dans la baie de Bourgneuf, et, plus au sud, la baie de l'Aiguillon. En parallèle, les interactions de sorption de divers contaminants organiques sur les MP ont également été étudiées.

Au regard des résultats obtenus, plusieurs objectifs ont été atteints dans cette étude :

• Mise au point de protocoles d'extraction et d'identification de MP dans des matrices naturelles

En raison des spécificités de compositions de chacune des matrices étudiées (bivalves et sédiments), des protocoles d'analyse des MP ont été développés spécifiquement pour chaque matrice. Certaines étapes sont communes, telles que l'étape de filtration, l'identification et la caractérisation des MP. En revanche, alors que les tissus congelés des organismes peuvent être extraits directement, après décongélation, une étape de séchage des sédiments est nécessaire, afin de s'affranchir des variations de teneurs en eau dans cette matrice. L'étape d'extraction des MP doit également être adaptée aux matrices étudiées, une digestion des tissus par un acide ou une base forte étant nécessaire pour les organismes, alors qu'une séparation par flottaison est suffisante pour les sédiments marins.

Pour les **organismes**, plusieurs composés, ou mélanges de composés, ont été testés, afin d'évaluer l'efficacité de la digestion ; l'hydroxyde de potassium (KOH 10%) s'est révélé être le plus efficace. Les conditions d'agitation et les volumes de réactif utilisés pour cette extraction ont également été optimisés. Par la suite, les étapes de sédimentation ont été optimisées. Cela a permis de proposer la mise en œuvre de sédimentations successives, en utilisant des solutions d'iodure de potassium (KI à 50%), l'**efficacité d'extraction de la méthode proposée étant supérieure à celles rapportées dans la littérature. En permettant l'élimination de plus de 99,9% des tissus et matières minérales, cette méthode permet de rechercher, d'identifier et de quantifier rapidement les MP directement sur le filtre, après l'étape de filtration. Le taux de récupération des MP a été évalué à l'aide de tissus dopés. Il s'est révélé satisfaisant pour les MP étudiés de taille comprise entre 50 à 400 µm (70, 90 et 100% pour le PP, PVC et PE respectivement).** Pour les **sédiments** étudiés, une simple technique de séparation par flottaison, impliquant l'ajout d'eau déminéralisée aux sédiments secs et tamisés, suivie d'une centrifugation, s'est avérée efficace. **Ce protocole présente de nombreux avantages, par rapport à ceux décrits dans la littérature : il est économique, respectueux de l'environnement et rapide**. Une limite de son utilisation aux sédiments peu chargés en débris organiques, peut cependant être soulignée. Ce protocole a été validé, à l'aide de sédiments dopés avec quatre types de MP de densité variable (PE, PP, PVC et PET de taille comprise entre 50 à 400 µm), et a montré des taux de récupération satisfaisants (de 83 à 106%). Par ailleurs, la concentration en MP dans la matrice sédimentaire constituant une variable discontinue, du fait de l'hétérogénéité de distribution des MP dans une vasière, l'évaluation du nombre de réplicats nécessaires pour atteindre une représentativité statistique satisfaisante de l'échantillon, a été envisagée. Les résultats obtenus montrent qu'un minimum de 10 réplicats est requis et que le nombre de réplicats réalisés dans les études publiées, jusque-là, semble insuffisant de ce point de vue.

• Des premiers résultats sur la contamination en MP dans les organismes et les sédiments des vasières intertidales du Golfe de Gascogne ont été obtenus.

La contamination moyenne des bivalves étudiés dans ce travail a été évaluée à $0,23 \pm 0,20$ MP/g de poids frais ($0,77 \pm 0,67$ MP/g poids sec) pour la moule ; et $0,18 \pm 0,16$ MP/g poids frais ($0,60 \pm 0,53$ MP/g poids sec) pour l'huitre.

Concernant les concentrations exprimées en nombre de particules par individu, une concentration moyenne, significativement plus élevée, a été obtenue pour l'huître $(2,10 \pm 1,71 \text{ MP/individu})$, comparativement à la moule $(0,61 \pm 0,56 \text{ MP/individu})$. Cette observation peut être liée à une différence de taux de filtration entre les deux espèces (jusqu'à 1,8 L/h pour la moule (Clausen et Riisgard, 1996) et 5 L/h pour l'huitre (Barillé et al., 1997), conduisant à une exposition plus importante de l'huitre aux MP. La comparaison des teneurs, exprimées en poids sec, dans les organismes avec celles des sédiments des vasières (0,067 ($\pm 0,076$) MP/g de sédiment sec en moyenne) fait apparaitre une accumulation des MP par les bivalves comparativement au compartiment sédimentaire, montrant que ce sont des **espèces pouvant être considérées comme de bons bioindicateurs de la contamination du milieu marin en MP**.

Concernant la nature chimique des polymères retrouvés, deux types de MP dominent dans les trois matrices analysées : le PE et le PP. Le PE représente 38%, 47% et 24% des MP détectés dans trois matrices (moule, huître et sédiment respectivement), le PP correspondant à 47%, 25% et 38%. Ce résultat est en accord avec les quantités utilisées à l'échelle européenne, pour lesquelles le PE et le PP représentent respectivement 29,8 et 19,3% de la demande (PlasticsEurope, 2017). D'autre part, la détermination de la taille des MP identifiés permet de mettre en évidence des différences notables entre les matrices. Les MP de taille comprise entre 50 et 100 µm représentent environ 50% des MP détectés dans les deux bivalves analysés. La fraction correspondant aux MP de plus petite taille (<50 µm) est plus représentée dans les moules alors que c'est la fraction correspondant aux MP de plus grande taille (>100 μ m) qui est plus présente dans les huîtres. Ce résultat peut être expliqué par la différence de taille des bivalves $(4,42 \pm 0,48 \text{ cm pour les moules}, \text{N} = 120; \text{et } 9,60 \pm 1,53 \text{ cm}$ pour les huîtres, N = 60) et également par leur capacité de filtration des particules. Les huitres possèdent en effet des branchies et des palpes labiaux plus gros que la moule, permettant la circulation de particules de taille supérieure. Une efficacité optimale de rétention des particules comprises entre 20 et 30 µm par la moule a ainsi été déterminée par Dupuy et al. (1999), alors que l'huître peut accepter des particules alimentaires supérieures à 150 µm (Cognie et al. (2003). Ainsi, il est possible d'en conclure que ces deux espèces bioindicatrices sont complémentaires dans l'évaluation de la contamination des milieux côtiers en MP.

Des données obtenues récemment par Ifremer, dans le cadre de la DCSMM, intègrent la zone d'étude de ce travail et peuvent être utilisées pour caractériser la contamination de la colonne d'eau. Dans le Golfe de Gascogne, la quantité de macrodéchets (taille supérieure à 25 mm) sur les fonds est estimée en moyenne à 94 items par km² (variant de 0 à 1619 items/km²) (Ifremer, 2017). Cela le place en deuxième position sur quatre après la Méditerranée (222 items/km²). En exprimant les résultats en masse, le Golfe de Gascogne est cependant le plus impacté, avec une moyenne de 1411 kg/km² (variant de zéro à 561 839 kg/km²). Ce rapport montre également que les déchets plastiques représentent entre 60 et 80% des macro-déchets trouvés dans cette zone et sont plus importants en termes de poids et d'abondance que les autres déchets (bois recyclé, produit naturel, papier carton, métallique etc.) Après 2014, une augmentation a été observée, avec des pourcentages minimaux de 80% pour les plastiques. Concernant la source de ces déchets plastiques, ils sont principalement composés par des cordages synthétiques (avec une augmentation de 8,7 à 20,4 items/km² entre 2012 et 2016), ainsi que de plastiques issus des activités de pêche comme les lignes de pêche, les filets de pêche, etc.

Concernant les déchets plastiques de taille micrométrique, des concentrations s'échelonnant entre 12 et 2 969 MP par hectare de surface d'eau de mer, soit 1 200 à 296 900 MP/km², ont été mesurées dans le Golfe de Gascogne (Ifremer, 2017). La **figure C.1** présente les variations de concentration de ces MP flottants (de taille comprise entre 300 µm et 5 mm) dans le golfe en 2014. Malgré un faible nombre d'échantillons analysés, deux points importants peuvent être soulignés: (i) les valeurs les plus élevées sont principalement localisées dans la partie sud du Golfe de Gascogne, traduisant une zone d'accumulation dépendante de la dynamique des courants et de la configuration géomorphologique de la côte (Lazure et Desmare, 2012) ; (ii) au centre du golfe, les stations positionnées au large (plateau continental) sont moins impactées que celles localisées près de la côte, pouvant s'expliquer par une orientation Nord-Ouest du courant sur le plateau continental, drainant rapidement les MP en dehors du Golfe de Gascogne.



Figure C.1: Densité (unité/hectare) des MP (de 300 µm à 5 mm) flottant dans le Golfe de Gascogne en 2014 (source : Ifremer, 2017)

Comparées aux valeurs publiées pour le domaine maritime français, les concentrations de MP mesurées dans le Golfe de Gascogne sont comparables à celles observées à Brest $(42 \pm 56 \text{ MP/km}^2; \text{Frère et al. 2017})$ et significativement inférieures aux valeurs mesurées en Méditerranée (62 000 MP/km², Collignon et al., 2014 ; 34000 à 212000 MP/km², Schmidt et al. 2018 ; 244 000 MP/km², Cozar et al. 2015).

Les distributions de taille des microplastiques retrouvés sont présentées dans le tableau C.1.

Tableau C.1: Distribution des tailles des déchets plastiques retrouvés dans l'eau de surface du Golfe de Gascogne (source : Ifremer, 2017). Les mésoplastiques sont définis par une taille comprise entre 5 et 25 mm.

Annéo	% Microplastiques				9/ Máganlagtiques
Annee	% (0,3-1 mm)	% (1-2 mm)	% (2-5 mm)	Total MP	76 Mesoplastiques
2014	50,05	24,79	13,63	88,47	11,53
2015	53,12	35,42	10,42	98,96	1,04
2016	48,15	26,85	15,74	90,74	9,26

Les MP de taille comprise entre 300 et 1000 μ m sont majoritaires dans la colonne d'eau, sur les trois années d'observation (2014 à 2016). Ce résultat est significativement supérieur à celui obtenu par Frère et al., 2017 au niveau de Brest, où le pourcentage des MP de taille comprise entre 300 et 1000 μ m ne représente que 26% et celui des MP de taille supérieure à 1 mm a été évalué à 74%.

Comparativement aux données obtenues dans ce travail, et en ne considérant que les MP de taille supérieure ou égale à 300 μ m, les MP détectés dans les sédiments de surface sont de taille inférieure à ceux présents dans la colonne d'eau : 81,8 % sont compris entre 300 μ m et 1 mm, 18,2 % entre 1 et 2 mm, et aucun MP supérieur à 2 mm n'a été retrouvé (n = 11 particules). Cette observation souligne l'accumulation limitée des MP de taille supérieure à 1 mm dans les sédiments des vasières intertidales et corrobore le modèle d'Enders et al. (2015) décrivant la distribution de MP dans l'eau de mer. Ces auteurs ont démontré que les polymères, comme le PE et le PP, de taille supérieure à 1 mm, flottent sur la surface de l'eau d'une manière similaire à celle des macroplastiques. Les MP de 10 à 100 μ m sont attendus plus en profondeur dans la colonne d'eau, 24 et 33 mètres en moyenne respectivement pour les tailles 100 et 10 μ m (Enders et al., 2015). Le temps de résidence des MP de taille proche de 1 mm, à la surface de l'océan, peut donc être considéré comme plus long que celui des plus petits MP.

Dans les deux espèces de bivalves filtreurs étudiées dans ce travail, l'accumulation des particules supérieures à 300 µm est limitée car seulement 1/73 particules présentent cette taille chez la moule, et 8/126 chez l'huître. L'absence de données sur les particules inférieures à 300 µm dans la colonne d'eau du Golfe de Gascogne limite le calcul de l'efficacité de rétention des MP par les organismes étudiés dans ce travail. Une valeur de 0,003% a été calculée pour des organismes adultes de *Mytilus edulis* présentant des teneurs en MP comparables à celles observées dans la présente étude par Van Cauwenberghe et al. (2015), en Mer du Nord. Au

regard des difficultés techniques de l'analyse des petits MP dans la colonne d'eau, il semble donc pertinent d'utiliser des organismes filtreurs tels que la moule ou l'huître pour l'évaluation de la contamination des écosystèmes littoraux par ces MP.

• Peu d'influence du site de prélèvement, de la saison d'échantillonnage ou du mode de vie des organismes sur la contamination en MP a été mis en évidence.

L'absence de variation de la contamination en MP, liée à la localisation des prélèvements, traduit une pression de contamination en MP similaire au niveau de la zone du Golfe de Gascogne étudiée, malgré des différences inter-sites notables en termes d'apports terrigènes et d'influences océaniques. D'autre part, l'étude de l'influence de la saisonnalité ne révèle pas de différence de contamination entre le début de l'automne, qui fait suite à une période de pression anthropique intense, au niveau du littoral, pendant laquelle le taux de filtration des bivalves suspensivores est maximal, et le début du printemps, succédant à une période d'intempéries favorisant la remobilisation des sédiments et des contaminants. Il sera intéressant d'investiguer les variations de teneurs au cours d'un cycle complet d'élevage des moules et des huitres, en fonction de l'âge des individus et incluant une saisonnalité plus étendue.

Par ailleurs, **le mode de vie des organismes étudiés semble avoir une influence sur le niveau d'exposition** des deux espèces étudiées aux MP. En effet, le nombre d'organismes présentant des MP est plus élevé pour les organismes cultivés (90% des lots analysés pour la moule et 93% pour l'huitre) que pour les organismes sauvages (65% et 80%, respectivement). Ce résultat peut traduire une exposition plus importante des organismes en culture aux micro-déchets plastiques, notamment par le biais des poches de culture, des filets et autres accessoires utilisés en conchyliculture. Ces matériels utilisés ont été analysés par µFTIR dans le cadre de cette étude, démontrant qu'ils sont principalement constitués de polymères de PE, PP et de polyester.

• Une comparaison des teneurs en MP dans les organismes et les sédiments des vasières intertidales du Golfe de Gascogne à l'échelle nationale et internationale a été réalisée.

A l'échelle locale, la comparaison des résultats de cette étude, avec ceux reportés dans la littérature sur le Golfe de Gascogne indique des taux de contamination plus élevés dans les zones conchylicoles étudiées (Pen Bé, Coupelasse, Baie de l'Aiguillon) que ceux observés à Brest, pour lesquels des valeurs 20 à 70 fois inférieures ont été rapportées pour la moule (*Mytilus edulis*) et le sédiment, respectivement (Thèse Laura Frère, 2017 ; Frère et al., 2017). Cependant, la différence des techniques utilisées peut expliquer cette variation. Par exemple,

pour la moule, une grande quantité de MP inférieurs à 100 μ m (83%) a été détectée dans cette étude alors que la technique utilisée par Frère et al. 2017 se limite aux particules supérieures à 100 μ m.

A l'échelle internationale, les teneurs en MP mesurées dans les deux espèces de bivalves du Golfe de Gascogne sont globalement environ 5 à 20 fois inférieures à celles rapportées pour les moules (Mytilus edulis) prélevées en Chine (Li et al., 2016), et plus de 100 fois inférieures à celles rapportées pour les moules (Mytilus edulis) prélevées au Canada (Mathalon and Hill, 2014). Les études sur les bivalves en Europe sont bien représentées dans la littérature (8 sur 11 études publiées en février, 2018), ce qui permet de réaliser une étude comparative. Les résultats rapportés montrent que la contamination en MP dans les bivalves de la région des Pays de la Loire semble similaire à celle mesurée en Belgique (De Witte et al., 2014), en Allemagne (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014), et en Angleterre (Catarino et al., 2016; Vandermeersch et al., 2015). Récemment, deux études ont évalué les contaminations en MP dans ces deux espèces de bivalves (Mytilus edulis et Crassostrea gigas) au Pays-Bas, décrivant des quantités importantes : jusqu'à une centaine de MP / g de poids sec pour la moule (Karlsson et al., 2017 ; Leslie et al., 2017) et entre 30 et 87 MP / g poids sec pour l'huître (Leslie et al., 2017). Concernant le sédiment, le nombre d'études visant à caractériser les teneurs en MP dans les sédiments du littoral français est plus important que pour les bivalves. Des teneurs comparables à celles observées dans les sédiments de Normandie (143 à 156 MP/kg de sédiment sec, Lots et al. 2017) peuvent être relevées dans les vasières des trois sites investigués dans cette étude (67 (±76) MP/kg sédiment sec). Ces teneurs sont cependant inférieures aux valeurs mesurées en Mer du Nord (481 (±587) MP/kg de sédiment sec, Maes et al., 2017), mais supérieures aux valeurs rapportées à Brest (0,97 \pm 2,08 MP/kg de sédiment sec; Frère et al., 2017) et à Dunkerque (autour de 4 MP/kg de sédiment sec ; Van Cauwenberghe et al., 2015). De nombreux facteurs méthodologiques (tamisage, extraction, technique d'identification, nombre de réplicats) et abiotiques (profondeur de prélèvement, distance à la côte, marée, saison, courants marins etc.) sont source de variabilité et rendent difficile la comparaison des données publiées.

La caractérisation des MP retrouvés reste souvent comparable entre les études (Frère et al., 2017 et Van Cauwenberghe et al., 2015). Les résultats montrent une grande proportion de MP flottants (PE, PP), en forme de fragments et de couleur grise. Exception pour la Manche, où la forme sphèrique semble prédominer (Maes et al., 2017) ainsi que la couleur noir/bleu (Lots et al., 2017), ce qui pourrait traduire une source différente de MP.

• La caractérisation de la capacité de sorption de divers contaminants organiques sur les MP de PE et de PP a été investiguée.

Dans un objectif d'évaluation de l'écotoxicité des MP pour les organismes marins et de leur capacité à servir de vecteur de contamination en micropolluants organiques, la sorption de six composés (alkylphénols, estradiols) retrouvés dans les eaux continentales et marines, avec des log Kow variés (3,29 à 4,48), a été étudiée en utilisant des MP de PE (53 à 100 µm). Après différentes optimisations méthodologiques, la cinétique de sorption des composés organiques sur les MP a été étudiée en eau de mer (30 PSU) et a permis de déterminer les temps d'équilibre. Les résultats obtenus ont montré une sorption fortement dépendante de la polarité des composés, avec un coefficient de distribution (K_d) variant de 45 L/kg pour l'EE2 à 1580 L/kg pour le 4-n-OP (22°C). Une valeur presque sept fois supérieure a été calculée par Wu et al. (2016) pour l'EE2. Les résultats obtenus pour les alkylphénols constituent les premières évaluations reportées jusque-là.

Malgré des difficultés analytiques ne permettant pas le calcul du K_d pour le 4-n-NP, les concentrations calculées en phase solide, à l'équilibre, démontrent qu'il présente le plus d'affinité pour les MP parmi les contaminants étudiés. Dans ce sens, et en raison de son omniprésence dans les écosystèmes aquatiques, une étude supplémentaire a été conduite afin de déterminer les quantités maximales de 4 n-NP pouvant se sorber sur des MP de PE et de PP, afin d'évaluer le pouvoir de vectorisation des MP pour des organismes marins en laboratoire. Les résultats obtenus démontrent une différence notable de sorption entre des MP de PE et de PP de même taille (50 à 100 μ m), avec des valeurs atteignant 2260 ± 199 ng 4-n-NP/mg de PE et 200 \pm 25 ng 4-n-NP/mg de PP, en eau de mer (30 PSU) à 10 µg/mL de 4-n-NP et à 15°C. Considérant les concentrations en MP les plus élevées reportées en milieu marin, l'étude en laboratoire de la vectorisation du 4-n-NP via les MP apparait difficilement envisageable dans le respect de conditions environnementales. En effet, une concentration haute d'exposition de 100 µg de MP/L conduirait à une concentration maximale en 4-n-NP de 226 ng/L pour les PE et de 20 ng/L pour les PP. Ces valeurs sont trop faibles pour permettre un suivi quantitatif du 4-n-NP dans les différents compartiments d'un système expérimental d'exposition (ex : individu, eau de mer). L'hypothèse de vectorisation des contaminants organiques par les MP pour les organismes marins a été proposée par Teuten et al. (2007). De nombreuses études ont été réalisées, afin de tester cette hypothèse (Oliveira et al., 2013 ; Rochman et al., 2013) via des expositions au laboratoire. Plusieurs effets, liés à l'accumulation des contaminants organiques par les MP, ont été observés au niveau cellulaire (réponses immunologiques,

neurotoxicité) ou bien sur la mortalité des bivalves ou des poissons exposés à des MP de PE ou PS ayant sorbé du pyrène (Avio et al., 2015 ; Oliveira et al., 2013). L'absence d'effet a en revanche aussi été relevée chez d'autres organismes, comme dans l'étude récente de Guven et al. (2018), qui a exposé le barramundi (*Lates calcarifer*) à des MP de PS et à du pyrène en mélange ou non (concentrations : 100 MP/L et 100 nM de pyrène). Aucune influence sur la capacité d'alimentaire du poisson n'a été mise en évidence par ces auteurs.

A l'échelle mondiale, la masse d'eau est estimée à 10^{13} fois celle des plastiques et la masse d'atome de carbone 10^7 fois (Gouin et al., 2011 ; Koelmans et al., 2016). Le rôle de vecteur des MP apparaît donc très limité. Gouin et al. (2011) ont ainsi déterminé que la sorption sur le PE concerne moins de 0,1% des contaminants organiques présents dans le milieu marin. Dans le Golfe de Gascogne, la densité en masse des MP est comprise entre 0,07 ± 0,06 g/ha en 2013; N = 4) et 0,73 ± 1,15 g/ha pour l'année 2014; N=19), soit 7 à 73 g/km² (Ifremer, 2017). Selon les résultats obtenus dans la présente étude, la quantité maximale de 4-n-NP sorbée sur les MP sera donc comprise entre 15,8 et 165,0 µg pour une surface de 1 km². Selon l'hypothèse d'une profondeur moyenne dans cette zone d'un km, la concentration de 4-n-NP sorbé sur les MP sera au maximum égale à 1,7 x 10⁻⁷ ng/L. Au regard des concentrations en NP retrouvées dans l'eau de mer (comprises entre 0,1 et 4100 ng/L, **tableau 4.1**), le rôle des MP, comme vecteur de contaminants organiques, semble très limité et le risque d'exposition des organismes marins aux contaminants organiques, via les MP, paraît négligeable par rapport aux autres voies d'exposition (eau, sédiments, atmosphère, alimentation...).

Au regard des difficultés d'évaluation de la contamination en MP dans les milieux marins et également de ses conséquences, plusieurs perspectives de recherche, faisant suite à ce travail, peuvent être proposées.

A l'heure actuelle, les données obtenues sur la contamination des écosystèmes naturels par les MP ne sont pas facilement comparables en raison des différents protocoles appliqués, comme discuté dans les chapitres 2 et 3. Chaque protocole présente des avantages, mais aussi des inconvénients. Par exemple, le protocole mis au point sur les organismes est rapide, avec une excellente efficacité de digestion et de récupération des MP, mais il ne permet pas d'accéder aux MP inférieurs à 20 µm. Il est donc nécessaire d'**établir des protocoles standardisés au niveau international**, afin d'obtenir des résultats comparables et d'avoir un point vue global sur la contamination en MP. Ces protocoles doivent être développés selon trois critères: (1)

augmenter les performances d'analyse des MP, en diminuant la taille analysable jusqu'à 1 μ m, permettant notamment une meilleure caractérisation des fibres ; (2) favoriser l'automatisation de l'analyse microscopique et la rendre plus robuste ; (3) optimiser le protocole d'extraction spécifiquement pour chaque matrice. Dans cette étude, le KOH à 10% s'est révélé être le plus performant pour la digestion des tissus de bivalves (Phuong et al., 2017). Cependant, une application de ce réactif sur des tissus de poissons (*Melanogrammus aeglefinus* et Oncorhynchus *sp*.) a été réalisée par l'IMMM (Institut des Molécules et Matériaux du Mans), avec peu de succès, probablement en raison d'une grande proportion de matière grasse dans l'échantillon.

Le développement de protocoles spécifiques et standardisés pour différentes catégories d'organismes permettra une évaluation de la contamination en MP dans les réseaux trophiques et une meilleure appréciation des risques d'exposition par voie alimentaire. Les moules font l'objet de nombreuses études, en raison de leur mode d'alimentation qui leur confère un statut de bioindicateur de la contamination de la colonne d'eau. Cependant en termes de consommation par l'Homme, les poissons, tout aussi exposés aux MP, sont plus consommés et doivent faire l'objet d'un effort de recherche croissant.

En parallèle, le devenir des MP dans les organismes mérite d'être approfondi. Quelle est l'efficacité de rétention des MP par les organismes? Quel est l'organotropisme des MP ? Quelle est l'excrétion des MP ? Le transfert trophique de MP a été démontré par Farrell and Nelson (2013) entre la moule (*Mytilus edulis*) et le crabe (*Carcinus maenas*). Les résultats obtenus par ces auteurs sont cependant à considérer avec prudence dans la mesure où l'exposition a impliqué un seul type de MP (microsphère de PS) en très forte concentration sur un temps court (environ 50 millions de particules par individu pendant 1h). Afin de caractériser plus précisément les risques sanitaires pour l'Homme, l'étude des transferts trophiques vers des espèces de plus haut niveau et/ou consommées par l'Homme sera pertinente et devra considérer différents types de MP (nature, forme et taille).

Le milieu marin apparait comme le plus impacté des compartiments environnementaux par les MP. Quelques études sur les environnements terrestres comme l'air (Gasperi et al., 2015), l'eau douce (Dris et al., 2015b; Free et al., 2014; Jambeck et al., 2015), l'eau de décharge (Dris et al., 2015a) et les organismes terrestres (Huerta Lwanga et al., 2016; Rillig, 2012) ont été conduites. Cependant, celles-ci semblent insuffisantes, compte tenu des conséquences potentielles des MP sur les écosystèmes. **Plus de travaux sur les environnements**

continentaux sont donc nécessaires, notamment pour mieux caractériser la présence des MP dans l'air et l'exposition de l'homme par voie respiratoire.

Les connaissances sur le devenir des MP dans l'environnement sont également à approfondir. Depuis quelques années, des études sur l'influence des conditions environnementales sur la fragmentation des macro-déchets et des MP sont menées (Andrady, 2011). Un défi d'investigation s'ouvre alors sur les nanoplastiques (Bouwmeester et al., 2015; Da Costa et al., 2016; Gigault et al., 2018). Leur étude constitue un véritable défi analytique, en termes de performance, d'efficacité et de rapidité. En parallèle, quelques études s'intéressent aux interactions entre MP et contaminants organiques, métaux et micro-organismes (Bakir et al., 2012; Teuten et al., 2007; Zettler et al., 2013). Les résultats reportés sont intéressants mais restent incomplets. Par exemple, différents auteurs ont démontré la colonisation de la surface des MP par les micro-organismes, mais les impacts sur les micro-organismes n'ont pas été explorés (Cole et al., 2013; Zettler et al., 2013). D'autre part, l'étude de la sorption des contaminants organiques et inorganiques sur les macro-déchets plastiques semble plus pertinente à étudier que celles sur les MP, dans la mesure où les conséquences sur le transport des contaminants dans les écosystèmes, et éventuellement sur leur vectorisation vers les organismes, seront plus importantes.

L'évaluation des impacts sur les animaux constitue également un champ d'investigation important, nécessitant la considération des MP seuls et associés avec les microorganismes et/ou les contaminants chimiques des milieux. De nombreux impacts nocifs des déchets plastiques sur les organismes marins ont été reportés à ce jour (Law, 2017 ; Wright et al., 2013). Mais la plupart concernent les macrodéchets ou bien les MP mais à très haute concentration. Concernant les MP, plusieurs effets biologiques sur les animaux marins ont été observés, via des expositions au laboratoire : mortalité, perte de poids, diminution de la capacité d'alimentation, induction de biomarqueurs de réponse, altérations de l'expression génique (Brown et al., 2008; Cole et al., 2015; Oliveira et al., 2013; Von Moss et al., 2012). Comme déjà mentionné dans la revue d'articles réalisée (chapitre 1), les conditions d'exposition au laboratoire sont souvent très éloignées de celles retrouvées en milieu naturel (i.e. la concentration, le temps d'exposition, la nature et le type des MP). En termes de concentration, il est difficile de comparer la concentration d'exposition au laboratoire (masse ou nombre par volume, mL ou L en général) et la concentration mesurée dans l'eau de mer (masse ou nombre par aire, m² ou km² en général). Sur le littoral français, seule la concentration rapportée à Dunkerque (0,6 MP/L) peut être comparée. Elle est très inférieure aux concentrations

d'exposition telle que 42 MP/mL dans l'étude de Brown et al. (2008), 110 MP/mL dans l'étude de Van Cauwenberghe et al. (2015) ou bien jusqu'à 50 millions de MP par moule dans l'étude de Farrell and Nelson (2013).

L'impact des MP sur l'homme reste méconnu à ce jour. Une estimation de plus de 10 000 particules de MP absorbées/individu/an a été calculée en Belgique pour les plus gros consommateurs de moules et d'huîtres (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). Dans notre étude, en considérant la consommation des deux espèces de bivalves étudiées, une valeur approximative de 240 particules de MP/français/an a été obtenue. Ces petites particules peuvent donc s'accumuler dans le corps humain au fur et à mesure des expositions, pouvant induire de potentiels effets néfastes. A la lumière de ces résultats, il parait nécessaire d'établir des limites maximales de concentration des MP dans les bivalves consommables et dans les autres espèces consommées, afin de protéger la santé des consommateurs. . Il est également primordial de souligner l'importance de l'exposition par l'eau de boisson. Deux nouvelles études publiées en 2018 ont montré la présence inquiétante de MP dans diverses boissons destinées à la consommation humaine. Des concentrations moyennes de 325 MP/L d'eau embouteillée, de 5,45 MP/L d'eau robinet et de 4,05 MP/L de bière ont été déterminées (Kosuth et al., 2018, Mason et al., 2018). En France, pour 2016, la consommation est estimée à 125 L/habitant d'eau embouteillée et à environ 425 L/habitant d'eau du robinet (Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, 2018). Celle de la bière a été estimée à environ 30 L/habitant pour l'année 2015 (Statista, 2018). De par la consommation de ces trois boissons, près de 44 000 MP peuvent donc être ingérées par individu chaque année.

Alors que les solutions permettant de réduire efficacement les déchets plastiques présents dans l'environnement n'existent pas encore, des perspectives de gestion ont été définies afin de mieux protéger l'avenir. Les cinq « R » incluant de « réduire, réutiliser, recycler, récupérer and re-designer » doivent être appliqués dans nos utilisations quotidiennes des objets plastiques. Un espoir de remédiation des déchets plastiques est également né récemment, grâce à des études mettant en évidence la dégradabilité de divers types de plastiques par des champignons ou des bactéries (Russell et al., 2011; Yoshida et al., 2016). *Pestalotiopsis microspora* et *Ideonella sakaiensis* ont ainsi montré une capacité de dégradation des PUR et du PET respectivement. Ces résultats restent encore à approfondir mais sont prometteurs et doivent être complétés par des études impliquant d'autres espèces et à plus grande échelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abayomi, O. A., Range, P., Al-Ghouti, M. A., Obbard, J. P., Almeer, S. H., Ben-Hamadou, R., 2017. Microplastics in coastal environments of the Arabian Gulf. Marine pollution bulletin 124(1), 181-188.

Acampora, H., Lyashevska, O., Van Franeker, J. A., O'Connor, I., 2016. The use of beached bird surveys for marine plastic litter monitoring in Ireland. Marine environmental research, 120, 122-129.

Acampora, H., Berrow, S., Newton, S., O'Connor, I., 2017. Presence of plastic litter in pellets from Great Cormorant (*Phalacrocorax carbo*) in Ireland. Marine pollution bulletin 117(1-2), 512-514.

Acevedo, N., Davis, B., Schaeberle, C. M., Sonnenschein, C., Soto, A. M., 2013. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. Environmental health perspectives, 121(9), 1040.

AFNOR, 12-2016. Norme Française. Plastiques - Symboles et termes abrégés - Partie 1 : polymères de base et leurs caractéristiques spéciales.

Allen, R., Jarvis, D., Sayer, S., Mills, C., 2012. Entanglement of grey seals *Halichoerus grypus* at a haul out site in Cornwall, UK. Marine pollution bulletin, 64(12), 2815-2819.

Alomar, C., Estarellas, F., Deudero, S., 2016. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. Marine Environmental Research. 115, 1 - 10.

Amélineau, F., Bonnet, D., Heitz, O., Mortreux, V., Harding, A. M., Karnovsky, N., et al., 2016. Microplastic pollution in the Greenland Sea: Background levels and selective contamination of planktivorous diving seabirds. Marine pollution bulletin, 219, 1131-1139.

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Marine pollution bulletin 62, 1596-1605.

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 1977–1984.

Anh, H. Q., Nam, V. D., Tri, T. M., Ha, N. M., Ngoc, N. T., Mai, P. T. N., et al., 2017. Polybrominated diphenyl ethers in plastic products, indoor dust, sediment and fish from informal e-waste recycling sites in Vietnam: a comprehensive assessment of contamination, accumulation pattern, emissions, and human exposure. Environmental geochemistry and health, 39(4), 935-954.

Antunes, J. C., Frias, J. G. L., Micaelo, A. C., Sobral, P., 2013. Resin pellets from beaches of the Portuguese coast and adsorbed persistent organic pollutants. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 130, 62-69.

Arditsoglou, A., Voutsa, D., 2008. Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers. Environmental Pollution, 156(2), 316-324.

Arnold, E., Larsen, J., 2006. Bottled water: Pouring resources down the drain. Earth Policy Institute, 2.

Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. In Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris, NOAA Technical Memorandum NOS-OR & R-30.NOAA (p. 530). Silver Spring, September 9–11, 2008.

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. Environmental Pollution, 198, 211-222.

Avio, C. G., Gorbi, S., Regoli, F., 2015b. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. Marine environmental research, 111, 18-26.

Azzarello, M. Y., Van Vleet, E. S., 1987. Marine birds and plastic pollution. Marine Ecology Progress Series, 295-303.

Barillé, L, Prou, J, Héral, M, Razet, D, 1997. Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). J. Exp. Marine Biology and Ecology 212, 149-172.

Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 1985–1998.

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2012. Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. Marine pollution bulletin, 64, 2782-2789.

Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014a. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. Environmental Pollution, 185, 16-23.

Bakir, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., 2014b. Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 140, 14-21.

Ballent, A., Corcoran, P., Madden, O., Helm, P.A., Longstaffe, F.J., 2016. Sources and sinks of microplastics in Canadian Lake Ontarino nearshore, tributary and beach sediments. Marine pollution bulletin, 110, 383 – 395.

Basaham, A. S., 2008. Mineralogical and chemical composition of the mud fraction from the surface sediments of Sharm Al-Kharrar, a Red Sea coastal lagoon. Oceanologia, 50(4), 557-575.

Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S., 2004. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. Marine Pollution Bulletin 48, 1161-1167.

Beck, C. A., Barros, N. B., 1991. The impact of debris on the Florida manatee. Marine pollution bulletin, 22(10), 508-510.

Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., Martínez-Gómez, C., 2016. Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. Marine pollution bulletin, 109(1), 55-60.

Bergmann, M., Wirzberger, W., Krumpen, T., Lorenz, C., Primpke, S., Tekman, M.B., Gerdts, G., 2017. High quantities of microplastics in Arctic deep-sea sediments from the HAUSGARTEN observatory. Environmental Science & Technology, 51(19), 11000 - 11010.

Besselinga, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzerc, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. Marine pollution bulletin, 95, 248-252.

Bester, K., Theobald, N., Schroder, H.F., 2001. Nonylphenols, nonylphenol- ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis (4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. Chemosphere 45, 817-826.

Bjorndal, K. A., Bolten, A. B., Lagueux, C. J., 1994. Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitats. Marine pollution bulletin, 28(3), 154-158.

Blackburn, M.A., Kirby, S.J., Waldock, M.J., 1999. Concentrations of alkyphenol polyethoxylates entering UK estuaries. Marine Pollution Bulletin 38, 109-118.

Blumenroder, J., Sechet, P., Kakkonen, J.E., Hartl, M.G.J., 2017. Microplastic contamination of intertidal sediments of Scapa Flow, Orkney: A first assessment. Marine pollution bulletin, 124(1), 112 - 120.

Boucher, J., Friot, D., 2017. Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources. Gland, Switzerland: IUCN.

Bouwmeester, H., Hollman, P. C., Peters, R. J., 2015. Potential health impact of environmentally released micro-and nanoplastics in the human food production chain: experiences from nanotoxicology. Environmental science & technology, 49(15), 8932-8947.

Braga, O., Smythe, G. A., Schäfer, A. I., Feitz, A. J., 2005. Steroid estrogens in ocean sediments. Chemosphere, 61(6), 827-833.

Brandão, M. L., Braga, K. M., Luque, J. L., 2011. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, Spheniscus magellanicus (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. Marine pollution bulletin, 62(10), 2246-2249.

Bravo Rebolledo, E. L., Van Franeker, J. A., Jansen, O. E., Brasseur, S. M., 2013. Plastic ingestion by harbour seals (*Phoca vitulina*) in The Netherlands. Marine pollution bulletin, 67(1-2), 200-202.

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). Environmental Science & Technology, 42, 5026–5031.

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. Environmental Science & Technology, 44, 3404–3409.

Buchanan, J.B., 1971. Pollution by synthetic fibers. Marine pollution bulletin, 2, 23.

Bugoni, L., Krause, L., Petry, M. V., 2001. Marine debris and human impacts on sea turtles in southern Brazil. Marine pollution bulletin, 42(12), 1330-1334.

Caliman, F. A., Gavrilescu, M., 2009. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment–a review. CLEAN–Soil, Air, Water, 37(4-5), 277-303.

Cannas, S., Fastelli, P., Guerranti, C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the coasts of south Tuscany (Tyrrhenian Sea). Marine pollution bulletin, 119, 372-375.

Campagna, C., Falabella, V., Lewis, M., 2007. Entanglement of southern elephant seals in squid fishing gear. Marine Mammal Science, 23(2), 414-418.

Carey, M. J., 2011. Intergenerational transfer of plastic debris by Short-tailed Shearwaters (*Ardenna tenuirostris*). Emu, 111(3), 229-234.

Carpenter, E.J., Smith, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso Sea surface. Science, 175, 1240–1241.

Carson, H.S., Colbert, S.L., Kaylor, M.J., McDermid, K.J., 2011. Small plastic debris changes water movement and heat transfer through beach sediments. Marine pollution bulletin 62, 1708-1713.

Castillo, A. B., Al-Maslamani, I., Obbard, J. P., 2016. Prevalence of microplastics in the marine waters of Qatar. Marine pollution bulletin, 111(1-2), 260-267.

Castro-Jiménez, J., González-Gaya, B., Pizarro, M., Casal, P., Pizarro-Álvarez, C., Dachs, J., 2016. Organophosphate ester flame retardants and plasticizers in the global oceanic atmosphere. Environmental Science & Technology, 50(23), 12831-12839.

Catarino, A. I., Thompson, R., Sanderson, W., Henry, T. B., 2016. Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. Environmental Toxicology Chemistry, 9999, 1-5.

Chang, M., 2015. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. Marine pollution bulletin, 101(1), 330-333.

Charlton, T. L., Charles, S., 1879. A Latin Dictionary, by Charlton T. Lewis and Charles Short. Oxford/Clarendon Press.

Cheng, C.Y., Liu, L.L., Ding, W.H., 2006. Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan. Chemosphere 65, 2152-2159.

Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Marine pollution bulletin, 62, 2199–2204.

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, 227–233.

Clausen, I., Riisgard, H.U., 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. Marine Ecology Progress Series 141, 37-45.

Clayton, E. M. R., Todd, M., Dowd, J. B., Aiello, A. E., 2011. The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the US population, NHANES 2003–2006. Environmental health perspectives, 119(3), 390.

Cognie, B., Barille, L., Masse, G., Beninger, P.G., 2003. Selection and processing of large suspended algae in the oyster *Crassostrea gigas*. Marine Ecology Progress Series 250, 145–152.

Colabuono, F. I., Taniguchi, S., Montone, R. C., 2010. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plastics ingested by seabirds. Marine pollution bulletin, 60(4), 630-634.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, S.C., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Marine pollution bulletin, 62, 2588–2597.

Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., et al. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. Environmental Science Technology 47(12), 6646–6655.

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.

Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E.S., Halsband, Galloway, T.S., 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. Environmental Science and Technology 49, 1130-1137.

Collignon, A., Hecq, J.H., Galgani, F., Collard, F., Goffart, A., 2014. Annual variation in neustonic micro- and meso-plastic particles and zooplankton in the Bay of Calvi (Mediterraneane Corsica). Marine Pollution Bulletin 79, 293-298.

Comité National de la Conchyliculture, Avril-2017. La conchyliculture française, CNC.

Connors, P. G., Smith, K. G., 1982. Oceanic plastic particle pollution: suspected effect on fat deposition in red *phalaropes*. Marine pollution bulletin, 13(1), 18-20.

Coppock, R.L., Cole, M., Lindeque, P.K., Queiros, A.M., Galloway, T.S., 2017. A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. Environmental Pollution, 230, 829-837.

Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., Araujo, M.C.B., Spengler, A., Tourinho, P.S., 2010. On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. Environmental Monitoring Assessment, 168, 299–304.

Courtene-Jones, W., Quinn, B., Gary, S. F., Mogg, A. O., Narayanaswamy, B. E., 2017. Microplastic pollution identified in deep-sea water and ingested by benthic invertebrates in the Rockall Trough, North Atlantic Ocean. Environmental Pollution, 231, 271-280.

Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., et al., 2014. Plastic debris in the open ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(28), 10239-10244.

Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J.I., Ubeda, B., Gálvez, J.Á., Irigoien, X., Duarte, C.M., 2015. Plastic accumulation in the Mediterranean Sea. PLOS ONE, 10(4), e0121762.

Crichton, E.M., Noel, M., Gies, E.A., Ross, P.S., 2017. A novel, density-independent and FTIR-compatible approach foor rapid extraction of microplastics from aquatic sediments. Analytical Methods, 9, 1419-1428.

Croxall, J. P., Rodwell, S., Boyd, I. L., 1990. Entanglement in man-made debris of Antarctic fur seals at Bird Island, South Georgia. Marine Mammal Science, 6(3), 221-233.

Da Costa, J. P., Santos, P. S., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T., 2016. (Nano) plastics in the environment–sources, fates and effects. Science of the Total Environment, 566, 15-26.

Dau, B. K., Gilardi, K. V., Gulland, F. M., Higgins, A., Holcomb, J. B., Leger, J. S., Ziccardi, M. H., 2009. Fishing gear–related injury in California marine wildlife. Journal of Wildlife Diseases, 45(2), 355-362.

Daugherty, M. Adsorption of organic pollutants to microplastics: The effects of dissolved organic matter.

Duan, X. Y., Li, Y. X., Li, X. G., Zhang, D. H., Gao, Y., 2014. Alkylphenols in surface sediments of the Yellow Sea and East China Sea inner shelf: occurrence, distribution and fate. Chemosphere, 107, 265-273.

David, A., Fenet, H., Gomez, E., 2009. Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations. Mar. Pollut. Bull. 58(7), 953-960.

De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., Robbens, J., 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. Marine pollution bulletin, 85, 146–155.

Dehaut, A., Cassone, A.L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul-Pont, I., 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. Environmental Pollution, 215, 223–233.

Dekiff, J.H., Remy, D., Klasmeier, J., Fries, E., 2014. Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney. Environmental Pollution, 186, 248–256.

Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. Marine pollution bulletin, 44, 842–852.

Desforges, J.P.W., Galbraith, M., Dangerfield, N., Ross, P.S., 2014. Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. Marine pollution bulletin, 79, 94–99.

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.

Díaz-Torres, E. R., Ortega-Ortiz, C. D., Silva-Iñiguez, L., Nene-Preciado, A., Orozco, E. T., 2017. Floating Marine Debris in waters of the Mexican Central Pacific. Marine pollution bulletin, 115(1-2), 225–232.

Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., Tassin, B., 2015a. Microplastic contamination in a urban area: a case study in Greater Paris. Environmental Chemistry, 12, 592-599.

Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B., Laforsch, C., 2015b. Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles. Environmental Chemistry, 12(5), 539-550.

Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., Tassin, B., 2016. Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? Marine pollution bulletin, 104(1-2), 290-293.

Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environmental Sciences Europe, 28(1), 2.

Dupuy C, Le Gall S, Hartmann, H.J., Beret, M., 1999. Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in Frech Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. Marine Ecology Progress Series 177, 165–175.

ECHA (European Chemicals Agency), 2008. Support document for identification of hexabromocyclododecane (HBCDD) and all major diastereisomers identified as a substance of very high concern.

ECHA (European Chemicals Agency), 2014. Committee for risk assessment. Opinion on an annex XV dossier proposing restrictions on Nonylphenol and Nonylphenol ethoxylates.

EFSA, 2011. Scientific opinion on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in food. Efsa Journal, 9(5), 2156.

Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C. A., Nielsen, T. G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics \geq 10 µm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Marine Pollution Bulletin 100(1), 70-81.

Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H. et al., 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. Marine pollution bulletin, 50(10), 1103-1114.

Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., Christie-Oleza, J. A., 2017. Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 μ m) in Environmental Samples. Environmental science & technology, 51(23), 13641-13648.

Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Marine pollution bulletin, 68, 71–76.

Eriksen M, Lebreton LCM, Carson HS, Thiel M, Moore CJ, et al. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. PLoS ONE 9(12): e111913.

Esiukova, E., 2017. Plastic pollution on the Baltic beaches of Kaliningrad region, Russia. Marine pollution bulletin, 114(2), 1072-1080.

European Bioplastics, 2016. Bioplastic market data report – Global production capacities of bioplastics 2016 – 2021.

Farrington J.W., Tripp B.W., States. U., 1995. International Mussel Watch Project: initial implementation phase, final report. U.S. Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, Office of Ocean Resources Conservation and Assessment, Silver Spring, Md. 22 p.

Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). Environmental Pollution, 177, 1–3.

Fendall, L. S., Sewell, M. A., 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. Marine pollution bulletin, 58(8), 1225-1228.

Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2000. Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography electrospray mass spectrometry. Analytical Chemistry 72, 4322-4330.

Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2001. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. Environmental Science and Technology 35, 2428-2435.

Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, A.P., Funari, E., 2001. Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). Environmental Science and Technology 35, 3109-3112.

Fisner, M., Taniguchi, S., Majer, A. P., Bícego, M. C., Turra, A., 2013. Concentration and composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets: implications for small-scale diagnostic and environmental monitoring. Marine pollution bulletin, 76(1-2), 349-354.

Fisner, M., Majer, A., Taniguchi, S., Bícego, M., Turra, A., Gorman, D., 2017. Colour spectrum and resin-type determine the concentration and composition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets. Marine pollution bulletin, 122(1-2), 323-330.

Floren, H. P., Shugart, G. W., 2017. Plastic in Cassin's Auklets (*Ptychoramphus aleuticus*) from the 2014 stranding on the Northeast Pacific Coast. Marine pollution bulletin, 117(1-2), 496-498.

Foekema, E.M., De Gruijter, C., Mergia, M.T., van Franeker, J.A., Murk, A.J., Koelmans, A.A., 2013. Plastics in North Sea fish. Environmental Science & Technology, 47, 8818–8824.

Fok, L., Cheung, P. K., Tang, G., Li, W. C., 2017. Size distribution of stranded small plastic debris on the coast of Guangdong, South China. Environmental Pollution, 220, 407-412.

Fossi, M. C., Marsili, L., Baini, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., et al., 2016. Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. Environmental Pollution, 209, 68-78.

Fowler, C. W. 1987. Marine debris and northern fur seals: a case study. Marine pollution bulletin, 18(6), 326-335.

FranceAgriMer, Juillet-2016. Données et bilans : Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2015.

Free, C.M., Jensen, O.P., Mason. S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. Highlevels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. Marine pollution bulletin, 85, 156-163.

Frère, L., Paul-Pont, I., Moreau, J., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., Rinnert, E., 2016. A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 461-468.

Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffre, J., Bihannic, I., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., 2017. Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: A case study of the Bay of Brest (Brittany, France). Environmental Pollution, 225, 211-222.
Fries, E., Dekiff, J. H., Willmeyer, J., Nuelle, M. T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. Environmental Science: Processes & Impacts, 15(10), 1949-1956.

Froehner, S., Machado, K. S., Stefan, E., Bleninger, T., Da Rosa, E. C., de Castro Martins, C., 2012. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. Marine pollution bulletin, 64(1), 75-79.

Fry, D. M., Fefer, S. I., Sileo, L., 1987. Ingestion of plastic debris by *Laysan albatrosses* and *wedge-tailed* shearwaters in the Hawaiian Islands. Marine pollution bulletin, 18(6), 339-343.

Fudalewska, W.D., Normant-Saremba, M., Anastácio, P., 2016. Occurrence of plastic debris in the stomach of the invasive crab *Eriocheir sinensis*. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 306-311.

Furtado, R., Menezes, D., Santos, C. J., Catry, P., 2016. White-faced storm-petrels *Pelagodroma marina* predated by gulls as biological monitors of plastic pollution in the pelagic subtropical Northeast Atlantic. Marine pollution bulletin, 112(1-2), 117-122.

Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. Marine pollution bulletin, 92, 170–179.

Gauquie, J., Devriese, L., Robbens, J., De Witte, B., 2015. A qualitative screening and quantitative measurement of organic contaminants on different types of marine plastic debris. Chemosphere, 138, 348-356.

Gajšt, T., Bizjak, T., Palatinus, A., Liubartseva, S., Kržan, A., 2016. Sea surface microplastics in Slovenian part of the Northern Adriatic. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 392-399.

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R. C., VanFraneker, J., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J.M., Palatinus, A., Matiddi, M., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, H. & Liebezeit, G., 2013. Guidance on monitoring of marine litter in European seas. EUR – Scientific and Technical Research series-ISSN 1831-9424 (online), Luxembourg Publications Office of the European Union, eds. Hanke G, Werner S, Galgani F, Veiga JM, Ferreira M., (ISBN: 978-92-79-32709-4).

Gasperi, J., Dris, R., Mirande-Bret, C., Mandin, C., Langlois, V., Tassin, B., 2015. First overview of microplastics in indoor and outdoor air. In: 15th EuCheMS International conference on Chemistry and Environment.

GESAMP, 2016. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment (GESAMP).

Gewert, B., Ogonowski, M., Barth, A., MacLeod, M., 2017. Abundance and composition of near surface microplastics and plastic debris in the Stockholm Archipelago, Baltic Sea. Marine pollution bulletin, 120(1-2), 292–302.

Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science advances, 3(7), e1700782.

Gigault, J., Ter Halle, A., Baudrimont, M., Pascal, P. Y., Gauffre, F., Phi, T. L. et al., 2018. Current opinion: What is a nanoplastic? Environmental Pollution, (article in press).

Goedecke, C., Mülow-Stollin, U., Hering, S., Richter, J., Piechotta, C., Paul, A., Braun, U., 2017). A first pilot study on the sorption of environmental pollutants on various microplastic materials. Journal of Environmental Analytical Chemistry, 4(191), 2.

Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. Biology Letters, 8, 817–820.

Goldstein, M.C., Titmus, A.J., Ford, M., 2013. Scales of spatial heterogeneity of plastic marine debris in the Northeast Pacific Ocean. PLOS ONE DOI: 10.1371/journal.pone.0080020.

Good, T. P., June, J. A., Etnier, M. A., Broadhurst, G., 2010. Derelict fishing nets in Puget Sound and the Northwest Straits: Patterns and threats to marine fauna. Marine pollution bulletin, 60(1), 39-50.

Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., Hodges, G., 2011. A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. Environmental Science & Technology, 45(4), 1466-1472.

Gouin, T., Avalos, J., Brunning, I., Brzuska, K., de Graaf, J., Kaumanns, J., et al., 2015. Use of micro-plastic beads in cosmetic products in Europe and their estimated emissions to the North Sea environment. SOFW J, 141(4).

Graca, B., Szewc, K., Zakarzewska, D., Dolega, A., Szczerbowska-Boruchowska, M., 2017. Sources and fate of microplastics in marine and beach sediments of the Southern Baltic Sea – a preliminary study. Environmental Science and Pollution Research, 24(8), 7650 - 7661.

Graham, E.R., Thompson, J.T., 2009. Deposit- and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 368, 22–29.

Gregory, M.R., 1977. Plastic pellets on New Zealand beaches. Marine pollution bulletin, 8, 82-84.

Gregory, M.R., 1983. Virgin plastic granules on some beaches of Eastern Canada and Bermuda. Marine Environmental Research, 10, 73–92.

Guerranti, C., Cannas, S., Scopetani, C., Fastelli, P., Cincinelli, A., Renzi, M., 2017. Plastic litter in aquatic environments of Maremma Regional Park (Tyrrhenian Sea, Italy): Contribution by the Ombrone river and levels in marine sediments. Marine pollution bulletin, 117, 366-370.

Gündoğdu, S., Çevik, C., 2017. Micro-and mesoplastics in Northeast Levantine coast of Turkey: The preliminary results from surface samples. Marine pollution bulletin, 118(1-2), 341-347.

Günther, K., Durbeck, H.W., Kleist, E., Thiele, B., Prast, H., Schwuger, M., 2001. Endocrinedisrupting nonylphenolsultra – trace analysis and time-dependent trend in mussels from the German bight. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 371, 782-786.

Guven, O., Bach, L., Munk, P., Dinh, K. V., Mariani, P., Nielsen, T. G., 2018. Microplastic does not magnify the acute effect of PAH pyrene on predatory performance of a tropical fish (*Lates calcarifer*). Aquatic Toxicology, 198, 287-293.

Hanvey, J.S., Lewis, P.J., Lavers, J.L., Crosbie, N.D., Pozo, K., Clarke, O., 2017. A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. Analytical Methods. 9, 1369.

Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, B., Theobald, N., 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. Chemosphere 45, 245-259.

Heskett, M., Takada, H., Yamashita, R., Yuyama, M., Ito, M., Geok, Y. B., et al., 2012. Measurement of persistent organic pollutants (POPs) in plastic resin pellets from remote islands: Toward establishment of background concentrations for International Pellet Watch. Marine pollution bulletin, 64(2), 445-448.

Hidalgo-Ruz, V., Gutow. L., Thompson. L.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. Environmental Science & Technology, 46, 3060–3075.

Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., et al., 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. Marine pollution bulletin, 62(8), 1683-1692.

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 2115-2126.

https://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/estradiol, consulté le 03 mai 2018.

https://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethinyl_estradiol, consulté le 03 mai 2018.

Huerta Lwanga, E., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salanki, T., Van de Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A.A., Geissen, V., 2016. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). Environmental Science & Technology, 50, 2685-2691.

Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R., Laforsch, C., 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. Current. Biology, 23, 867-868.

Imhof, H. K., Sigl, R., Brauer, E., Feyl, S., Giesemann, P., Klink, S., et al., 2017. Spatial and temporal variation of macro-, meso-and microplastic abundance on a remote coral island of the Maldives, Indian Ocean. Marine pollution bulletin, 116(1-2), 340-347.

INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques), 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France – Hexabromocyclododecane (HBCDD), 51 p.

Ismail, N. A. H., Wee, S. Y., Aris, A. Z., 2018. Bisphenol A and alkylphenols concentrations in selected mariculture fish species from Pulau Kukup, Johor, Malaysia. Marine Pollution Bulletin, 127, 536-540.

Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, A., Takada, H., 2001. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. Environmental Science and Technology 35, 1041-1049.

Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K.O., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. Environmental Monitoring Assessment 135, 423-440.

Isobe, A., Kubo, K., Tamura, Y., Nakashima, E., Fujii, N., 2014. Selective transport of microplastics and mesoplastics by drifting in coastal waters. Marine pollution bulletin, 89(1-2), 324-330.

Ivleva, N. P., Wiesheu, A. C., Niessner, R., 2017. Microplastic in aquatic ecosystems. Angewandte Chemie International Edition, 56(7), 1720-1739.

Jabeen, K., Su, L., Li, J., Yang, D., Tong, C., Mu, J., Shi, H., 2017. Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. Environmental Pollution, 221, 141-149.

Jacobsen, J. K., Massey, L., Gulland, F., 2010. Fatal ingestion of floating net debris by two sperm whales (*Physeter macrocephalus*). Marine pollution bulletin, 60(5), 765-767.

Jang, M., Shim, W. J., Han, G. M., Rani, M., Song, Y. K., Hong, S. H., 2017. Widespread detection of a brominated flame retardant, hexabromocyclododecane, in expanded polystyrene marine debris and microplastics from South Korea and the Asia-Pacific coastal region. Environmental Pollution, 231, 785-794.

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., et al., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science, 347, 768–771.

Jonkers, N., Laane, R.W., De Voogt, P., 2003. Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two Dutch estuaries: evidence of biodegradation in the field. Environmental Science and Technology 37, 321-327.

Kannan, N., Yamashita, N., Petrick, G., Duinker, J.C., 1998. Polychlorinated biphenyls and nonylphenols in the Sea of Japan. Environmental Science and Technology 32, 1747-1753.

Karapanagioti, H. K., Endo, S., Ogata, Y., Takada, H., 2011. Diffuse pollution by persistent organic pollutants as measured in plastic pellets sampled from various beaches in Greece. Marine pollution bulletin, 62(2), 312-317.

Karapanagioti, H. K., Klontza, I., 2008. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesvos island beaches (Greece). Marine environmental research, 65(4), 283-290.

Kanhai, L.D.K., Officer, R., Lyashevska, O., Thompson, R. C., O'Connor, I., 2017. Microplastic abundance, distribution and composition along a latitudinal gradient in the Atlantic Ocean. Marine pollution bulletin, 115(1-2), 307-314.

Kappler, A., Fisher, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K.J., Voit, B., 2016. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408(29), 8377-8391.

Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. B., Salamatinia, B., 2017. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. Science of the Total Environment. 578, 485-494.

Karlsson, T. M., Vethaak, A. D., Almroth, B. C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., Leslie, H. A., 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: method development and microplastic accumulation. Marine pollution bulletin, 122(1-2), 403-408.

Khim, J.S., Kannan, K., Villeneuve, D.L., Koh, C.H., Giesy, J.P., 1999. Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea. 1. Instrument analysis. Environmental Science and Technology 33, 4199-4205.

Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., Janssen, C. R., 2016. Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. Environmental science & technology, 50(7), 3315-3326.

Kosuth, M., Mason, S. A., Wattenberg, E. V., 2018. Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. PloS one, 13(4), e0194970.

Kunststoffe International, - PVC, 10/2016.

Kunz, A., Walther, B. A., Löwemark, L., Lee, Y. C., 2017. Distribution and quantity of microplastic on sandy beaches along the northern coast of Taiwan. Marine pollution bulletin, 111(1-2), 126-135.

Kurihara, R., Watanabe, E., Ueda, Y., Kakuno, A., Fujii, K., Shiraishi, F., Hashimoto, S., 2007. Estrogenic activity in sediments contaminated by nonylphenol in Tokyo Bay (Japan) evaluated by vitellogenin induction in male mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). Marine Pollution Bulletin 54, 1315-1320.

Kuriyama, S. N., Wanner, A., Fidalgo-Neto, A. A., Talsness, C. E., Koerner, W., Chahoud, I., 2007. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: tissue distribution and thyroid hormone levels. Toxicology, 242(1-3), 80-90.

Laist, D.W., 1987. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. Marine pollution bulletin, 18, 319–326.

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 (pp. 99-139). Springer, New York, NY.

Law, K.L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N.A., Proskurowski, G., Peacock, E.E., Hafner, J., Reddy, C.M., 2010. Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. Science, 329, 1185–1188.

Law, K. L., 2017. Plastics in the marine environment. Annual review of marine science, 9, 205-229.

Lazure, P., Desmare, S., 2012. Caractéristiques et état écologique. Golfe de Gascogne. Etat physique et chimique. Caractéristiques physiques. Courantologie. EI2012, 9.

Le, D. Q., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Hosoda, J., Tuyet, D. A., 2016. Temporal and spatial changes in persistent organic pollutants in Vietnamese coastal waters detected from plastic resin pellets. Marine pollution bulletin, 109(1), 320-324.

Leslie, H.A., Brandsma, S.H., Van Velzen, M.J.M., Vethaak, A.D., 2017. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. Environment International. 101, 133-142.

Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N., 2008. Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. Chemosphere 71, 1162-1172.

Li, J., Yang, D., Li, L., Shi, H., 2015. Microplastics in commercial bivalves from china. Environmental Pollution, 207, 190–195.

Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D., Shi, H., 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. Environmental Pollution, 214, 177–184.

Liboiron, M., Liboiron, F., Wells, E., Richard, N., Zahara, A., Mather, C. et al., 2016. Low plastic ingestion rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from Newfoundland destined for human consumption collected through citizen science methods. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 428-437.

Liebezeit, G., Dubaish, F., 2012. Microplastics in beaches of East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 89, 213-217.

Ling, S. D., Sinclair, M., Levi, C. J., Reeves, S. E., Edgar, G. J., 2017. Ubiquity of microplastics in coastal seafloor sediments. Marine pollution bulletin, 121(1-2), 104-110.

Loder MGJ, Kuczera M, Mintenig S, Lorenz C, Gerdts G (2015) Focal plane arraydetectorbased micro-fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples. Environmental Chemistry 12, 563-581.

Lots, F. A., Behrens, P., Vijver, M. G., Horton, A. A., Bosker, T., 2017. A large-scale investigation of microplastic contamination: Abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment. Marine pollution bulletin, 123(1-2), 219-226.

Lozoya, J. P., de Mello, F. T., Carrizo, D., Weinstein, F., Olivera, Y., Cedrés, F., et al., 2016. Plastics and microplastics on recreational beaches in Punta del Este (Uruguay): Unseen critical residents? Environmental Pollution, 218, 931-941.

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

Lussier, S. M., Champlin, D., LiVolsi, J., Poucher, S., Pruell, R. J., 2000. Acute toxicity of para-nonylphenol to saltwater animals. Environmental Toxicology and Chemistry, 19(3), 617-621.

Madigou, T., Le Goff, P., Salbert, G., Cravedi, J. P., Segner, H., Pakdel, F., Valotaire, Y., 2001. Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquatic toxicology, 53(3-4), 173-186.

Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., Mayes, A.G., 2017a. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Scientific Reports. 7, 44501.

Maes, T., Van der Meulen, M. D., Devriese, L. I., Leslie, H. A., Huvet, A., Frère, L., et al., 2017b. Microplastics baseline surveys at the water surface and in sediments of the North-East Atlantic. Frontiers in Marine Science, 4, 135.

Marin, M. G., Rigato, S., Ricciardi, F., Matozzo, V., 2008. Lethal and estrogenic effects of 4nonylphenol in the cockle Cerastoderma glaucum. Marine pollution bulletin, 57(6-12), 552-558.

Martins, J., Sobral, P., 2011. Plastic marine debris on the Portuguese coastline: A matter of size? Marine pollution bulletin, 62, 2649-2653.

Mason, S. A., Welch, V., & Neratko, J., 2018. Synthetic polymer contamination in bottled water. State University of New York at Fredonia. WHo Report.

Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Marine pollution bulletin, 81, 69–79.

Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T., 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. Environmental science & technology, 35(2), 318-324.

Mato, Y., Takada, H., Zakaria, M.P., Kuriyama, Y., Kanehiro, H., 2002. Toxic chemicals contained in plastic resin pellets in the marine environment-spatial difference in pollutant concentrations and the effects of resin type. Kankyo Kagakukaishi 15, 415–423.

Matsuguma, Y., Takada, H., Kumata, H., Kanke, H., Sakurai, S., Suzuki, T., Itoh, M., Okazaki, Y., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Weerts, S., Newman, B., 2017. Microplastics in Sediment Cores from Asia and Africa as Indicators of Temporal Trends in Plastic Pollution. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1-10.

Meeker, J.D., Sathyanarayana, S., Swan, S.H., 2009 Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 2097–2113.

Meeker, J. D., Calafat, A. M., Hauser, R. 2009b. Urinary bisphenol A concentrations in relation to serum thyroid and reproductive hormone levels in men from an infertility clinic. Environmental science & technology, 44(4), 1458-1463.

Melzer, D., Harries, L., Cipelli, R., Henley, W., Money, C., McCormack, P., et al., 2011. Bisphenol A exposure is associated with in vivo estrogenic gene expression in adults. Environmental health perspectives, 119(12), 1788.

Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, 2018

Mizukawa, K., Takada, H., Ito, M., Geok, Y. B., Hosoda, J., Yamashita, R. et al., 2013. Monitoring of a wide range of organic micropollutants on the Portuguese coast using plastic resin pellets. Marine pollution bulletin, 70(1-2), 296-302.

Moore, C.J., Moore, S.L., Leecaster, M.K., Weisberg, S.B., 2001. A comparison of plastic and plankton in the north Pacific central gyre. Marine pollution bulletin, 42, 1297–1300.

Moore, E., Lyday, S., Roletto, J., Litle, K., Parrish, J. K., Nevins, H. et al., 2009. Entanglements of marine mammals and seabirds in central California and the north-west coast of the United States 2001–2005. Marine pollution bulletin, 58(7), 1045-1051.

Moreira, F. T., Balthazar-Silva, D., Barbosa, L., Turra, A., 2016. Revealing accumulation zones of plastic pellets in sandy beaches. Environmental Pollution, 218, 313-321.

Murphy, F., Russell, M., Ewins, C., Quinn, B., 2017. The uptake of macroplastic & microplastic by demersal & pelagic fish in the Northeast Atlantic around Scotland. Marine pollution bulletin, 122(1-2), 353-359.

Nadal, M. A., Alomar, C., Deudero, S., 2016. High levels of microplastic ingestion by the semipelagic fish *bogue Boops boops* (L.) around the Balearic Islands. Environmental Pollution, 214, 517-523.

Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. Marine pollution bulletin, 99(1-2), 178-185.

Nel, H.A., Froneman, P.W., 2015. A quantitative analysis of microplastic pollution along the south-eastern coastline of South Africa. Marine pollution bulletin, 101, 274-279.

Ng, K L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. Marine pollution bulletin, 52, 761–767.

NTP (National toxicology program), 1995. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Diethylphthalate (CAS No. 84-66-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Dermal Studies) with Dermal Initiation/Promotion Study of Diethylphthalate and Dimethylphthalate (CAS No. 131-11-3) in Male Swiss CD-1 Mice.

NTP (National Toxicology Program), 2006. Toxicology and carcinogenesis studies of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (CAS No. 1746-01-6) in female Harlan Sprague-Dawley rats (Gavage Studies).

NTP-CERHR, 2000. NTP-CERHR expert panel report on di(2-ethylhexyl) phthalate. NTP-CERHR-DEHP.

NTP-CERHR, 2005. Expert panel re-evaluation of DEHP. Meeting summary, 2005.

Nuelle, M.T., Dekiff, J.H., Remy, D., Fries, E., 2014. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. Environmental Pollution, 184, 161-169.

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 2047–2062.

Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., et al., 2009. International Pellet Watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. Marine pollution bulletin, 58(10), 1437-1446.

Oliveira, M., Ribeiro, A., Hylland, K., Guilhermino, L., 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0b group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). Ecological Indicators 34, 641-647.

PAGEV 2016. World and Turkish plastic industry report.

Pant, J., Deshpande, S. B., 2012. Acute toxicity of Bisphenol A in rats. Indian Journal of Experimental Biology, 50, 425-429.

Peng, G., Zhu, B., Yang, D., Su, L., Shi, H., Li, D., 2017. Microplastics in sediments of the Changjiang Estuary, China. Environmental Pollution, 225, 283-290.

Petrovic, M., Fernandez-Alba, A.R., Borrull, F., Marce, R.M., Gonzalez, M.E., Barcelo, D., 2002. Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and linear alkylbenzene sulfonates in coastal waters and sediments in Spain. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 37-46.

PlasticsEurope, 2014. Plastics – the Facts 2014: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

PlasticsEurope, 2015. Plastics – the Facts 2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

PlasticsEurope, 2016. Plastics – the Facts 2016: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

PlasticsEurope, 2017. Plastics – the Facts 2017: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Pham, C. K., Gomes-Pereira, J. N., Isidro, E. J., Santos, R. S., Morato, T., 2013. Abundance of litter on Condor seamount (Azores, Portugal, Northeast Atlantic). Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 98, 204-208.

Pham, C. K., Rodríguez, Y., Dauphin, A., Carriço, R., Frias, J. P., Vandeperre, et al., 2017. Plastic ingestion in oceanic-stage loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) off the North Atlantic subtropical gyre. Marine pollution bulletin, 121(1-2), 222-229.

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environmental Pollution, 211, 111–123.

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, A., Poirier, L., Lagarde, F., 2018. Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol set-up and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. Environmental Science and Pollution Research, 25, 6135-6144.

Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018b. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? Marine pollution bulletin, 129, 664-674.

Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. Environment International, 33(7), 929-936.

Preda, M., Cox, M. E., 2005. Chemical and mineralogical composition of marine sediments, and relation to their source and transport, Gulf of Carpentaria, Northern Australia. Journal of Marine Systems, 53(1-4), 169-186.

Rapport d'Ifremer décembre, 2017. Evaluation 2018 de l'état écologique de la DCSMM pour le descripteur 10. Indicateur microplastiques en Golfe de Gascogne.

Reddy, M.S., Basha, S., Adimurthy, S., Ramachandraiah, G., 2006. Description of the small plastics fragments in marine sediments along the Alang-Sosiya ship-breaking yard, India. Estuarine Coastal and Shelf Science, 68, 656–660.

Reisser, J., Slat, B., Noble, K., Du Plessis, K., Epp, M., Proietti, M., et al., 2015. The vertical distribution of buoyant plastics at sea: an observational study in the North Atlantic Gyre. Biogeosciences, 12(4), 1249.

Retama, I., Jonathan, M. P., Shruti, V. C., Velumani, S., Sarkar, S. K., Roy, P. D., Rodríguez-Espinosa, P. F., 2016. Microplastics in tourist beaches of Huatulco Bay, Pacific coast of southern Mexico. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 530-535.

Ricciardi, F., Matozzo, V., Marin, M. G., 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. Marine pollution bulletin, 57(6-12), 365-372.

Rice, D. C., Reeve, E. A., Herlihy, A., Zoeller, R. T., Thompson, W. D., Markowski, V. P., 2007. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. Neurotoxicology and teratology, 29(4), 511-520.

Richardson, V. M., Szabo, D. T., Ross, D. G., Diliberto, J. J., Kodavanti, P. R., Birnbaum, L. S., 2008. Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups. Toxicological sciences, 107(1), 27-39.

Rillig, M. C. Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil? Environmental Science & Technology, 2012, 46, 6453-6454.

Rios, L. M., Moore, C., Jones, P. R., 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. Marine pollution bulletin, 54(8), 1230-1237.

Rios, L. M., Jones, P. R., Moore, C., Narayan, U. V., 2010. Quantitation of persistent organic pollutants adsorbed on plastic debris from the Northern Pacific Gyre's "eastern garbage patch". Journal of Environmental Monitoring, 12(12), 2226-2236.

Rios Mendoza, L. M., Jones, P. R., 2015. Characterisation of microplastics and toxic chemicals extracted from microplastic samples from the North Pacific Gyre. Environmental Chemistry, 12(5), 611-617.

RNO, 2006. Surveillance du Milieu Marin, Travaux du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER).

Rochman CM, Hoh E, Hentschel B, Kaye S. 2013b. Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. Environmental Science & Technology, 47, 1646–54.

Rochman CM, Hoh E, Kurobe T, Teh SJ. 2013c. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. Scientific Reports, 3, 3263.

Rochman, C. M., 2015. The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment. In Marine anthropogenic litter (pp. 117-140). Springer International Publishing.

Rochman, C. M., Kross, S. M., Armstrong, J. B., Bogan, M. T., Darling, E. S., Green, S. J. et al., 2015a. Scientific evidence supports a ban on microbeads.

Rudduck, O. A., Lavers, J. L., Fischer, A. M., Stuckenbrock, S., Sharp, P. B., Banati, R. B., 2017. Inter-annual variation in the density of anthropogenic debris in the Tasman Sea. Marine pollution bulletin, 124(1), 51-55.

Russell, J. R., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A. G., Dantzler, K. W., et al., 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. Applied and environmental microbiology, 77(17), 6076-6084.

Ryan, P.G., Moore, C.J., van Franeker, J.A., Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 1999–2012.

Saal, V. F. S., Nagel, S. C., Coe, B. L., Angle, B. M., Taylor, J. A., 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. Molecular and cellular endocrinology, 354(1-2), 74-84.

Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Viñas, L., Besada, V., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2016. Occurrence of alkylphenols and bisphenol A in wild mussel samples from the Spanish Atlantic coast and Bay of Biscay. Marine pollution bulletin, 106(1-2), 360-365.

Santana, M.F.M., Ascer, L.G., Custódio, M.R., Moreira, F.T., Turra, A. 2016. Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: Rapid evaluation through bioassessment. Marine pollution bulletin, 106, 183-189.

Schlenk, D., Sapozhnikova, Y., Irwin, M.A., Xie, L., Hwang, W., Reddy, S., Brownawell, B.J., Armstrong, J., Kelly, M., Montagne, D.E., Kolodziej, E.P., Sedlak, D., Snyder, S., 2005. In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the Southern California Bight, USA, for estrogenic activity. Environmental Toxicology and Chemistry 24, 2820-2826.

Schmidt, N., Thibault, D., Galgani, F., Paluselli, A., Sempéré, R., 2018. Occurrence of microplastics in surface waters of the Gulf of Lion (NW Mediterranean Sea). Progress in Oceanography. doi.org/10.1016/j.pocean.2017.11.010.

Senthil Kumar, K., Sajwan, K.S., Richardson, J.P., Kannan, K., 2008. Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh estuarine Savannah GA, USA. Marine Pollution Bulletin 56, 136-149.

Singh, S. P., Azua, A., Chaudhary, A., Khan, S., Willett, K. L., Gardinali, P. R., 2010. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. Ecotoxicology, 19(2), 338-350.

Sivaram, S. 2017. The Ziegler Catalysts. Resonance, 22(11), 985-1006.

Steer, M., Cole, M., Thompson, R. C., Lindeque, P. K., 2017. Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. Environmental Pollution, 226, 250–259.

Staniszewska, M., Koniecko, I., Falkowska, L., Krzymyk, E., 2015. Occurrence and distribution of bisphenol A and alkylphenols in the water of the gulf of Gdansk (Southern Baltic). Marine pollution bulletin, 91(1), 372-379.

Statista, 2018. La consummation de bière en France. https://fr.statista.com/etude/39399/consommation-francaise-de-biere-dossier-statista/

Statista, 2018. Global plastic production from 1950 to 2016. https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/

Stolte, A., Forster, S., Gerdts, G., Schubert, H., 2015. Microplastic concentrations in beach sediments along the German Baltic coast. Marine pollution bulletin, 99, 216-229.

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(1-2), 217-224.

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., et al., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(9), 2430-2435.

Sutton, R., Mason, S. A., Stanek, S. K., Willis-Norton, E., Wren, I. F., Box, C., 2016. Microplastic contamination in the San Francisco Bay, California, USA. Marine pollution bulletin, 109(1), 230-235.

Syakti, A. D., Bouhroum, R., Hidayati, N. V., Koenawan, C. J., Boulkamh, A., Sulistyo, I., 2017. Beach macro-litter monitoring and floating microplastic in a coastal area of Indonesia. Marine pollution bulletin, 122(1-2), 217-225.

Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., 2009 Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 2079–2096.

Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.A., Watanuki, Y., 2013. Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. Marine pollution bulletin, 69, 219–222.

Taniguchi, S., Colabuono, F. I., Dias, P. S., Oliveira, R., Fisner, M., Turra, A., et al., 2016. Spatial variability in persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons found in beach-stranded pellets along the coast of the state of São Paulo, southeastern Brazil. Marine pollution bulletin, 106(1-2), 87-94.

Tato, T., Salgueiro-González, N., León, V. M., González, S., Beiras, R., 2018. Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan, and 4-nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis, Paracentrotus lividus*, and *Acartia clausi*). Environmental Pollution, 232, 173-182.

Ter Halle, A., Jeanneau, L., Martignac, M., Jardé, E., Pedrono, B., Brach, L., Gigault, J., 2017. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. Environmental Science & Technology, 51(23), 13689-13697. Terepocki, A. K., Brush, A. T., Kleine, L. U., Shugart, G. W., Hodum, P., 2017. Size and dynamics of microplastic in gastrointestinal tracts of Northern Fulmars (*Fulmarus glacialis*) and Sooty Shearwaters (*Ardenna grisea*). Marine pollution bulletin, 116(1-2), 143-150.

Teuten, E.L., Rowland, S.J., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2007. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. Environmental Science & Technology, 41, 7759–7764.

Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H., 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 2027–2045.

Thèse Laura Frère., 2017. Les microplastiques: une menace en rade de Brest?

Thompson, R.C., Olsen, Y., Mitchell, R.P., Davis, A., Rowland, S.J., John, A.W.G., Mc Gonigle, D., Russell, A.E., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? Science, 304, 838.

Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., vom Saal, F.S., 2009. Our plastic age. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 364, 1973–1976.

Torre, M., Digka, N., Anastasopoulou, A., Tsangaris, C., Mytilineou, C., 2016. Anthropogenic microfibres pollution in marine biota. A new and simple methodology to minimize airborne contamination. Marine pollution bulletin, 113(1-2), 55-61.

Trasande, L., Attina, T. M., Blustein, J., 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. Journal of the American Medical Association, 308(11), 1113-1121.

Tsang, Y.Y., Mak, C.W., Liebich, C., Lam, S.W., Sze, E.T.P., Chan, K.M., 2017. Microplastic pollution in the marine waters and sediments of Hong Kong. Marine pollution bulletin, 115, 20-28.

Van, A., Rochman, C. M., Flores, E. M., Hill, K. L., Vargas, E., Vargas, S. A., Hoh, E., 2012. Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. Chemosphere, 86(3), 258-263.

Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environmental Pollution, 193, 65–70.

Van Cauwenberghe, L., Claessens. M., Vandegehuchte. M.B., Janssen, C.R., 2015a. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. Environmental Pollution, 199, 10-17.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C. R., 2015b. Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects. Marine environmental research, 111, 5-17.

Van der Veen, I., de Boer, J., 2012. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. Chemosphere, 88(10), 1119-1153.

Van Franeker, J. A., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., et al., 2011. Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. Environmental Pollution, 159(10), 2609-2615.

Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., et al., 2015. A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. Environmental research, 143, 46-55.

Vélez-Rubio, G. M., Estrades, A., Fallabrino, A., Tomás, J., 2013. Marine turtle threats in Uruguayan waters: insights from 12 years of stranding data. Marine biology, 160(11), 2797-2811.

Vianello, A., Boldrin, A., Guerriero, P., Moschino, V., Rella, R., Sturaro, A., Da Ros, L., 2013. Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: First observations on occurrence, spatial patterns and identification. Estuarine Coastal and Shelf Science, 130, 54– 61.

Vidal-Linan, L., Bellas, J., Salgueiro-Gonzalez, N., Muniategui, S., Beiras, R., 2015. Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gilla. Environmental Pollution, 200, 133-139.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. Environmental Science & Technology, 46, 11327–11335.

Wang, W., Wang, J., 2018. Comparative evaluation of sorption kinetics and isotherms of pyrene onto microplastics. Chemosphere, 193, 567-573.

Welden, N. A., Cowie, P. R., 2016. Environment and gut morphology influence microplastic retention in langoustine, *Nephrops norvegicus*. Environmental Pollution, 214, 859-865.

Winn, J. P., Woodward, B. L., Moore, M. J., Peterson, M. L., Riley, J. G., 2008. Modeling whale entanglement injuries: An experimental study of tissue compliance, line tension, and draw-length. Marine Mammal Science, 24(2), 326-340.

Woodward, B. L., Winn, J. P., Moore, M. J., Peterson, M. L., 2006. Experimental modeling of large whale entanglement injuries. Marine mammal science, 22(2), 299-310.

Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S. 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. Current Biology, 23, 1031–1033.

Wu, C., Zhang, K., Huang, X., Liu, J., 2016. Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris. Environmental Science and Pollution Research, 23(9), 8819-8826.

Xanthos, D., Walker, T. R., 2017. International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): a review. Marine pollution bulletin, 118(1-2), 17-26.

Xie, Z., Lakaschus, S., Ebinghaus, R., Caba, A., Ruck, W., 2006. Atmospheric concentrations and air–sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. Environmental Pollution 142, 170-180.

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., et al., 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). Science, 351(6278), 1196-1199.

Yu, X., Peng, J., Wang, J., Wang, K., Bao, S., 2016. Occurrence of microplastics in the beach sand of the Chinese inner sea: the Bohai Sea. Environmental Pollution, 214, 722-730.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the "Plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. Environmental Science & Technology, 47, 7137–7146.

Zhan, Z., Wang, J., Peng, J., Xie, Q., Huang, Y., Gao, Y., 2016. Sorption of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl by microplastics: A case study of polypropylene. Marine pollution bulletin, 110(1), 559-563.

Zhang, X., Li, Q., Li, G., Wang, Z., Yan, C., 2009. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. Marine pollution bulletin, 58(8), 1210-1216.

Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C., 2011b. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. Archives of environmental contamination and toxicology, 61(1), 93-100.

Zhang, X.; Sühring, R.; Serodio, D.; Bonnell, M.; Sundin, N., Diamond, M. L., 2016. Novel flame retardants: Estimating the physical chemical properties and environmental fate of 94 halogenated and organophosphate PBDE replacements. Chemosphere 2016, 144, 2401-2408.

Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Mu, J., Wang, P., et al., 2017. Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. Environmental Pollution, 231, 541-548.

Ziv-Gal, A., Craig, Z. R., Wang, W., Flaws, J. A., 2013. Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. Reproductive Toxicology, 42, 58-67.

Lot		Prélèvemen	nt	Masse fraîche	Nombre	Concentration
analysé	Site	Туре	Période	des 3 moules (g)	de MP	(MP/g)
1				7,2493	4	0,55
2				8,2511	0	0,00
3			Octobre	7,5594	0	0,00
4				8,2313	1	0,12
5		C		7,9104	3	0,38
6		Sauvage –		6,8416	4	0,58
7				5,4503	3	0,55
8			Mars	5,8274	2	0,34
9				5,7954	1	0,17
10				5,9701	1	0,17
11	Alguillon			7.5613	1	0,13
12				7,1228	4	0,56
13			Octobre	7,2781	0	0,00
14				7,552	4	0,53
15				7,4833	2	0,27
16		Cultivée –		6.1156	1	0.16
17				6.6198	0	0.00
18			Mars	7.1713	1	0.14
19				6.3953	1	0.16
20				7.1422	1	0.14
21				8,2844	0	0.00
22				9,9924	0	0.00
23			Octobre	7,373	1	0.14
24				10.2635	8	0.78
25		a		10.3791	0	0.00
26		Sauvage –		5.6794	0	0.00
27				5.8122	0	0.00
28			Mars	7.8526	2	0.25
29				6.8391	1	0.15
30				5.6348	1	0.18
31	Pen-Bé			11.6765	3	0.26
32				14.2379	4	0.28
33			Octobre	11.5742	2	0.17
34				10,3534	1	0.10
35				11,3979	4	0.35
36		Cultivée –		7.6056	2	0.26
37				10.684	$\frac{-}{2}$	0.19
38			Mars	7.2876	3	0.41
39				6.7457	2	0.30
40				8,9034	3	0.34

Annexe 1: Microplastiques retrouvés dans le	es moules
---	-----------

N°	Caractéristiques des MP					
IN	Matière plastique	Taille (µm)	Couleur			
1	Polypropylène	75 x 75	Grise			
2	Copolymère (PE et PP)	75 x 100	Blanche			
3	Polypropylène	50 x 75	Noire			
4	Polypropylène	50 x 60	Rouge			
5	Polystyrène	50 x 70	Grise			
6	Polyéthylène	50 x 50	Grise			
7	Polyéthylène	60 x 60	Grise			
8	Polyéthylène	50 x 70	Grise			
9	Polyméthacrylate de méthyle	40 x 40	Blanche			
10	Polypropylène	75 x 125	Noire			
11	Polyéthylène	40 x 40	Grise			
12	Polypropylène	50 x 50	Noire			
13	Polypropylène	75 x 400	Grise			
14	Polyéthylène	50 x 75	Grise			
15	Polyéthylène	50 x 50	Grise			
16	Polypropylène	50 x 75	Grise			
17	Polystyrène	50 x 60	Jaune			
18	Polyméthacrylate de méthyle	50 x 50	Blanche			
19	Polyéthylène	50 x 50	Grise			
20	Copolymère (PE et PP)	40 x 40	Rouge			
21	Polyéthylène	40 x 100	Grise			
22	Polypropylène	40 x 200	Grise			
23	Polypropylène	50 x 70	Noire			
24	Copolymère (PE et PP)	50 x 150	Blanche			
25	Polypropylène	45 x 70	Noire			
26	Polypropylène	75 x 80	Noire			
27	Polyéthylène	42 x 39	Grise			
28	Polypropylène	100 x 100	Noire			
29	Polypropylène	40 x 40	Noire			
30	Polyéthylène	100 x 150	Grise			
31	Polypropylène	50 x 50	Grise			
32	Polypropylène	50 x 50	Noire			
33	Polypropylène	50 x 100	Rouge faible			
34	Polyéthylène	80 x 80	Grise			
35	Polypropylène	50 x 50	Jaune			
36	Polypropylène	34 x 50	Grise			
37	Polyéthylène	50 x 70	Grise			
38	Polvéthylène	30 x 70	Grise			
39	Polvéthylène	20 x 63	Grise			
57						

Annexe 2: Caractérisations	des MP	retrouvés dans	les moules	analysées
----------------------------	--------	----------------	------------	-----------

_

41	Polyéthylène	70 x 75	Grise
42	Polyéthylène	47 x 55	Grise
43	Polyéthylène	25 x 100	Grise
44	Polypropylène	25 x 100	Grise
45	Polypropylène	25 x 50	Verte
46	Polypropylène	100 x 150	Rouge
47	Polyéthylène	40 x 60	Noire
48	Polyéthylène	30 x 30	Grise
49	Polypropylène	50 x 50	Grise
50	Acrylonitrile butadiène styrène	30 x 60	Verte
51	Polyéthylène	70 x 75	Grise
52	Polypropylène	40 x 75	Rouge faible
53	Polypropylène	30 x 50	Noire
54	Polypropylène	25 x 100	Grise
55	Polypropylène	30 x 50	Noire
56	Polyéthylène	50 x 50	Grise
57	Polyester	15 x 200	Rouge
58	Polypropylène	50 x 50	Noire
59	Polyéthylène	60 x 60	Grise
60	Polyéthylène	40 x 100	Grise
61	Polyéthylène	30 x 50	Rouge
62	Polyéthylène	60 x 60	Grise
63	Polypropylène	50 x 50	Noire
64	Polypropylène	20 x 20	Verte
65	Copolymère (PE et PP)	25 x 50	Grise
66	Polypropylène	60 x 150	Grise
67	Polyéthylène	75 x 100	Grise
68	Polypropylène	50 x 50	Noire
69	Polystyrène	50 x 50	Blanche
70	Polyéthylène	50 x 70	Grise
71	Polypropylène	30 x 60	Verte
72	Polypropylène	50 x 70	Noire
73	Polypropylène	60 x 100	Violette

Huître		Prélèvement		Masse	Nombre	Concentration
analysée	Site	Type	Période	fraîche (g)	de MP	(MP/g)
1		V I		13,3413	0	0,00
2				11,9449	1	0,08
3			Octobre	12,7448	0	0.00
4				11.1437	1	0.09
5		~		11,2580	1	0.09
6		Sauvage —		14,7933	0	0.00
7				11.5885	$\overset{\circ}{2}$	0.17
8			Mars	20.4425	6	0.29
9			111115	23 5246	2	0.09
10				17.0867	1	0.06
11	Aiguillon			6 9779	0	0.00
12				7 5263	2	0.27
12			Octobre	10 6879	1	0,27
13			Octoble	8 6060	1	0.46
14				6 5 8 9 6	+ 2	0,40
15		Cultivée —		7 2000	1	0,50
10				0.5463	1	0,14
17			More	9,5405	0	0,04
10			Iviais	11,0303	2	0,17
19				14,1/00	4	0,20
20				17,9055	<u> </u>	0,19
21				17,2289	0	0,00
22			Octobre	11,1384	5	0,27
23				10,0228	1	0,09
24				8,3403	1	0,12
25		Sauvage —		9,4940	0	0,00
26		e		9,6462	1	0,10
27				13,6619	3	0,22
28			Mars	12,0797	1	0,08
29				9,7615	1	0,10
30	Pen-Bé			14,6/5/	0	0,00
31				21,5621	l z	0,05
32				23,2492	5	0,22
33			Octobre	24,4523	2	0,08
34				23,5639	3	0,13
35		Cultivée —		15,7799	1	0,06
36				14,8255	1	0,07
37				11,1420	1	0,09
38			Mars	22,3590	1	0,04
39				21,4443	2	0,09
40				12,7165	2	0,16
41				19,7862	6	0,30
42				11,0380	4	0,36
43			Octobre	7,7784	2	0,26
44				8,0320	3	0,37
45	Coupelesse	Sauvago -		10,0620	1	0,10
46	Couperasse	Sauvage -		12,3165	2	0,16
47				12,0108	4	0,33
48			Mars	14,4330	1	0,07
49				17,0676	1	0,06
50				14,9732	4	0,27

Annexe 3: Microplastiques retrouvés dans les huîtres analysées

51			9,2743	4	0,43
52			6,0792	3	0,49
53		Octobre	6,1540	2	0,33
54			9,0157	2	0,22
55	Culting		9,0094	2	0,22
56	Cultivee -		19,5312	1	0,05
57			10,1938	6	0,59
58		Mars	13,8037	3	0,22
59			13,8892	1	0,07
60			17,5923	3	0,17

NO	Caractéristiques						
N°	Matière plastique	Taille (µm)	Couleur				
1	Polyester	50 x 50	Grise				
2	Poly isobutylène	50 x 125	Grise				
3	Polyéthylène	50 x 70	Grise				
4	Acrylonitrile butadiène styrène	32 x 56	Verte				
5	Acrylonitrile butadiène styrène	30 x 46	Verte				
6	Polypropylène	24 x 61	Noire				
7	Polyéthylène	42 x 38	Blue faible				
8	Polyéthylène	40 x 80	Grise				
9	Polypropylène	56 x 97	Grise				
10	Polypropylène	70 x 100	Grise				
11	Polyéthylène	50 x 50	Grise				
12	Polypropylène	70 x 90	Violet faible				
13	Polyéthylène	100 x 100	Grise				
14	Acrylonitrile butadiène styrène	39 x 60	Verte				
15	Polystyrène	50 x 60	Vert faible				
16	Acrylonitrile butadiène styrène	29 x 80	Verte				
17	Polyéthylène	50 x 50	Grise				
18	Polypropylène	50 x 60	Grise				
19	Polyéthylène	100 x 300	Grise				
20	Polyéthylène	150 x 300	Grise				
21	Acrylonitrile butadiène styrène	41 x 117	Vert faible				
22	Polypropylène	60 x 60	Grise				
23	Polyéthylène	60 x 70	Grise				
24	Polyéthylène	50 x 60	Grise				
25	Polyéthylène	50 x 70	Violet faible				
26	Acrylonitrile butadiène styrène	60 x 80	Verte				
27	Polyéthylène	70 x 80	Blanche-violette				
28	Acrylonitrile butadiène styrène	70 x 100	Verte				
29	Polyéthylène	60 x 300	Violet faible				
30	Polypropylène	60 x 90	Jaune faible				
31	Polyéthylène	50 x 300	Violet faible				
32	Acrylonitrile butadiène styrène	50 x 100	Verte				
33	Polyéthylène	60 x 100	Violet faible				
34	Polyéthylène	150 x 150	Violet faible				
35	Polypropylène	50 x 100	Blanc-gris				
36	Copolymère (PE et PP)	60 x 100	Grise				
37	Polypropylène	60 x 80	Blanc-Jaune				
38	Polyéthylène	70 x 90	Grise				
39	Copolymère (PE et PP)	100 x 200	Grise				
40	Polyéthylène	80 x 120	Grise				

Annexe 4: Détail des caractéristiques des MP retrouvés dans les huîtres

41	Polypropylène	47 x 60	Noire
42	Polypropylène	40 x 50	Noire
43	Polypropylène	31 x 50	Noire
44	Polyéthylène	59 x 51	Grise
45	Polyester	20 x 1000	Blue
46	Polypropylène	39 x 42	Grise
47	Polyester	20 x 250	Noire
48	Polypropylène	26 x 50	Verte
49	Polyéthylène	30 x 92	Grise
50	Polyéthylène	115 x 131	Grise
51	Polyéthylène	85 x 103	Grise
52	Polyéthylène	55 x 70	Grise
53	Polyéthylène	56 x 251	Grise
54	Polyéthylène	98 x 78	Grise
55	Polyéthylène	50 x 150	Grise
56	Polyéthylène	50 x 60	Grise
57	Polypropylène	33 x 40	Noire
58	Polyéthylène	57 x 65	Verte
59	Polyéthylène	100 x 250	Grise
60	Polypropylène	50 x 60	Jaune faible
61	Polypropylène	80 x 100	Noire
62	Acrylonitrile butadiène styrène	30 x 70	Verte
63	Polyéthylène	150 x 150	Gris-Violet
64	Polyéthylène	60 x 70	Gris-Violet
65	Polyéthylène	80 x 100	Violet faible
66	Polyéthylène	60 x 70	Grise
67	Polyéthylène	50 x 70	Grise
68	Polypropylène	40 x 60	Verte
69	Polypropylène	50 x 50	Noire
70	Polypropylène	60 x 120	Gris-blanche
71	Polyéthylène	70 x 150	Violet faible
72	Acrylonitrile butadiène styrène	50 x 50	Verte
73	Acrylonitrile butadiène styrène	100 x 100	Verte
74	Acrylonitrile butadiène styrène	77 x 139	Verte
75	Polyéthylène	70 x 70	Violet faible
76	Polyéthylène	50 x 50	Violet faible
77	Acrylonitrile butadiène styrène	40 x 50	Verte
78	Polyéthylène	105 x 82	Violet faible
79	Polyéthylène	70 x 70	Grise
80	Polyéthylène	70 x 80	Grise
81	Polyéthylène	50 x 70	Violet faible
82	Polyéthylène	50 x 50	Violet faible
83	Copolymère (PE et PP)	50 x 400	Violet faible
84	Polypropylène	63 x 77	Grise

85	Polyéthylène	70 x 100	Grise
86	Polypropylène	80 x 80	Vert faible
87	Polypropylène	60 x 100	Grise
88	Copolymère (PE et PP)	40 x 60	Grise
89	Polyéthylène	95 x 121	Grise
90	Polypropylène	60 x 100	Noire
91	Polypropylène	60 x 300	Blanc-gris
92	Polyéthylène	80 x 200	Grise
93	Polyéthylène	100 x 200	Grise
94	Polystyrène	60 x 60	Noire
95	Polyéthylène	50 x 70	Grise
96	Polyéthylène	47 x 82	Grise
97	Copolymère (PE et PP)	50 x 60	Grise
98	Polyéthylène	120 x 150	Violet faible
99	Copolymère (PE et PP)	200 x 200	Violet faible
100	Polyéthylène	70 x 150	Violet faible
101	Polyéthylène	50 x 50	Violet faible
102	Polyester	25 x 200	Grise
103	Polyéthylène	100 x 120	Noire
104	Copolymère (PE et PP)	60 x 60	Violet faible
105	Polypropylène	38 x 43	Noire
106	Polyéthylène	35 x 111	Violet faible
107	Polyéthylène	30 x 50	Grise
108	Polypropylène	25 x 63	Verte
109	Polyéthylène	70 x 150	Violet faible
110	Polypropylène	60 x 120	Grise
111	Acrylonitrile butadiène styrène	28 x 60	Vert faible
112	Acrylonitrile butadiène styrène	30 x 82	Vert faible
113	Acrylonitrile butadiène styrène	50 x 50	Vert faible
114	Polyéthylène	60 x 132	Grise
115	Polyéthylène	50 x 100	Grise
116	Polyéthylène	78 x 185	Violet faible
117	Acrylonitrile butadiène styrène	50 x 120	Verte
118	Polypropylène	60 x 128	Jaune faible
119	Acrylonitrile butadiène styrène	80 x 135	Verte
120	Copolymère (PE et PP)	46 x 97	Violet faible
121	Polyéthylène	34 x 60	Grise
122	Acrylonitrile butadiène styrène	25 x 60	Verte
123	Polyester	20 x 1300	Violet
124	Polypropylène	60 x 70	Noire
125	Copolymère (PE et PP)	70 x 80	Grise
126	Polypropylène	80 x 80	Noire

Sédiment	Prélèv	vement	Masse sèche	Nombre de	Concentration
analysé	Site	Période	<u>(g)</u>	MP	(MP/g)
1			17,6806	0	0,00
2			16,8316	0	0,00
3			15,8921	0	0,00
4			14,2549	2	0,14
5		Ostahas	13,0793	0	0,00
6		Octobre	16,4725	1	0,06
7			16,2407	1	0,06
8			16,4062	0	0,00
9			17,3108	1	0,06
10			16,6000	1	0,06
11	Aiguillon		18,4923	0	0.00
12			16.7703	1	0.06
13			17,5059	0	0.00
14			18 4487	Ő	0.00
15			16 4990	0 0	0,00
16		Mars	13 2804	$\tilde{2}$	0.15
17			15,2004	2	0,15
17			15 0287	1	0,20
10			15,9207	1	0,00
20			15,0070	1	0,07
20			15,0291	1	0,00
21			10,3040	0	0,00
22			15,9729	0	0,00
23			15,5177	5	0,19
24			15,5070	1	0,06
25		Octobre	16,2949	0	0,00
26			16,4169	l	0,06
27			15,0329	0	0,00
28			16,1146	1	0,06
29			15,6143	0	0,00
30	Pen-Ré		16,2547	2	0,12
31			10,1821	1	0,10
32			10,1946	0	0,00
33			11,1603	1	0,09
34			14,7385	1	0,07
35		More	14,8223	1	0,07
36		iviars	13,2808	2	0,15
37			13,3411	0	0,00
38			10,3124	0	0,00
39			12,3054	1	0,08
40			11,0205	1	0,09
41 -			14.3887	1	0.07
42			14,1054	Ō	0.00
43	_ ;		16.1663	$\frac{1}{2}$	0.12
44	Coupelasse	Octobre	14,5746	- 2	0.14
45			16 1745	$\tilde{0}$	0 00
46			13 4553	0	0,00
-1 0			13,7333	U	0,00

Annexe 5: Microplastiques retrouvés dans les sédiments

47		13,1399	1	0,08
48		14,6163	0	0,00
49		13,4774	0	0,00
50		13,6885	2	0,15
51		14,9360	5	0,33
52		17,2304	0	0,00
53		15,1602	2	0,13
54		16,4133	1	0,06
55	Mana	13,1816	0	0,00
56	Mars	17,5956	2	0,11
57		17,2497	0	0,00
58		16,8217	2	0,12
59		16,1147	1	0,06
60		14,8771	3	0,20

	Caractéristiques			
\mathbf{N}°	Matière plastique	Taille (µm)	Couleur	
1	Polyester	25 x 300	Rouge	
2	Polyvinyle pyrrolidone	15 x 2000	Blue	
3	Polyéthylène	60 x 60	Grise	
4	Polypropylène	40 x 50	Violette	
5	Polypropylène	50 x 60	Grise	
6	Polyéthylène	100 x 200	Grise	
7	Polypropylène	150 x 300	Grise	
8	Polystyrène	100 x 300	Grise	
9	Polyéthylène	60 x 60	Grise	
10	Copolymère (PE et PP)	60 x 80	Grise	
11	Polypropylène	50 x 70	Grise	
12	Poly acrylonitrile	20 x 650	Rouge	
13	Acrylonitrile butadiène styrène	60 x 120	Blanche	
14	Polypropylène	60 x 1500	Verte	
15	Polystyrène	80 x 100	Grise	
16	Polychlorure de vinyle	44 x 78	Blanche	
17	Polychlorure de vinyle	47 x 55	Blanche	
18	Polychlorure de vinyle	45 x 60	Blanche	
19	Polyester	80 x 80	Grise	
20	Polychlorure de vinyle	40 x 50	Blanche	
21	Polyéthylène	60 x 100	Grise	
22	Polypropylène	60 x 120	Grise	
23	Polyéthylène	100 x 200	Grise	
24	Polypropylène	24 x 1000	Blanche	
25	Polyester	15 x 87	Blue	
26	Polyéthylène	85 x 80	Verte	
27	Polypropylène	100 x 120	Noire	
28	Polychlorure de vinyle	60 x 150	Grise	
29	Polyéthylène	50 x 120	Grise	
30	Polyéthylène	50 x 70	Grise	
31	Polypropylène	80 x 100	Grise	
32	Polyester	15 x 300	Rose	
33	Polyéthylène	200 x 300	Grise	
34	Polyéthylène	60 x 100	Grise	
35	Polypropylène	100 x 150	Rose	
36	Copolymère (PE et PP)	60 x 150	Rouge	
37	Polyéthylène	20 x 750	Blanche	
38	Polypropylène	70 x 150	Grise	
39	Polypropylène	50 x 52	Grise	
40	Polypropylène	60 x 80	Grise	

Annexe 6: Détail des caractéristiques MP retrouvés dans les sédiments

41	Polypropylène	80 x 80	Grise
42	Polypropylène	50 x 100	Grise
43	Polypropylène	50 x 120	Grise
44	Copolymère (PE et PP)	19 x 800	Noire
45	Polypropylène	100 x 100	Grise
46	Polypropylène	40 x 50	Grise
47	Polystyrène	60 x 200	Grise
48	Polypropylène	60 x 200	Grise
49	Polyéthylène	40 x 150	Verte
50	Polystyrène	70 x 150	Grise
51	Polystyrène	100 x 100	Violette
52	Polyamide	70 x 100	Grise
53	Polypropylène	40 x 40	Jaune
54	Polyéthylène	60 x 60	Grise
55	Polypropylène	70 x 100	Grise


Titre : Développements analytiques pour la caractérisation et la quantification de la contamination en microplastiques des matrices sédimentaires et biologiques : application aux zones conchylicoles des Pays de la Loire

Mots clés : microplastique, moule, huître, sédiment, Golfe de Gascogne, polluant organique, sorption.

Résumé : A l'échelle mondiale, la contamination en microplastiques (particule plastique inférieure à 5 mm) a été évaluée dans tous les compartiments environnementaux avec des concentrations très variables, traduisant des pressions de contamination différentes mais résultant aussi d'un manque de standardisation des méthodes d'échantillonnage, de préparation d'échantillons et d'analyse. Dans ce contexte, cette thèse a visé à développer et valider des protocoles rapides d'analyse qualitative et quantitative de microlastiques dans les matrices sédimentaires et biologiques.

UNIVERSITE SCIENCES

DE LA MER

ET DU LITTORAL

L'application des protocoles ainsi validés a permis de caractériser la contamination en microplastiques de deux espèces de bivalves (la moule bleue *Mytilus edulis* et l'huître creuse *Crassostrea gigas*), cultivés et sauvages, et des sédiments de trois vasières de la côte Atlantique (Pen-Bé, Coupelasse et baie de l'Aiguillon) à deux saisons.

La contamination moyenne a été évaluée à 0.61 ± 0.56 et 2.1 ± 1.7 microplastiques par moule (N=120) et huître (N=60) respectivement. Dans les sédiments, une moyenne de 67 ± 76 microplastiques par kg de poids sec (N=60) a été mesurée. Une majorité de fragments de polyéthylène et de polypropylène a été observée dans les deux matrices avec une différence notable au niveau de la taille des microplastiques détectés : <100 µm pour les bivalves et entre 100 et 250 µm pour les sédiments. Aucun effet significatif sur la contamination du site, de la saison ou du mode de vie des bivalves n'a été mis en évidence. En parallèle, la sorption de six micropolluants détectés dans les eaux marines, a été étudiée en utilisant des microplastiques modèles de polyéthylène et de polypropylène.

Title : Analytical developments for the characterization and quantification of microplastics in sedimentary and biological matrices: application to shellfish growing areas of Pays de la Loire

Keywords: microplastic, mussel, oyster, sediment, Gulf of Gascogne, organic pollutant, sorption.

Abstract: The contamination by microplastics (particle inferior of 5 mm) was evaluated in all environmental compartments around the world with widely varying concentrations. This variability is due to spatial and temporal differences in contamination but also results from the lack of standardization of sampling, sample preparation and analysis methods. In this context, this thesis aimed to develop and validate fast analytical procedures of characterization and quantification of microplastics for sedimentary and biological matrices.

The application of the validated protocols allowed to characterize the microplastic contamination of two bivalve species (the blue mussel *Mytilus edulis* and the pacific oyster *Crassostrea gigas*), wild and cultivated, and the sediments from three mudflats of the Atlantic coast (Pen-Bé, Coupelasse and Aiguillon Bay), at two seasons.

The mean contamination was evaluated at 0.61 ± 0.56 and 2.1 ± 1.7 microplastic per mussel (N=120) and per oyster (N=60) respectively. In sediments, a mean of 67 ± 76 microplastic per kg dry weight (N=60) was measured. A large proportion of polyethylene and polypropylene fragments were observed in both matrices with a notable difference in the size range of detected microplastic: <100 µm for bivalves and between 100 and 250 µm for sediments. No significant effect of site, season or lifestyle for bivalves has been highlighted on microplastic contamination.

In parallel, the sorption of six organic contaminants of marine waters has been studied on model microplastics made of polyethylene and polypropylene.