HAL
open science

Les microplastiques : une menace en rade de Brest ?

Laura Frère

To cite this version:

Laura Frère. Les microplastiques : une menace en rade de Brest ?. Sciences de la Terre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT : 2017BRES0046 . tel-01619349

HAL Id: tel-01619349

https://theses.hal.science/tel-01619349v1

Submitted on 19 Oct 2017

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

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

université de bretagne occidentale

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie Marine

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Laura Frère

Préparée à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO), Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin (LEMAR)

Les microplastiques : une menace en rade de Brest ?

Thèse soutenue le 13 juin 2017

devant le jury composé de :

Stéphane BRUZAUD
Professeur des universités, Université de Bretagne Sud / *Rapporteur*

Bruno TASSIN
Directeur de recherche, École des Ponts ParisTech / *Rapporteur*

Laurent CHAUVAUD
Directeur de recherche, CNRS / *Examinateur*

Alexandra TER HALL
Chargée de recherche, Université Paul Sabatier / *Examinateur*

François GALGANI
Cadre de recherche, Ifremer / *Examinateur*

Arnaud HUVET
Cadre de recherche, Ifremer / *Directeur de thèse*

Membres invités :

Ika PAUL-PONT
Chargée de recherche, CNRS / *Co-directrice de thèse*

Christophe LAMBERT
Ingénieur de recherche, CNRS / *Co-directeur de thèse*

Financements

Ce projet de thèse a été financé par Brest Métropole (BM) et l'Université de Bretagne Occidentale (UBO). Les travaux de recherche ont été menés au sein du Laboratoire des sciences de l'Environnement MARIn (LEMAR) à Plouzané (France). Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de différents programmes de recherche comme le projet européen MICRO (Interreg IVa: MicroPlastics - Is it a threat for the 2 seas Area ?) basé sur la coopération entre la Belgique (ILVO), l'Angleterre (CEFAS), les Pays-Bas (DELTARES) et la France (CNRS et IFREMER), le CRD ANSES « microplastique » (« Les microplastiques dans les produits de la mer »), le projet FUI20 Microplastics (labélisé Pôle Mer et financé par les conseils régionaux Bretagne et PACA, le Conseil Départemental 29, la Communauté d'Agglomération Toulon Provence Méditerranée et Brest Métropole), et le projet ANR CESA (ANR-15-CE34-0006-02) Nanoplastics («Microplastics, nanoplastics in the marine environment: characterization, impacts and sanitary risk assessment »).

Contribution scientifique

Article scientifique en préparation

Frère L., Maignien L., Chalopin M., Rinnert E., Lambert E., Morrison H., Huvet A., Paul-Pont I. and Reveillaud J. Microplastic-associated bacterial communities in the coastal waters of the bay of Brest (Brittany, France). In preparation for a submission in Environ. Sci. Technol.

Articles scientifiques issus du doctorat

Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffré, 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. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.023

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. Mar. Pollut. Bull. 113, 461–468. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.051

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. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.018

Articles scientifiques hors doctorat

Maes, T., Meulen, V. der, D, M., Devriese, L.I., Leslie, H.A., Huvet, A., **Frère, L**., Robbens, J., Vethaak, D.A., 2017. Microplastics baseline surveys at the water surface and in sediments of the North-East Atlantic. Front. Mar. Sci. 4. doi:10.3389/fmars.2017.00135

Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., **Frère, L**., Cassone, A.-L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., Soudant, P., 2016. Exposure of marine mussels Mytilus spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. Environ. Pollut. doi:10.1016/j.envpol.2016.06.039

Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., **Frère, L**., Robbens, J., Vethaak, A.D., 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. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.06.051

Vignet, C., Le Menach, K., Lyphout, L., Guionnet, T., **Frère, L**., Leguay, D., Budzinski, H., Cousin, X., Bégout, M.-L., 2014a. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish--part II: behavior. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 13818–13832. doi:10.1007/s11356-014-2762-6

Vignet, C., Le Menach, K., Mazurais, D., Lucas, J., Perrichon, P., Le Bihanic, F., Devier, M.-H., Lyphout, L., **Frère, L**., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J.-L., Budzinski, H., Cousin, X., 2014b. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish--part I: Survival and growth. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 13804–13817. doi:10.1007/s11356-014-2629-x

Communications orales

Frère L., Paul-Pont I., Lambert C., Rinnert E, Moreau J., Jaffré J., Soudant P., Huvet A., 22-26 May 2016. Microplastics in the Bay of Brest (Brittany, France): composition, abundance and spatial distribution. SETAC Europe 26th Annual Meeting, Nantes, France.

Frère L., Paul-Pont I., Lambert C., Rinnert E, Moreau J., Jaffré J., Soudant P., Huvet A., 25-27 mai 2016. Microplastics in the Bay of Brest (Brittany, France): composition, abundance and spatial distribution. MICRO 2016, Lanzarote (Canaries).

Communications affichées

Frère L., Moreau J., Paul-Pont I., Lambert C., Soudant P., Huvet A., Rinnert E., 25-27 May 2016. Microplastic particles analysis by semi-automated Raman micro-spectroscopy: morphological and chemical characterization. MICRO 2016, Lanzarote (Canaries).

Frère L., Moreau J., Paul-Pont I., Lambert C., Soudant P., Huvet A., Rinnert E., 22-26 May 2016. Microplastic particles analysis by semi-automated Raman micro-spectroscopy: morphological and chemical characterization. SETAC Europe 26th Annual Meeting, Nantes, France.

Frère L., Paul-Pont I., Lambert C., Soudant P., Huvet A., 22-27 February 2015. Micro-plastics: a threat to the Bay of Brest? Aquatic Science Meeting – ASLO, Granada, Spain.

Frère L., Lambert C., Huvet A., 13-15 January 2014. Micro-plastics: a threat to the Bay of Brest? International workshop "Fate and impact of microplastics in marine ecosystems", Plouzané, France.

Vulgarisations scientifiques

Les microplastiques dans l'environnement marin (4 février 2016). Forum des doctorants, Plouzané (France).

Les microplastiques dans l'environnement marin : quels impacts pour les organismes ? (14 janvier 2016). OceanRespect, Brest (France).

Les microplastiques en Rade de Brest : une nouvelle pollution? (4 mai 2015). Café des sciences organisé par l'association Les Petits débrouillards, Brest (France).

Mini talks by mentors on posted posters by Master 1 students about beach and surface water sampling (15 janvier 2014). MICRO, Plouzané (France).

Sensibilisation à la pollution des côtes par les déchets de microplastiques auprès de collégiens (10 décembre 2014). Collège Kerallan (Plouzané) (France).

Sciences participatives

Embarquement en tant que responsable scientifique avec Expéditions MED pour sensibiliser les éco-volontaires à la pollution plastique des océans et leur faire découvrir les moyens analytiques mis en œuvre pour étudier cette pollution (23 juillet - 6 août 2016).

Activités d'enseignement

Travaux dirigés et travaux pratiques (64h par an) en Biologie Animale, Licence 1 de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO) (2014-2016).

Accompagnement d'un groupe interdisciplinaire d'étudiants de Master 2 sur la problématique sociétale de la pollution plastique des océans. 17 septembre - 17 novembre 2015.

Travaux pratiques (10h) « Prélèvement, extraction et quantification des microplastiques dans sable et eau surface », Master 1 « Sciences biologiques marines » (mention Ecophysiologie) de l'IUEM (Université de Bretagne Occidentale) (2013).

Encadrement de stages

Jaffré, J., mars - avril 2015. Identification et quantification des MP présents dans les sédiments collectés en rade de Brest. Diplôme Universitaire, Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Meghar, K., janvier - février, 2015. Mise au point d'une méthode d'analyse des polluants organiques persistants adsorbés sur des microplastiques collectés dans le milieu marin par GC-MS-MS. Master 1, Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Colou, J., avril – juin 2014. Identification et quantification des microplastiques collectés à la surface de l'eau en rade de Brest. Master 1, Université de Pau.

« Savoir que nul chemin ne reste inaccessible

pourvu qu'on rêve un jour de s'envoler vers lui. »

Yves Duteuil (la fleur de l'impossible)

Remerciements

Stéphane Bruzaud (Professeur des universités, Université de Bretagne Sud), Bruno Tassin (Directeur de recherche, École des Ponts ParisTech), Alexandra Ter Hall (Chargée de recherche, Université Paul Sabatier), François Galgani (Cadre de recherche, Ifremer) et Laurent Chauvaud (Directeur de recherche, CNRS) je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche. Merci à tous, votre avis m'est très précieux.

Olivier Ragueneau et Luis Tito de Morais, respectivement ancien et actuel directeur du Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin, Fred Jean, directeur de l'EDSM, et Philippe Soudant et Marianne Alunno-Bruscia, directeurs d'équipe, je vous remercie de m'avoir accueillie pendant ces quatre années au laboratoire. Je remercie également Brest Métropole d'avoir participé au financement de la thèse.

Arnaud Huvet (Directeur de thèse) et Christophe Lambert (Co-directeur de thèse), je vous remercie de m'avoir offert l'opportunité de réaliser un doctorat sur la thématique des microplastiques. Merci à vous de m'avoir permis de m'initier à de nombreuses disciplines et de participer à plusieurs congrès internationaux pour valoriser mes travaux de recherche. Merci également pour vos conseils de rédaction lors de l'écriture des articles scientifiques et du manuscrit de thèse. Ika Paul-Pont (Co-directrice de thèse) ou super ETDD, je t'exprime toute ma reconnaissance pour ce que tu m'as apporté pendant la thèse. Un immense merci à toi d'avoir intégrer ce projet de thèse car sans ta présence, ton soutien, ton dynamisme, ton investissement, ta disponibilité, ton professionnalisme et tes encouragements, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Merci pour ta confiance infaillible, que ce soit sur la qualité de mon travail ou ma capacité à mener cette thèse jusqu'au bout ! Philippe Soudant, je te remercie de t'être assuré que financièrement je ne manque de rien et merci pour tes conseils dans la rédaction des articles scientifiques.

Emmanuel Rinnert, Manu, cette thèse n'aurait pas été possible sans toi ! Un grand merci à toi pour m'avoir initiée à la micro-spectroscopie Raman et merci au LDCM de m'avoir accueillie au cours de ces 4 années de thèse pour réaliser les analyses chimiques de mes microplastiques. Manu, merci pour ta bienveillance, ta bonne humeur et ton humour qui ont rendu le travail dans la salle Raman beaucoup plus agréable ! Et surtout merci pour ta présence, tes conseils et ton écoute qui m'ont beaucoup aidée au cours de cette thèse. Merci également à Jonathan Moreau, Kada Boukerma, Florent Colas, Morgan Tardivel pour votre accueil et votre soutien technique. Enfin, merci à mes supers collègues de bureau d'adoption : Florence Mazeas et Caroline Le Bihan. Merci à vous les filles pour ces supers moments passés ensembles et désolée pour la quantité monstrueuse de bonbons à laquelle je vous ai presque quotidiennement exposées !

Isabelle Bihannic, Thierry Le Bec et Erwan Amice, ainsi que l'équipage de l'Albert Lucas, merci à vous tous de m'avoir aidée à réaliser les différents prélèvements de microplastiques en rade de Brest, dans des conditions pas toujours faciles. Isa, merci pour ta présence, ta joie de vivre et ton énergie sans limite. Merci pour les incroyables moments de bonheurs et de rires passés sur l'Hésione !

Marie Cachera, Marie-Dominique Jezequel, Grégory Charrier et Mathilde Cadier, merci à vous pour ces supers moments partagés lors des enseignements de Diversité Biologique et de Biologie Animale. Merci Marie pour toutes ces discussions passionnantes, surtout celles où l'on refaisait le monde de la recherche pendant des heures, et merci pour cette incroyable course d'obstacles dans la boue !

Fabienne Lagarde, merci beaucoup à toi et au IMMM de m'avoir accueillie à plusieurs reprises au cours de la thèse pour m'initier à la spectroscopie infrarouge. Fabienne, merci beaucoup d'avoir pris le temps de me recevoir pour m'aider à résoudre certaines difficultés analytiques, et d'avoir partagé ton expérience en spectroscopie. Merci pour ta sympathie et ton humour ! Et merci également pour cette magnifique journée touristique à Lanzarote. J'ai passé de supers moments en ta compagnie.

Julien Guyomarc'h et Stéphane Le Floch, merci de m'avoir accueillie au CEDRE pour réaliser le dosage des contaminants chimiques associés aux microplastiques. Merci également à Nolwenn Le Cuff et Cathy Audegond d'avoir pris le temps de m'initier aux méthodes d'extraction des contaminants chimiques et à la GC-MS/MS, et merci à Camille Lacroix d'avoir pris le relais sur ces analyses.

Véronique Loizeau, merci de m'avoir aidée à interpréter mes résultats de contaminants chimiques associés aux microplastiques. Merci pour ta précision, tes conseils, tes explications, ton aide dans la rédaction et tous les compléments d'informations que tu m'as proposés et qui ont rendu mon écrit beaucoup plus complet.

Julie Reveillaud, Lois Maignien, Morgane Chalopin et Clarisse Lemonier, merci à vous de m'avoir initiée à la biologie moléculaire, au métabarcoding et la bioinformatique. Merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre patience. Julie, un grand merci à toi de m'avoir aidé à débroussailler toutes mes données, comprendre et interpréter les résultats. Merci pour ta gentillesse, ta patience, le partage de tes connaissances et surtout merci de m'avoir fait découvrir ton métier.

Elisabeth Bondu, un immense merci pour ta patience et ton aide dans toute la paperasse administrative de la thèse. Un immense merci également à Geneviève Cohat et Anne-Sophie Podeur, pour leur aide dans toutes les tâches administratives. Je remercie vivement les collègues et stagiaires qui ont contribué à l'aboutissement des travaux de thèse : Jonathan, Anouck, Marion, Vincent, Jonathan, Olivier, Gauthier, Clarisse, Morgane, Margot, Jacques, Anne-Laure, Nelly, Adeline, Marc, Alain, Yves, Céline, Stéphane, Sébastien, Gwendoline et tout ceux que j'ai pu oublier.

Merci également aux copains, Nina, Gaelle, Marine, Carmen, Mélanie, Ewan, Marta, Sonia, Arthur, Laura, Lauriane, Yanouck, Floriane, Margot, Adèle, Arthur, Estelle. Merci à vous pour ces moments de décrochage plus que vital, ces fous rire, merci à chacun d'entre vous d'avoir rendu ces années de thèse belles, joyeuses, folles ! Vous êtes géniaux !! Papa, Maman, Max, la famille, merci à vous pour votre amour, votre soutien, votre présence, votre force et votre confiance qui m'ont tellement aidée au cours de la thèse.

Cette thèse se définit avant tout par sa richesse en rencontres humaines ! Je termine donc ces remerciements par une personne qui est apparue au moment où tout me semblait impossible, où cette thèse ressemblait à une montagne que je croyais infranchissable. Dorothée Vincent, Do, Coach. Tu as su employer, jour après jour, les mots justes pour m'aider à me remettre en selle pour finir cette thèse, et tu m'as transmis les clés d'une communication positive. Merci du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces six derniers mois, cela restera à jamais gravé dans ma mémoire.

Table des matières

Financements **3**

Contribution scientifique **5**

Remerciements **11**

Liste des figures (hors publications) **21**

Liste des tableaux (hors publications) **25**

Abréviations (hors publications) **27**

Avant-propos **33**

- CHAPITRE I - Etat de l'art **43**

A. Introduction à la science des polymères 47
1. L'histoire des polymères 47
2. La place des polymères dans la société 48
2.1. Les principaux polymères 48
2.2. Les domaines d'application des polymères 49
2.3. Production en masse des polymères 50
3. Le cycle de vie des polymères 51
3.1. La synthèse des polymères 51
3.2. Procédés de mise en œuvre 51
4. Vers les biopolymères 53
5. Gestion des déchets plastiques 53

B. Contamination de l'hydrosphère 55
1. Les sources de microplastiques 55
1.1. Les microplastiques primaires 56
1.2. La génération de microplastiques secondaires 57
2. La distribution des microplastiques dans l'environnement aquatique 58
2.1. Contamination de l'hydrosphère 58
2.2. Accumulation des microplastiques dans les systèmes marins 59
2.3. Le transport des microplastiques 61

C. Les microplastiques : un mélange complexe de composés chimiques 63
1. Les microplastiques : un cocktail toxique 63
1.1. Les microplastiques chargés en contaminants dès leur conception 63
1.2. Des concentreurs de contaminants environnementaux 64
2. Des vecteurs de contaminants dans les systèmes aquatiques 67
2.1. Processus d'adsorption des contaminants 67
2.2. Le rôle des microplastiques dans le transfert de contaminants chez les organismes aquatiques 69

D. Une menace pour les organismes marins 71
1. Intéraction entre les microplastiques et les microorganismes marins 71
2. Ingestion de microplastiques par les organismes marins 73
2.1. In situ 73
2.2. Données expérimentales 75
3. Devenir des microplastiques ingérés 76
4. Impacts dus à l'exposition aux microplastiques 77

- CHAPITRE II - Présentation de la rade de Brest 81

A. Cadre géographique et bathymétrie 85

B. Description des masses d'eau 87
1. Hydrologie 87
1.1. Température 87
1.2. Salinité 87
2. Hydrodynamique 88
2.1. Circulation tidale 88
2.2. Circulation résiduelle 91

C. Description des substrats 92
1. Diversité et répartition des faciès sédimentaires 92
2. Dynamique sédimentaire 93

D. Diversité biologique 95

E. Activités socio-économiques 96

- CHAPITRE III - Développements méthodologiques 99

Préambule 103

A. Micro-spectroscopie Raman 105
1. Introduction 109
2. Experimental Section 111
2.1. Reference materials and particles collected at sea 111
2.2. Raman micro-spectroscopy method 111
2.3. Application of the method to an environmental sample 112
2.4. Data analysis 112
3. Results and discussion 112
3.1. Method validation 113
3.2. Application of the methodology on large environmental sample 117
4. Conclusion 119
5. Acknowledgements 120
Supplementary information 121

B. Digestion de tissus biologiques 123
1. Introduction 127
2. Materials and methods 129
2.1. Experiment 1: elimination of the non-suitable protocols 129
2.2. Experiment 2: impact of the three selected digestion protocols on the integrity of 15 plastic families 130
2.3. Experiment 3: application of selected digestion protocols on seafood products 131
2.4. Statistics 133
3. Results and discussion 134
3.1. Experiment 1: elimination of the non-suitable protocols 134
3.2. Experiment 2: impact of the three selected digestion protocols on the integrity of 15 plastic families 135
3.3. Experiment 3: application of selected digestion protocols on seafood products 141
4. Conclusion 143
5. Acknowledgments 144
Supplementary information 145

- CHAPITRE IV - Approche écosystémique de la contamination de la rade de Brest ..155

Préambule 159

A. Influence des facteurs environnementaux et anthropiques sur la distribution des microplastiques 161
1. Introduction 165
2. Material and methods 166
2.1. Study area: hydrological characteristics 166
2.2. Sampling method 166
2.3. Visual particle sorting and Raman spectroscopic analysis 168
2.4. Background contamination 169
2.5. Surface dispersal modelling 169
2.6. Statistical analysis 171
3. Results 171
3.1. Marine litter and airborne contamination 171
3.2. Surface water contaminated by microplastics 171
3.3. Sediment contamination by microplastics 173
3.4. Hydrodynamic modelling of the Bay of Brest 175
4. Discussion 176
4.1. Microplastics in the Bay of Brest: dominance of polyethylene fragments 177
4.2. Spatial and temporal variability in the distribution of floating microplastics 178
4.3. Sediments have a relatively low microplastic content 180
5. Conclusion 181
6. Acknowledgements 181
Supplementary information 182

B. Evaluation du niveau de contamination de la macrofaune : résultats préliminaires 191

- CHAPITRE V - Un vecteur émergent 197

Préambule 201

A. Identification des communautés bactériennes associées aux microplastiques 202
1. Introduction 205
2. Material and methods 206
2.1. Samples collection 206
2.2. Samples description 206
2.3. DNA extraction and 16S amplicons sequencing 208
2.4. Processing sequences 208
2.5. Data analysis and statistics 209
3. Results and discussion 209
3.1. Samples description 209
3.2. Alpha diversity 211
3.3. Bacterial communities colonizing microplastics 212
4. Conclusion 219
Supplementary information 220

B. Identification des contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques 222
1. Introduction 224
2. Matériel et méthodes 227
2.1. Collection des échantillons 227
2.2. Description des échantillons 228
2.3. Dosage des contaminants 229
3. Résultats 231
3.1. Contamination des matrices environnementales 231
3.2. Contamination chimique des microplastiques 233
4. Discussion 234
4.1. La rade de Brest: un milieu contaminé par les HAP, PCB et pesticides 234
4.2. Contamination chimique des microplastiques de la rade de Brest 239
5. Conclusion 242

- CHAPITRE VI - Conclusions générales et perspectives 245

Références 265

Résumé 303

Abstract 305

Liste des figures (hors publications)

Figure 1 : Composition en plastiques et autres débris marins (A) collectés à 37 endroits dans le monde (B) (UNEP and GRID-Arendal, 2016). 35

Figure 2 : Voies et flux d'entrée des plastiques dans les océans (UNEP and GRID-Arendal, 2016). 36

Figure 3 : Classification des débris de plastiques selon leur classe de taille et dls organismes vivants potentiellement impactés (UNEP and GRID-Arendal, 2016). 37

Figure 4 : Démarche utilisée dans le cadre de la thèse pour évaluer les niveaux de contamination de la rade de Brest par les microplastiques. 39

Figure 5 : Flux des plastiques de leur production jusqu'à l'environnement (UNEP and GRID-Arendal, 2016). ...54

Figure 6 : Microplastiques primaires : a) microplastiques extraits d'un dentifrice ; b) granulés de pré-production industriels (GPI) ; c) microplastiques issus d'un exfoliant analysés en microscopie électronique à balayage (UNEP, 2016b). 56

Figure 7 : Microplastiques flottants collectés en rade de Brest. 57

Figure 8 : Estimation de la densité de plastiques flottant (particules.km^{-2}) selon quatre classes de tailles (0,33 - 1,00 mm, 1,01 - 4,75 mm - 4,76 - 200 mm et > 200 mm) (Eriksen *et al.,* 2014). 60

Figure 9 : Contaminants associés aux débris de plastiques incluant ceux intrinsèques aux polymères (chemical ingredients et byproduct) et les extrinsèques (sorbed contaminants) (GESAMP, 2015). 63

Figure 10 : Photos obtenues par microscopie électronique à balayage montrant la diversité des biofilms bactériens développés à la surface des débris de plastiques collectés dans l'environnement marin : (a) diatomée pennée avec de possibles filaments produits par des bactéries appartenant au genre *Hyphomonas*, (b) cyanobactéries filamenteuses, (c) au premier plan, un cilié suctorien couvert de bactéries ectosymbiotiques (zoom rectangle blanc) avec des diatomées et des cellules filamenteuse, (d) cellules microbiennes incrustées à la surface d'un débris de plastique. Les barres d'échelle représentent 10 µm (Zettler *et al.,* 2013). 71

Figure 11 : Les interactions entre les microplastiques et les organismes marins via les facteurs environnementaux (trait noir) et les facteurs biologiques (trait en pointillé) soulignant un potentiel transfert trophique (Lusher, 2015). 74

Figure 12 : Composition des bassins et sous-bassins versants de la rade de Brest. Les principaux cours d'eau à l'origine des bassins versants sont écrits en bleu (modifiée d'après Troadec *et al.,* 1997). 85

Figure 13: Bathymétrie de la rade de Brest (Gregoire *et al.,* 2016). 86

Figure 14: Salinité des eaux de surface en période de crue au cours de la pleine mer de mortes eaux (Monbet and Bassoulet, 1989). 88

Figure 15 : Courants tidaux en rade de Brest (coefficient 95) : circulation au flot et au jusant (Guérin, 2004 d'après Monbet and Bassoulet, 1989). 89

Figure 16: Trajectoire des masses d'eau sur le long terme en rade de Brest (Guérin, 2004 d'après Salomon and Breton, 1991). 90

Figure 17: Carte de la nature et répartition des sédiment en rade de Brest (projection Lambert conformal conic , Lambert 93) (Gregoire *et al.,* 2016). 92

Figure 18: Dynamique sédimentaire par charriage et transport par suspension (Gregoire, 2016). 93

Figure 19: Taux de sédimentation en rade de Brest estimés à partir des profils de $^{210}PB_{ex}$ et interpolés selon la morphologie de la rade. Le graphique de droite indique le dépôt de sédiment annuel (t.an^{-1}) selon les zones

de la rade et le graphique central indique le pourcentage de sédiment fournis par les principaux fleuves (Ehrhold *et al.,* 2016). 94

Figure 20: Méthodologie utilisée pour caractériser les particules collectées dans l'environnement marin (en rouge : temps agent estimé, en vert : temps machine en autonomie) (PE : polyéthylène, PP : polypropylène, PS : polystyrène, PET : polyéthylène téréphtalate, uPVC : polychlorure de vinyle non plastifié, PA-6 : polyamide 6, PUR : polyuréthane). 106

Figure 21 : Revue et optimisation de 6 protocoles de référence dans la littérature pour extraire les microplastiques d'une matrice biotique (TA : température ambiante) (AC : acétate de cellulose, PEHD : polyéthylène haute densité, PEBD : polyéthylène basse densité, PA-12 : polyamide 12, PA-6 : polyamide 6, PC : polycarbonate, PET : polyéthylène téréphtalate, PMMA polyméthylmétacrylate, PP : polypropylène, PS : polystyrène, PSxL : polystyrène réticulé, ePS : polystyrene expanse, uPVC : polychlorure de vinyle non plastifié, PTFE : polytétrafluoroéthylène, PUR : polyuréthane). 124

Figure 22 : Les différentes étapes d'analyse appliquées aux matrices environnementales abiotiques pour évaluer leur niveau de contamination par les microplastiques. 162

Figure 23 : Localisation des sites de prélèvement des organismes marins en rade de Brest. 191

Figure 24 : Microplastiques collectés dans les moules. La longueur (L) des fragments est exprimée en µm. 193

Figure 25 : Exemples de microplastiques collectés dans les coques. La longueur (L) des fragments et le diamètre (D) des billes sont exprimés en µm. 193

Figure 26 : Méthodologie utilisée pour identifier les communautés bactériennes associées aux microplastiques collectés dans l'environnement marin. 203

Figure 27 : Méthode d'identification des contaminants chimiques associés aux microplastiques 223

Figure 28 : Localisation des sites de collecte de sédiment, d'eau de surface et de microplastiques (A1-3, M1-3 et E1-3). 228

Figure 29 : Localisation des sites du ROCCH pour la collecte des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*; novembre 2014) (A, B et C) et des sites échantillonnés dans la thèse de C. Lacroix (2014) pour la collecte des moules (*Mytilus* spp.; novembre et décembre 2011). 238

Figure 30 : Schéma de synthèse des résultats sur la contamination de la rade de Brest par les microplastiques obtenus à l'issue des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. 248

Liste des tableaux (hors publications)

Tableau 1 : Caractéristiques (types, exemples, sources et voies d'entrées) des principaux polluants retrouvés dans les systèmes côtiers (d'après Lacroix, 2014). HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, PCB : polychlorobiphényles, TBT : tributylétain, NH_4 : ammonium, NO_3 : nitrate). 34

Tableau 2 : Les caractéristiques des plastiques de grande diffusion selon leur usage dans la société (densité eau de mer en surface : 1,027, pour une salinité de 35 à 10°C) (Andrady, 2011; Lithner *et al.,* 2011; PlasticsEurope, 2016). 49

Tableau 3 : Contaminants chimiques associés aux microplastiques collectés dans l'environnement marin (HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; PCB : polychlorobiphényle ; DDE : dichlorodiphényldichloroéthyl-ène ; DDT : dichlodiphényltrichloroéthane ; HCH : hexachlorocyclohexane). 66

Tableau 4 : Microplastiques ingérés par des organismes vivants de différent niveau taxonomique (GPI : granulé plastique industriel). 74

Tableau 5 : Densité de populations (hab.km^{-2}) des intercommunalités et métropole du bassin versant de la rade de Brest (CC : communauté de communes) (données INSEE 2013). 96

Tableau 6: Caractéristiques des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA. (Kow : coefficient de partage octanol-eau). 225

Tableau 7 : Caractéristiques des 7 PCB classés prioritaires par l'OSPAR (Kow : coefficient de partage octanol-eau). 226

Tableau 8 : Caractéristiques des pesticides recherchés dans cette étude. 226

Tableau 9 : Caractéristiques des microplastiques collectés en rade de Brest (eau de surface et sédiment) au cours des campagnes de prélèvements de février - avril 2014 et septembre - octobre 2014 (PE : polyéthylène, PP : polypropylène et PS : polystyrène ; la masse (mg) correspond à la masse de microplastiques disponibles pour les dosages de HAP, PCB et pesticides). 229

Tableau 10 : Niveaux de contamination des matrices abiotiques (sédiments collectés en février et octobre 2014 et eau de surface collectée en avril et septembre - octobre 2014) en rade de Brest aux 9 stations (les valeurs correspondent à la somme des 16 EPA-HAP, des 7 OSPAR-PCB et des 25 pesticides en ng par g de sédiment sec et en ng par l d'eau de surface; - : valeur inférieure à la limite de quantification ou détection). 232

Tableau 11 : Niveaux de contamination des microplastiques flottants collectés en avril et septembre/octobre 2014 (les valeurs correspondent à la somme des 16 EPA-HAP, des 7 OSPAR-PCB et des 25 pesticides en ng par g de microplastiques; - : valeurs inférieures aux seuils de quantification ou détection).....234

Tableau 12 : Identification de l'origine des HAP (Phe/Ant = phénanthrène/anthracène ; Flu/Pyr = fluoranthène/pyrène ; Chrys/BaA = chrysène/benzo(a)anthracène). 235

Tableau 13 : Etat de contamination des matrices biotiques (*Crassostrea gigas* collectées en 2014 et *Mytilus* spp. collectées en 2011) (les valeurs correspondent à la somme des 16 HAP classés prioritaires par l'US EPA et des 7 PCB classé prioritaires par l'OSPAR en ng par g de chair sèche de bivalve; - : pas de mesure).....238

Abréviations (hors publications)

| A |

ABS : acrylonitrile Butatiène Styrène
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

| B |

BEE : Bon Etat Ecologique
BM : Brest Métropole
BPA : bisphénol A

| C |

$CaCO_3$: carbonate de calcium
CEDRE : Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CRD : Convention de Recherche et Développement

| D |

DBP : phtalate de dibutyle
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM : directive cadre stratégie sur le milieu marin
DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène
DDT : dichlodiphényltrichloroéthane
DEHP : di(2-ethylhexyl) phtalate
DEP : phtalate de diéthyle
DnOP : di-n-octyl phtalate

| E |

ETM : élément trace métallique

| F |

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
FROGS : Find Rapidly OTU with Galaxy Solution

| G |

GC-MS/MS : chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse en tandem
GIZC : gestions intégrées des zones côtières
GPI : granulé plastique industriel

| H |

HAB : harmful algal bloom
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
HBCD : hexabromocyclododecane
HCB : hexachlorobenzène
HCH : hexachlorocyclohexane
HCl : acide chlorhydrique
$HClO_4$: acide perchlorique
HNO_3 : acide nitrique

| I |

IFREMER : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
INEE : Institut Ecologie et Environnement
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRA : Institut national de la recherche agronomique
IUEM : Institut Universitaire Européen de la Mer
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

| K |

KOH : hydroxyde de potassium
$K_2S_2O_8$: peroxodisulfate de potassium

| L |

LDCM : Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures
LEMAR : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
LM2E : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes
LOQ : limites de quantification
LOD : limites de détection

| M |

MEHP : Mono(2-éthylhexyl)phtalate
MP : microplastique
MWP : Mussel Watch Program

| N |

NaOH : hydroxyde de sodium
NP : nonylphénol

| O |

ONG : organisation non gouvernementale
OP : octyphénol
OPE : esters organophosphorés
OSPAR : Convention Oslo Paris
OTU : unité taxonomique opérationnelle

| P |

PA : polyamide
PBDE : polybromodiphényléther
PB15 : phthalocyanine 15
PC : polycarbonate
PCB : polychlorobiphényle
PCR: Réaction en chaîne par polymérisation (Polymerase chain reaction)
PE : polyéthylène
PEBD : polyéthylène basse densité
PEHD : polyéthylène haute densité
PET : polyéthylène téréphtalate
PFOA : acide perfluorooctanoïque
PLA : acide polylactique
PLE : extraits par fluide pressurisé
PMMA : polymétachrylate de méthyle
POM : polyoxyméthylène
POP : polluant organique persistant
PP : polypropylène
PPE : polyoxyde de phénilène
PPS : polysulfure de phénylène
PS : polystyrène
PSE : polystyrène expansé
PSU : polysulfone
PTFE : polytétrafluoroéthylène
PUR : polyuréthane
PVA : alcool polyvinylique
PVC : polychlorure de vinyle
Py-GC-MS : la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse puis à la spectrométrie de masse

| R |

REBENT : réseau benthique
REMI : réseau de contrôle microbiologique des zones de production conchylicole
REPAMO : suivi des gisements naturels de mollusques
REPHY : réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
ROOCH : réseau d'observation de la contamination chimique

| S |

SAGE : Schéma d'aménagement et de gestion des eaux
SBSE : Stir bar sorptive extraction
SOMLIT : Service d'Observation du Milieu LITtoral
STEP : station d'épuration

| T |

TBT : tributylétain

TD : désorption thermique (Thermal desorption)
TiO_2 : dioxyde de titane

| U |

UAE : extraction assistée par ultrasons
UBO : Université de Bretagne Occidentale
US EPA : agence Américaine de Protection de l'Environnement
UV : ultraviolet

| Z |

ZABrI : Zone Atelier Brest-Iroise

Avant-propos

La zone côtière assure la transition entre le continent et l'océan. La riche diversité des écosystèmes côtiers ainsi que les ressources et services (écologiques, sociaux et économiques) fournis par cette zone en font une composante importante de la biosphère. L'attractivité des zones côtières (notamment économique, commerciale et touristique) est à l'origine des 23 % de la population mondiale (soit 1,2 milliard de personne) vivant à moins de 100 km du littoral, et la densité de ces populations devrait augmenter de 50 % d'ici 2030 (Adger *et al.,* 2005; Small and Nicholls, 2003). La littoralisation a généré une densité de population mondiale dans les zones côtières presque trois fois plus importantes que dans l'intérieur des terres, 99,6 et 37,9 habitants par km^2, respectivement (Kay and Alder, 2005).

La modification des usages de la zone côtière suite à la littoralisation croissante a généré des risques côtiers. Ces derniers résultent de la combinaison entre les aléas (événement d'origine naturelle et/ou anthropique) d'un niveau donné (intensité) et les enjeux définis par les éléments qui y sont exposés (valeur sociétale, économique ou environnementale) (Hénaff and Philippe, 2014; Metzger and D'Ercole, 2011). La gestion des risques côtiers (prévention, protection et réparation) et les représentations que s'en font les usagers et les gestionnaires, combinées aux aléas et aux enjeux permettent d'estimer la vulnérabilité du territoire côtier (Hénaff and Philippe, 2014; Meur-Ferec *et al.,* 2013). Cependant, bien que des stratégies de gestions intégrées des zones côtières (GIZC) soient déployées, cela reste un défi de concilier la protection du littoral et les besoins de développement et moyens d'existence des populations. Les perturbations d'origine humaine peuvent exercer des changements directs en influençant le fonctionnement des écosystèmes (conversion des sols, dégradations des habitats, pollutions, invasions biologiques, surexploitation des ressources) ou indirects qui fonctionnement de manière diffuse en modifiant un ou plusieurs facteurs directs (démographique, économique, socio-politique) des systèmes côtiers et les services qu'ils créent (Sala *et al.,* 2000; Vörösmarty *et al.,* 2010). La combinaison de multiples pressions (directes et indirectes) peut entrainer une vulnérabilité amenant à l'altération du fonctionnement d'un écosystème voire même la rupture de son équilibre (Nelson *et al.,* 2006). Parmi la diversité des perturbations anthropiques affectant les systèmes côtiers, la pollution chimique, microbiologique ou par la présence de déchets solides pose un problème environnemental majeur. Les zones côtières constituent en effet le réceptacle final de l'ensemble des contaminants rejetés dans l'environnement, quel que soit le compartiment (air, eau, sol) et comptent de ce fait parmi les zones les plus exposées aux différents types de pollutions récurrentes (Shahidul Islam and Tanaka, 2004) (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques (types, exemples, sources et voies d'entrées) des principaux polluants retrouvés dans les systèmes côtiers (d'après Lacroix, 2014). HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques, PCB : polychlorobiphényles, TBT : tributylétain, NH_4 : ammonium, NO_3 : nitrate).

Types		Exemples	Sources	Voies d'entrée dans l'environnement marin
Polluants chimiques	Polluants organiques persistants (POP)	HAP, PCB	Activités urbaines, industrielles et maritimes	Sources naturelles, rejets directs, ruissellements, rejets industriels et urbains, retombées atmosphériques
	Eléments traces métalliques (ETM) et organométalliques	Cuivre, Zinc, Plomb, Mercure, Cadmium, TBT	Activités urbaines, industrielles et maritimes	Sources naturelles, rejets directs, ruissellements, rejets industriels et urbains, retombées atmosphériques
	Pesticides	atrazine, diuron	Activités agricoles	Apports fluviaux, ruissellements
	Produits pharmaceutiques et cosmétiques	caféine, ibuprofène, fluoxetine	Activités urbaines et industrielles	Rejets urbains, apports fluviaux
	Radionucléides	plutonium, césium	Activités militaires et industrielles	Rejets industriels, retombées atmosphériques
Déchets		plastiques, métaux	Toutes Activités	Rejets directs, ruissellements, apports fluviaux
Polluants microbiologiques		bactéries, virus	Activités agricoles et urbaines	Rejets urbains, apports fluviaux
Substances eutrophisantes / matière organique		NH_4, NO_3	Activités urbaines	Sources naturelles, apports fluviaux, rejets urbains, ruissellements

Cette intense pression anthropique exercée sur le littoral entraine l'apparition de nouveaux contaminants dans le milieu marin tels que les plastiques (Crain *et al.,* 2009; Defeo *et al.,* 2009). Les plastiques représentent 60 à 90 % des déchets marins d'origine anthropique présents dans l'environnement marin (plages, surface de l'eau et fond marin) (Figure 1) (Barnes *et al.,* 2009; Derraik, 2002; Expéditions MED, 2016). Les déchets marins sont définis par le programme des Nations Unies pour l'environnement (UNEP, 2009) comme des matériaux solides, manufacturés ou transformés, jetés ou abandonnés dans l'environnement marin. L'explosion de la demande et donc de la production de plastique a entrainé une augmentation de cette production mondiale de 1,7 à 311 millions de tonnes en un demi-siècle (Europe : 20,4% de la production mondiale en 2013) (PlasticsEurope, 2016) dont une partie échappe aux filières de traitement et recyclage des déchets et se retrouve relarguée dans l'environnement et notamment dans les systèmes aquatiques. Une étude récente a montré que 99,5 millions de tonnes de déchets plastiques étaient générées chaque année en provenance des zones côtières et a évalué qu'entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de ces déchets plastiques entraient dans les océans en une année (Jambeck *et al.,* 2015). Une autre étude a estimé qu'au minimum 5,25 milliards de particules de plastiques (268 940 tonnes) contaminent la surface de

l'ensemble de l'hydrosphère (Eriksen *et al.,* 2014). Ce chiffre ne prend pas en compte la contamination de la colonne d'eau, des fonds marins ni celle des plages.

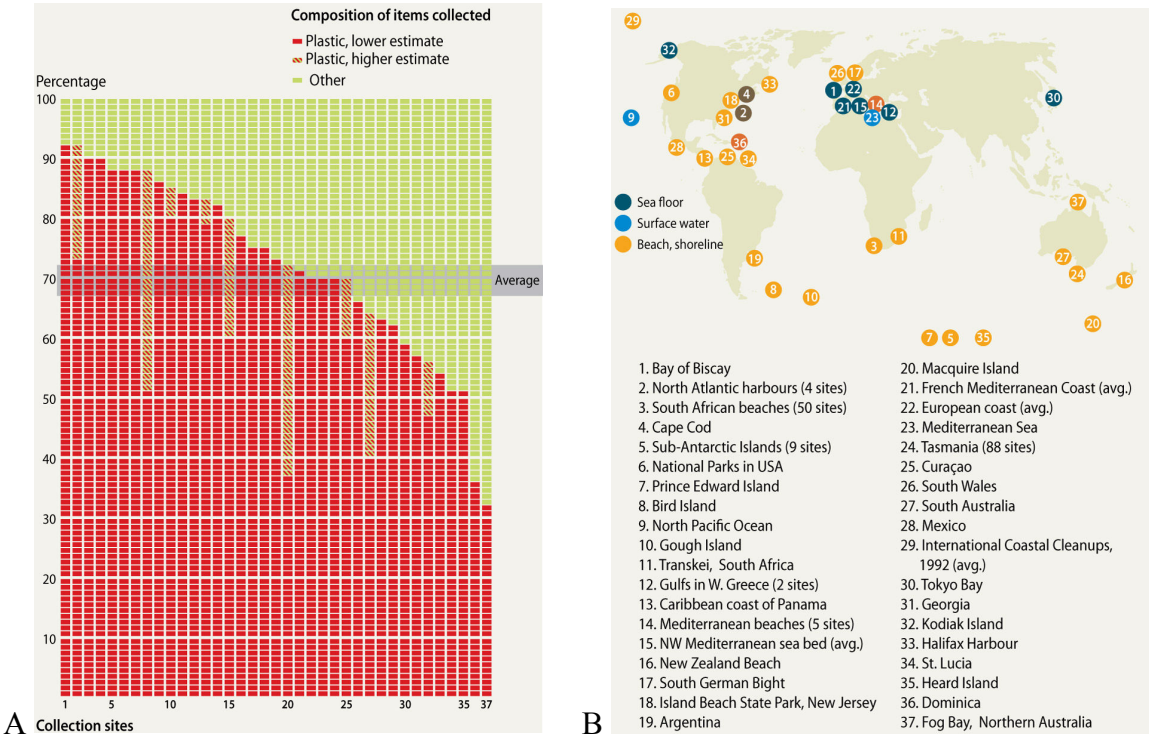


Figure 1 : Composition en plastiques et autres débris marins (A) collectés à 37 endroits dans le monde (B) (UNEP and GRID-Arendal, 2016).

Les premiers rapports faisant état de la présence des plastiques dans les écosystèmes marins datent des années 1970. Des morceaux de plastique ont été retrouvés dans 74 des 100 carcasses d'albatros de Laysan (*Phoebastria immutabilis*) qui nichent dans les îles hawaïennes (Kenyon and Kridler, 1969). En 1971, des fibres synthétiques ont été découvertes lors d'une analyse de routine de la matière en suspension dans les eaux du nord de l'Angleterre et leur augmentation dans les échantillons collectés a été mise en évidence (Buchanan, 1971). Carpenter et Smith (1972) ont, quant-à-eux, observé la présence de granulés de pré-production industriels (GPI) et de fragments à la surface de l'eau de la mer de Sargasse dans une concentration moyenne de 3500 part.km^{-2} (290 g.km^{-2}). En plus de la contamination de l'environnement marin par les plastiques, une étude a montré que ceux-ci présentaient une menace physique pour les oiseaux marins (pièges, étranglement, colmatage de l'estomac, etc.) (Gochfeld, 1973). La découverte de la « soupe de plastiques » aussi appelée « continent de plastique » ou « 7ème continent » dans le gyre nord Pacifique par le capitaine Charles Moore en 1997 a permis d'alerter la société sur la situation des océans vis à vis des déchets plastiques. En 2001, Moore *et al.* ont pour la première fois quantifié la contamination de la surface de l'eau du gyre à 334 271 plastiques par km^2. Les sources de débris de plastiques dans les écosystèmes marins sont multiples (Figure 2). Une étude récente menée par l'association Expéditions MED a estimé que 30,4 % des déchets plastiques côtiers de l'arc Atlantique étaient issus des activités maritimes, 11,1 %

sont des déchets divers du quotidien, 7,9 % sont d'origine alimentaire et enfin 47,1 % sont des fragments non identifiables (Expéditions MED, 2016). Les apports continentaux proviennent du tourisme, des usages récréatifs, des industries, des zones portuaires, des stations d'épuration (STEP), des rejets de déchets illégaux et du lessivage des sols. Les apports directs de plastiques dans le milieu aquatique correspondent aux activités maritimes telles que la pêche commerciale, la pêche récréationnelle, les activités aquacoles ainsi que les activités nautiques et aquatiques (Andrady, 2011). A cause de leurs propriétés particulières (flottaison, persistance), les plastiques peuvent être transportés sur de longues distances avant de s'échouer sur les plages ou sédimenter sur les fonds aquatiques sous l'effet de facteurs physiques (processus de dégradation) et biologiques (biofouling, ingestion) (Cole *et al.,* 2011; Lobelle and Cunliffe, 2011; Long *et al.,* 2015). Cependant, leur parcours ne s'arrête pas là, une fois sédimentés, ils peuvent être régulièrement remis en suspension dans la colonne d'eau via les courants, les marées, le vent, les tempêtes ou via les processus biologiques cités ci-dessus (G.L. Lattin *et al.,* 2004).

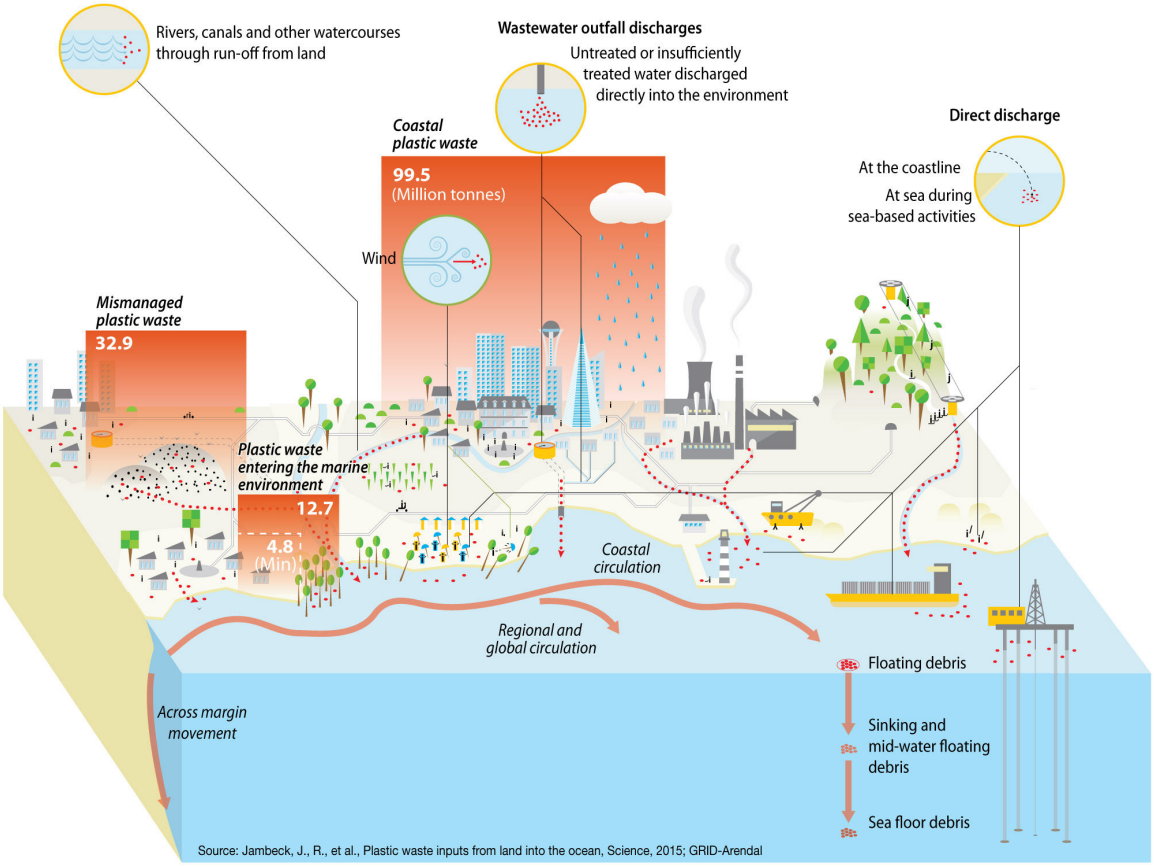


Figure 2 : Voies et flux d'entrée des plastiques dans les océans (UNEP and GRID-Arendal, 2016).

Les débris plastiques peuvent être classés selon leur taille : megaplastiques (> 1m), macroplastiques (2,5 cm à 1m), mésoplastiques (5 mm à 2,5 cm), microplastiques (0,1 µm à 5 mm) et les nanoplastiques (< 0,1 µm) (Figure 3).

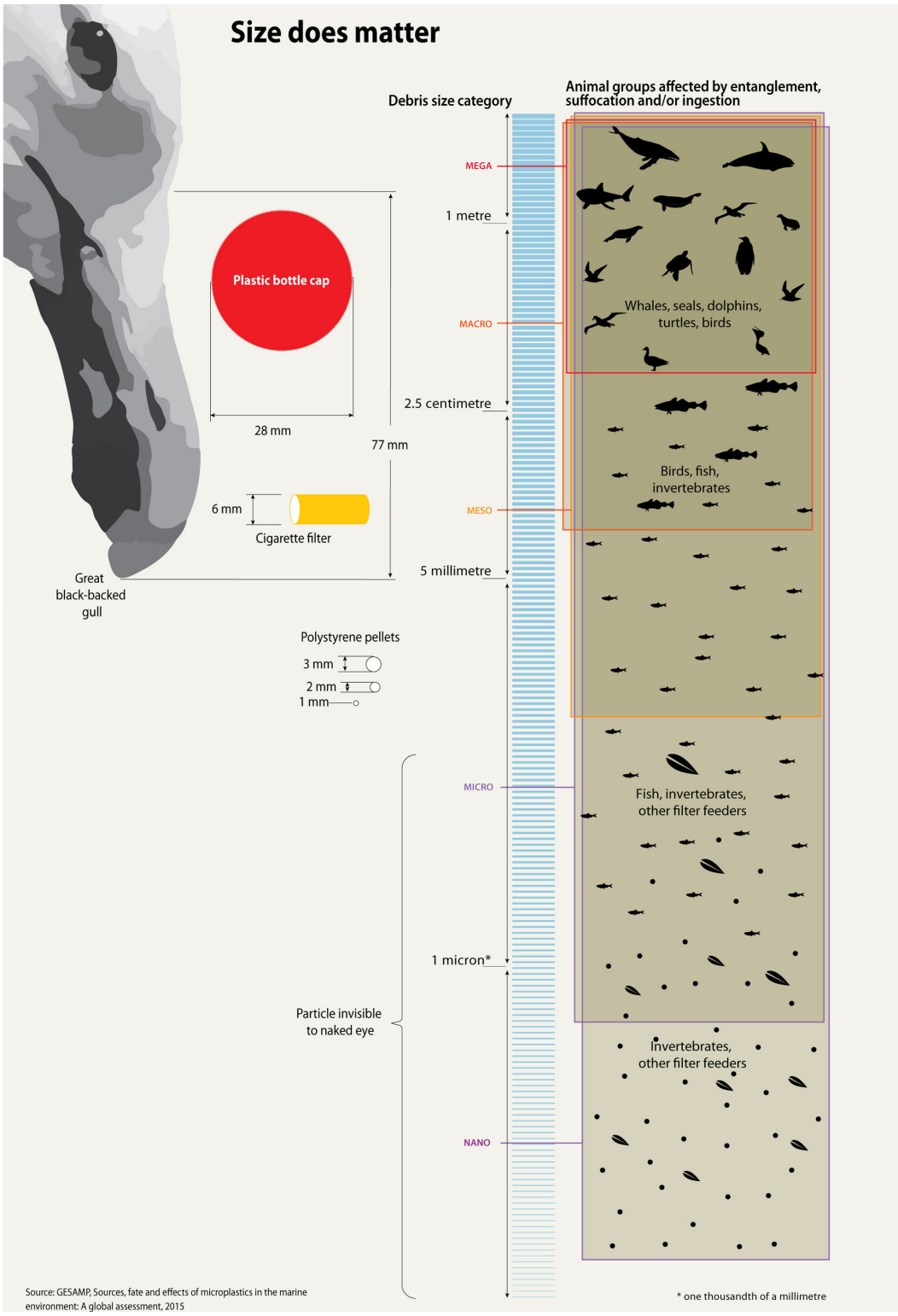


Figure 3 : Classification des débris de plastiques selon leur classe de taille et des organismes vivants potentiellement impactés (UNEP and GRID-Arendal, 2016).

La communauté scientifique a commencé à s'intéresser à la contamination de l'environnement aquatique par les plastiques et notamment les macroplastiques dans les années 60, suite aux premiers rapports d'ingestion de ces déchets marins par les oiseaux marins (Kenyon and Kridler, 1969; Parslow and Jefferies, 1972). Récemment, cet intérêt pour la contamination des systèmes aquatiques par les plastiques s'est orienté vers des particules plus petites, les microplastiques (Thompson *et al.,* 2004). Les microplastiques sont des particules de plastiques inférieures à 5 mm qui peuvent être directement fabriqués en microparticules (microplastiques primaires) ou sont issus de la fragmentation de macroplastiques (microplastiques secondaires) (Andrady, 2011; C. Arthur *et al.,* 2009). Eriksen *et al.* (2014) ont montré que les microplastiques sont la classe de taille dominante parmi les débris de plastiques, ils représentent 92 % des 5,25 milliards de particules de plastiques qui contaminent la surface des océans.

Ces particules de plastiques peuvent contenir des additifs potentiellement toxiques pour les organismes vivants (phtalates, bisphénol A, retardateurs de flamme bromés, nonylphénols, antioxydants) qui sont incorporés aux polymères lors de leur conception afin d'allonger leur durée de vie, leur conférer une meilleure résistance à la chaleur, aux mécanismes d'oxydation et de dégradation. De plus, une fois dans le milieu aquatique, les débris de plastiques peuvent concentrer des polluants comme les polluants organiques persistants et les métaux (Ashton *et al.,* 2010; Mato *et al.,* 2001; Rios *et al.,* 2007; Teuten *et al.,* 2009). Ils sont de potentiels vecteurs de micro-organismes (Maso *et al.,* 2003; Zettler *et al.,* 2013) et sont dans certaines conditions des véhicules d'espèces invasives susceptibles de bouleverser l'équilibre biologique des régions qu'elles colonisent (Galgani *et al.,* 2013). En 2008, l'augmentation des déchets marins et plus particulièrement des microplastiques a été prise en compte lors de la rédaction de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) par la commission européenne (descripteur 10.1.3). D'ici 2020, les pays européens doivent obtenir ou maintenir un « Bon Etat Ecologique » des eaux marines européennes, cela passe notamment par la maîtrise du descripteur « déchets marins » et sous-descripteur « microplastiques » (Galgani *et al.,* 2013). Dans ce cadre, les études visant à préciser le niveau de cette pollution sur les écosystèmes côtiers européens sont d'un grand intérêt. A l'échelle de la France, la majorité des études publiées concerne le bassin méditerranéen (Collignon *et al.,* 2012; Pedrotti *et al.,* 2016) et dans une moindre mesure le Golfe de Gascogne (Galgani *et al.,* 1995; van den Beld *et al.,* 2016), mais aucune donnée n'était disponible sur les côtes bretonnes. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse qui a pour objectif d'évaluer la contamination de la rade de Brest par les microplastiques, perturbateurs environnementaux émergents.

La rade de Brest, localisée à l'extrémité ouest de la pointe bretonne, est un système estuarien semi-fermé et macrotidal. Ce bassin de 180 km^2 est en contact avec la mer d'Iroise via un étroit chenal (le Goulet) de 1,8 km de large. La rade de Brest est un bassin peu profond avec des activités anthropiques intense et une biodiversité importante, elle est donc confrontée à de multiples enjeux environnementaux et sociétaux. Afin d'en évaluer la contamination par les microplastiques, plusieurs

questions ont été abordées : (1) Les matrices environnementales abiotiques (eau et sédiment) et biotiques (macrofaune marine) de la rade de Brest sont-elles contaminées par les microplastiques ? (2) Les microplastiques présents dans ces matrices sont-ils porteurs de polluants organiques ? (3) Les microplastiques flottants en rade de Brest sont-ils colonisés par des communautés bactériennes ? (Figure 4).

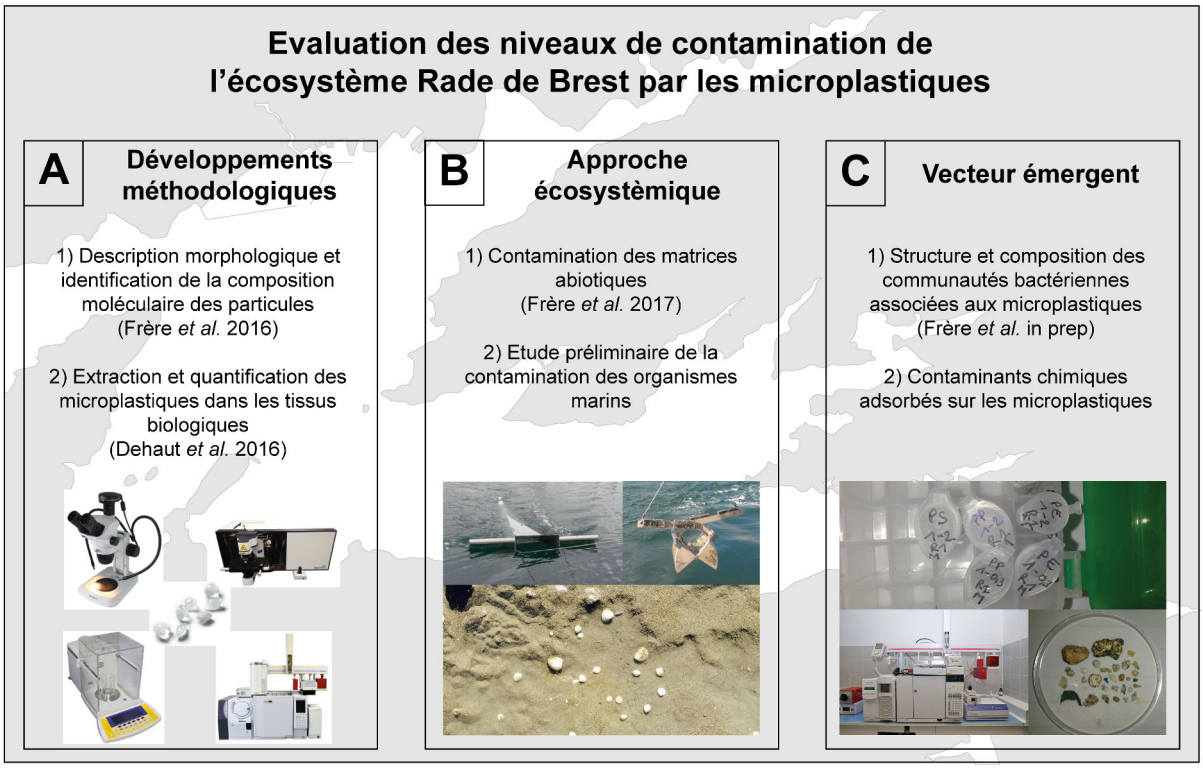


Figure 4 : Démarche utilisée dans le cadre de la thèse pour évaluer les niveaux de contamination de la rade de Brest par les microplastiques.

Pour répondre à ces questions, ce manuscrit s'articule autour de six chapitres.

Le **chapitre I** est consacré à la synthèse bibliographique permettant de retracer les connaissances actuelles sur la thématique des microplastiques dans l'environnement marin. Ce chapitre démarre par une introduction à la science des polymères, suivie d'une présentation de la contamination de l'environnement marin par les microplastiques. L'interaction entre les microplastiques et les contaminants chimiques, ainsi qu'avec les organismes vivants est également présentée dans ce chapitre. Le **chapitre II** est une présentation des connaissances de la zone d'étude : la rade de Brest. Les caractéristiques géographiques, hydrologiques, sédimentaires, biologiques et les activités anthropiques y sont décrites. Le **chapitre III** se focalise sur les principales méthodologies développées au cours de ces travaux de thèse. Une première partie est consacrée à la caractérisation morphologique et l'analyse de la composition moléculaire des microplastiques par micro-spectroscopie Raman des microplastiques. La seconde partie présente une évaluation des différents protocoles de digestion de

tissus biologiques existants dans la littérature dans le but d'identifier une méthode efficace permettant de collecter et quantifier les microplastiques ingérés par les organismes marins. L'ensemble de ces travaux est présenté sous la forme de deux articles publiés dans *Marine Pollution Bulletin* et *Environmental Pollution*. Le **chapitre IV** aborde la contamination des matrices environnementales abiotiques et biotiques par les microplastiques en rade de Brest. La surface de l'eau et le sédiment ont été collectés dans l'ensemble de la rade de Brest et à deux temps de prélèvements différents. L'ensemble de ces travaux est présenté sous la forme d'un article publié dans *Environmental Pollution*. Une évaluation préliminaire du niveau de contamination de la macrofaune marine de la rade de Brest est également présentée, sous la forme d'un sous-chapitre. Le **chapitre V** est dédié aux microplastiques en tant que vecteurs de communautés bactériennes et de contaminants chimiques. Une première partie est dédiée aux espèces colonisatrices procaryotes (bactéries) identifiées sur les microplastiques flottants collectés en rade de Brest. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article en préparation en vue d'une soumission dans *Environmental Science and Technology* courant 2017. La deuxième partie traite de la mesure de contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques collectés et est présentée sous la forme d'un chapitre de thèse. Enfin, le **chapitre VI** propose une discussion et conclusion intégrant l'ensemble des résultats de l'étude.

- CHAPITRE I -

Etat de l’art

A. Introduction à la science des polymères 47
1. L'histoire des polymères 47
2. La place des polymères dans la société 48
2.1. Les principaux polymères 48
2.2. Les domaines d'application des polymères 49
2.3. Production en masse des polymères 50
3. Le cycle de vie des polymères 51
3.1. La synthèse des polymères 51
3.2. Procédés de mise en œuvre 51
4. Vers les biopolymères 53
5. Gestion des déchets plastiques 53

B. Contamination de l'hydrosphère 55
1. Les sources de microplastiques 55
1.1. Les microplastiques primaires 56
1.2. La génération de microplastiques secondaires 57
2. La distribution des microplastiques dans l'environnement aquatique 58
2.1. Contamination de l'hydrosphère 58
2.2. Accumulation des microplastiques dans les systèmes marins 59
2.3. Le transport des microplastiques 61

C. Les microplastiques : un mélange complexe de composés chimiques 63
1. Les microplastiques : un cocktail toxique 63
1.1. Les microplastiques chargés en contaminants dès leur conception 63
1.2. Des concentreurs de contaminants environnementaux 64
2. Des vecteurs de contaminants dans les systèmes aquatiques 67
2.1. Processus d'adsorption des contaminants 67
2.2. Le rôle des microplastiques dans le transfert de contaminants chez les organismes aquatiques 69

D. Une menace pour les organismes marins 71
1. Intéraction entre les microplastiques et les microorganismes marins 71
2. Ingestion de microplastiques par les organismes marins 73
2.1. In situ 73
2.2. Données expérimentales 75
3. Devenir des microplastiques ingérés 76
4. Impacts dus à l'exposition aux microplastiques 77

A. Introduction à la science des polymères

Cette partie vise à rappeler les notions de base de la science des polymères. Le but est de souligner l'immense variété d'organisation des chaînes macromoléculaires, de fabrication et de composition engendrant des matériaux très complexes.

Tout d'abord, il est nécessaire de définir le terme « polymère » qui sera utilisé tout au long de ce manuscrit comme synonyme de matériaux plastiques. La définition proposée ici correspond aux recommandations de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1996). Un polymère est un matériau organique défini comme une macromolécule essentiellement composée d'une succession d'entités moléculaires de grande taille. Celles-ci sont générées par l'assemblage covalent d'un grand nombre d'unités répétitives plus communément appelées monomères, eux-mêmes constitués d'un certain nombre d'atomes.

1. L'histoire des polymères

L'histoire des polymères peut se résumer en trois avancées majeures : la découverte des polymères naturels directement issus de la biomasse, la réalisation des polymères artificiels après la modification chimique des polymères naturels, tout en préservant leur squelette macromoléculaire, et enfin la création des polymères synthétiques entièrement créés par l'Homme (Fontanille and Gnanou, 2014). Parmi les polymères naturels, les principaux matériaux organiques sont de la famille des polysaccharides (cellulose, amidon) et des protéines (laine, soie). Cependant, la rareté et le coût de certains matériaux (soie, ivoire) ont amené les scientifiques à modifier chimiquement les polymères naturels et créer ainsi les polymères artificiels (celluloïd, soie artificielle, acétate de cellulose, galalithe) (Fontanille and Gnanou, 2014).

Le XIXème siècle est marqué par la découverte de la transformation d'un polymère naturel, le caoutchouc naturel qui est un matériau organique issu de la coagulation du latex provenant principalement de l'hévéa. Sa description remonte au XVIIIème siècle avec les naturalistes français C.M. de La Condamine et F.F. de la Gataudière (Patterson, 2012). Ce polymère naturel a d'abord été utilisé, après dissolution dans du naphta, pour ses propriétés d'élasticité, de souplesse et d'imperméabilisation. Cependant, il ne supportait pas les variations thermiques et devenait soit cassant à faible température, soit se transformait en une masse gluante à des températures élevées. En 1839, C. et N. Goodyear ont mis au point le procédé de vulcanisation du caoutchouc naturel en chauffant ce dernier avec du souffre, ce qui a permis de conférer au caoutchouc une résistance thermique plus importante le rendant ainsi résistant à la chaleur tout en maintenant son élasticité à basse température (Seymour *et al.,* 1989a). Un autre exemple de la modification d'un polymère naturel est celui de la

cellulose. La cellulose a été découverte par un pionnier dans l'industrie des polysaccharides et de l'agriculture chimique, le chimiste français A. Payen (1838) (Fisher, 1989). La cellulose est un polymère naturel extrait à partir du bois et des plantes, et isolé de la lignine après ajout d'acide nitrique. En 1846, les travaux du chimiste allemand C F. Schönbein ont mené à la découverte de la nitrocellulose, polymère artificiel issu de la transformation de la cellulose en nitrate de cellulose par action d'un mélange sulfo-nitrique (Seymour *et al.,* 1989b). Ce polymère artificiel a été le principal composant utilisé dans la conception de collodions médicaux et de coton-poudre (ou poudre-B, explosif). Il a ensuite été mélangé avec le camphre pour créer le celluloïd qui est utilisé dans la fabrication de collodions photographiques et a permis de remplacer l'ivoire très convoité pour la conception d'objets domestiques (boules de billard, touches de piano, boutons, manches des couverts) (Seymour *et al.,* 1989b).

Le XXème siècle est marqué de grandes avancées scientifiques qui ont mené à la création des polymères synthétiques et au début de leur industrialisation. En 1907, le chimiste américain d'origine belge L.H. Baekeland découvrit le premier polymère synthétique thermodurcissable, la bakélite (polymère formo-phénolique), et mit en place le premier procédé industriel de production d'un polymère synthétique (Seymour *et al.,* 1989a). En 1919, H. Staudinger (Prix Nobel 1953) a introduit la notion de macromolécule et est à l'origine de la polymérisation de nombreux polymères couramment utilisés de nos jours. Les nombreuses découvertes qui suivirent furent récompensées par l'attribution de plusieurs Prix Nobel (Fontanille and Gnanou, 2014). Cette période est marquée par le début de la production en masse de polymères synthétiques, dominants au sein des plastiques (Fontanille and Gnanou, 2014).

2. La place des polymères dans la société

2.1. Les principaux polymères

Les polymères sont classés en trois catégories : les thermoplastiques, les thermodurcissables et les élastomères qui se distinguent par des comportements macroscopiques différents dus à leur structure et aux liaisons intermoléculaires (Aucher, 2009).

Les polymères thermoplastiques sont les plus fréquents, ils représentent 90% des applications de matière plastique (PlasticsEurope, 2016). Ce sont des matériaux dont la forme est réversible, ils redeviennent malléables au-delà d'une certaine température, et retrouvent leur solidité en-dessous de celle-ci, tout cela grâce à la structure de la matrice où les molécules sont séparées les unes des autres et peuvent donc être déplacées à haute température (Chatain, 1987a). Les principaux représentants de cette catégorie sont les polymères oléfiniques (polyéthylène et polypropylène), vinyliques

(polychlorure de vinyle, polyacétate de vinyle), styréniques (polystyrène réticulé et expansé, acrylonitrile-butadiène-styrène), polyamides et polyesters saturés (polyéthylène téréphtalate).

Les polymères thermodurcissables correspondent à des matériaux dont la forme est obtenue sous l'action de la chaleur et est irréversible (Chatain, 1987b). Contrairement aux thermoplastiques, les molécules de la matrice sont liées entre-elles via des liaisons additionnelles ce qui créé un réseau interconnecté. Ces polymères ne peuvent donc être remodelés à haute température ce qui engendrerait leur dégradation. Cette catégorie de polymères est majoritairement représentée par le polyuréthane, les polyesters insaturés, et les résines époxy.

Les élastomères sont des polymères présentant des propriétés élastiques qui supportent de grandes déformations et peuvent retrouver leur forme après étirement. Les principaux élastomères sont le caoutchouc et le néoprène.

2.2. Les domaines d'application des polymères

Leurs propriétés multiples ont permis aux polymères de conquérir le domaine domestique tout comme le domaine industriel. Parmi ces nombreuses propriétés, les principales sont la résistance (mécanique, thermique), la légèreté, la souplesse des formes (rigide, semi-rigide, souple), l'imperméabilité, la coloration aisée des matériaux et le faible coût de production. Selon leur domaine d'application, les polymères peuvent être séparés en trois catégories : les polymères de grande diffusion, les polymères techniques et les polymères spéciaux (Fontanille and Gnanou, 2014; Reyne, 1998).

Les polymères de grande diffusion, également appelés polymères de commodité, regroupent le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polychlorure de vinyle (PVC), le polystyrène (PS) et le polystyrène expansé (EPS), le polyéthylène téréphtalate (PET) et le polyuréthane (PUR). Ces six polymères (désignés plus communément « Big Six ») représentent 80 % de la demande totale de plastiques en Europe (PlasticsEurope, 2016). Des symboles sont utilisés pour les définir suivant la norme ISO 1043 qui prend en compte les polymères de base et leurs caractéristiques spéciales, les charges et matériaux de renforcement et les plastifiants. Ces polymères possèdent leur propre combinaison de propriétés les destinant à des utilisations différentes (Tableau 2).

Tableau 2 : Les caractéristiques des plastiques de grande diffusion selon leur usage dans la société (densité eau de mer en surface : 1,027, pour une salinité de 35 à 10°C) (Andrady, 2011; Lithner *et al.,* 2011; PlasticsEurope, 2016).

Polymères	Densité	Utilisation	Demande Européenne en 2015 (%)	Symbole de recyclage
Polyéthylène téréphtalate (ou Polyester) (PET)	1,37	Bouteilles	7,1	1 PETE

Polyéthylène haute densité (PEHD)	0,94	Sacs plastiques, filets, gaines de câbles électriques, pailles	12,1	2 HDPE
Polychlorure de vinyle (PVC)	1,38	Contenants produits ménagers, cosmétiques et alimentaires, emballages alimentaires, équipement médical, chaussures	10,1	3 PVC
Polyéthylène basse densité (PEBD)	0,91 - 0,93	Bouteilles, contenants alimentaires	17,3	4 LDPE
Polypropylène (PP)	0,85 - 0,93	Cordes, bouchons de bouteilles, filets, pare-choc de voiture, pots de fleur, dossiers	19,1	5 PP
Polystyrène (PS) et polystyrène expansé (PS-E)	0,01 - 1,05	Vaisselles jetables, emballages alimentaires, emballages pharmaceutiques	6,9	6 PS
Autres (PUR, ABS, PBT, PC, PMMA, PTFE)	-	DVD, lunettes de soleil, coques d'ordinateurs, nylons, biberons, vêtements, équipement médical	27,4	7 OTHER

Certains polymères sont utilisés pour leurs qualités techniques permettant un travail sous des contraintes mécanique et thermique, ce sont les polymères techniques. Les principaux représentants sont les polyesters insaturés (PET), les polyamides (PA), les polycarbonates (PC), les polyoxyméthylènes (POM), les polyoxydes de phénilène (PPE) et les polysulfurés (PSU, PPS). Enfin la dernière catégorie, qui correspond aux polymères spéciaux, est constituée de polymères conducteurs, photoactifs, thermostables, adhésifs. Le principal représentant est un fluoropolymère, le polytétrafluoroéthylène (PTFE).

2.3. La production en masse des polymères

La production mondiale de plastique a atteint 322 millions de tonnes en 2015 (PlasticsEurope, 2016). Cette valeur comprend une grande partie des matières plastiques (thermoplastiques, thermodurcissables, polyuréthanes, adhésifs et revêtements), mais pas les fibres (notamment les fibres polyacryliques et les polyamides). Au cours des quatre dernières années, l'augmentation de la production mondiale de plastique a été estimée à environ 3,7 % par an. Les principaux producteurs de matières plastiques (thermoplastiques et polyuréthane) sont la Chine, l'Union européenne et l'Amérique du Nord, contribuant respectivement à 27,8 %, 18,5 % et 18, 5 % de la production totale (PlasticsEurope, 2016). En Europe, la demande totale en plastique (49 millions de tonnes) est dominée par six pays (70 % de la demande) : l'Allemagne (24,6 %), l'Italie (14,3 %), la France (9,6 %), l'Espagne (7,7 %), le Royaume-Uni Pologne (6,3 %). On estime que d'ici 2025, la demande en plastique doublera les niveaux actuels de production et qu'en 2050, la demande dépassera trois fois les niveaux actuels (World Economics Forum, 2016).

3. Le cycle de vie des polymères

3.1. La synthèse des polymères

L'origine des polymères est multiple (GESAMP, 2015). Ils sont issus soit de matériaux naturels (cellulose, laine, soie) ou de leur modification (nitrate de cellulose, acétate de cellulose), soit de la pétrochimie. Le raffinage du pétrole permet d'isoler à moindre coût le composant nécessaire à la conception des polymères, le naphta. La transformation du naphta via le craquage permet d'obtenir de petites molécules, les monomères, nécessaires à la fabrication des polymères.

La transformation de molécules simples (monomères) en macromolécules est appelée polymérisation. Il existe deux types de réactions de polymérisation : la polymérisation par polycondensation et la polymérisation en chaîne (Gedde, 1999). La polymérisation par polycondensation forme des macromolécules issues de la réaction par étape entre fonctions réactives portées par les monomères ou polymères. La polymérisation en chaîne utilise un centre actif initial unique pour former une chaine polymère via une réaction en chaîne (Fontanille and Vairon, 1994). Les polymères résultant sont différenciés par leurs propres propriétés individuelles, leur taille et leur structure. Les groupes fonctionnels les plus courants dans les liaisons de polymères comprennent les esters, les amides, les éthers, les imides, les sulfones et les uréthanes.

3.2. Procédés de mise en œuvre

Il existe de nombreux procédés de mise en œuvre des polymères thermoplastiques permettant de répondre à l'immense variété d'utilisations. La transformation de la matière première (granulés de pré-production industrielle ou GPI, poudres) est réalisée en trois étapes : la fusion, la mise en forme, la solidification. Pour obtenir la forme désirée, la mise en œuvre peut être réalisée par extrusion, moulage par injection, moulage avec soufflage, réalisation de feuilles ou de plaques via le calandrage, le thermoformage. Pour les polymères thermodurcissables, la synthèse et la mise en œuvre se font simultanément. Selon les exigences du produit final, les polymères vont être mélangés avec différents additifs pour améliorer leurs performances, comme les plastifiants (bisphénol A, phtalates), les stabilisants (nonylphénol), les ignifugeants (polybromodiphényléther : PBDE, hexabromocyclododécane : HBCD, ester organophosphate : OPE), les lubrifiants, les tensioactifs (alkylphénols, alkyls perfluorés) et les colorants (carbonate de calcium : $CaCO_3$, dioxyde de titane : TiO_2, phthalocyanine 15 : PB15, plomb, chromium) (GESAMP, 2016; Naudin and Clozza, 1987; Rochman, 2015).

Parmi les monomères présents dans la composition des polymères, les deux les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement sont les suivants : le bisphénol A (BPA) et le styrène. Le BPA est un

des monomères de base nécessaire à la conception des polycarbonates (biberons, bouteilles, vaisselle) et des résines époxy (vêtements, revêtement interne de certaines boites de conserve) (Andrady and Neal, 2009; Crain *et al.,* 2007; Halden, 2010; Michałowicz, 2014; Oehlmann *et al.,* 2009; Rogers and Mirza, 2013; Staples *et al.,* 2016; Thompson *et al.,* 2009). Il se retrouve en quantité résiduelle dans la matrice des polymères, mais le mécanisme principal de migration vers d'autres matrices semble être dû à la dégradation du polymère par hydrolyse (Biles *et al.,* 1998). Il est également utilisé comme additif pour le PVC en tant que plastifiant, stabilisant et antioxydant (Yamamoto and Yasuhara, 1999). Le styrène (C_8H_8) est le principal monomère utilisé pour la synthèse des polymères styréniques (PS, PSE, ABS, SBR). Ces derniers sont connus pour la fragilité thermique des liaisons constituant leur squelette moléculaire et peuvent générer des molécules de styrène (monomère, dimère et trimère) lors d'une dégradation thermique (Jang *et al.,* 2016; Kwon *et al.,* 2015, 2014; Saido *et al.,* 2014; Scheirs and Priddy, 2003). Le PS est abondamment utilisé (7 % de la demande européenne) de par ses nombreux avantages comme la légèreté, l'isolation thermique, l'étanchéité et la rigidité (PlasticsEurope, 2016).

Les additifs sont sélectionnés selon les propriétés qu'ils procurent aux polymères (Lithner *et al.,* 2011). Dans ce paragraphe, trois groupes d'additifs vont être présentés : les plastifiants, les ignifugeants et les tensioactifs. Le PVC est le polymère dont la fabrication intègre le plus grand nombre d'additifs (73 % de la production mondiale d'additifs) (Murphy, 2001). Environ 80 % des plastifiants utilisés en plasturgie servent à la conception du PVC (Murphy, 2001). Les plastifiants les plus utilisés sont les esters de phtalates (environ 80 % des plastifiants utilisés) (Bauer and Herrmann, 1997; Gao and Wen, 2016; Lithner *et al.,* 2011). Les phtalates sont utilisés comme additifs pour rendre les plastiques plus souples et plus résistants aux ruptures indésirables (Oehlmann *et al.,* 2009). Les phtalates les plus couramment utilisés sont le di(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP), le phtalate de dibutyle (DBP) et le phtalate de diéthyle (DEP) et ils sont principalement utilisés dans la production de PVC conduisant à une proportion élevée (10 - 60 %) de phtalates en poids (Net *et al.,* 2015). Ces molécules sont considérées comme dangereuses par les organismes de réglementation parce qu'elles peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens, même à de faibles concentrations. En effet, les phtalates ne sont pas liés chimiquement aux plastiques, ils se désorbent donc des produits de consommation dans l'environnement pendant la fabrication, l'utilisation et l'élimination (Talsness *et al.,* 2009). Par conséquent, les phtalates sont biodisponibles pour les organismes aquatiques (Cheng *et al.,* 2013; Fossi *et al.,* 2012, 2014; Gobas *et al.,* 2003; Huang *et al.,* 2008; Mackintosh *et al.,* 2004; Oehlmann *et al.,* 2009) avec un fort potentiel d'impact. Les PBDE sont couramment utilisés comme retardateurs de flammes (de Wit, 2002). Ils sont surtout utilisés dans le polystyrène choc, pour les textiles servant au rembourrage et dans la mousse souple de PUR. D'autres groupes de composés sont utilisés pour leurs propriétés ignifugeantes, les HBCD et les OPE. Les composés organiques appartenant aux familles des alkylphénols et des alkyls perfluorés sont des additifs très convoités en plasturgie pour leurs propriétés

tensioactives, mais également antioxydantes et plastifiantes. Enfin, des métaux toxiques tel que le plomb et le chromium sont régulièrement utilisés comme additifs en tant que pigment (Hammer *et al.,* 2012; Nakashima *et al.,* 2012).

4. Vers les biopolymères

Depuis leur création au début du XXème siècle, les polymères synthétiques font partie intégrante de notre quotidien. Ils sont requis pour de nombreuses applications dans les domaines domestique ou industriel. Cependant plusieurs de leurs propriétés très avantageuses pour la société présentent une menace pour l'environnement, notamment leur résistance à la dégradation qui les rend persistants dans l'environnement sur le long terme et leur légèreté qui leur permet d'être transportés sur l'ensemble de la planète. Leur accumulation dans l'environnement, accompagnée d'une nuisance visuelle, a fait émerger une volonté de la société d'améliorer la gestion de leur fin de vie. Les plastiques biodégradables regroupe deux types de polymères distincts : les polymères dits bio-sourcés (ou agro-sourcés), c'est à dire issus de ressources naturelles renouvelables (polysaccharides, protéines, polymères d'origines bactériennes) mais également des polymères issus de la pétrochimie (e.i. plastiques oxo-dégradables) (Thomas *et al.,* 2012; Zeng *et al.,* 2016). Leurs conditions et mécanismes de biodégradation dépendent de la ressource utilisée (Deroiné *et al.,* 2014; Shah *et al.,* 2008; Tokiwa *et al.,* 2009; Zeng *et al.,* 2016).

La biodégradabilité est un des paramètres les plus importants pour caractériser l'impact d'un matériau sur l'environnement. Elle est liée à la vitesse de disparition de ce dernier en milieu naturel. Les plastiques officiellement dits biodégradables en installation industrielle sont définis par la norme NF EN 13432, relative à la directive « emballages et déchets d'emballages (94/62/CE) », qui est constituée de quatre critères : la composition du matériau, sa biodégradabilité, sa désintégration et la qualité du compost final (Wyart, 2007). Cependant, cette norme est définie uniquement pour les conditions de compostage industriel (température de 55 à 60 °C), cette norme n'est donc pas adaptée à un compostage domestique, ni à une dégradation dans l'hydrosphère.

5. Gestion des déchets plastiques

Parmi les millions de tonnes de plastiques produits chaque année, 50 % d'entre eux sont à usage unique comme les emballages, les films agricoles et les objets de consommation jetables (Hopewell *et al.,* 2009). Une fois devenus obsolètes, une partie des déchets plastiques est valorisée (Hamad *et al.,* 2013). La valorisation de la matière consiste à recycler les déchets plastiques pour les transformer en matière première secondaire permettant ainsi la conception de nouveaux produits. Les polymères qui ne peuvent pas être recyclés peuvent être valorisés en produisant de l'énergie par combustion

(électricité ou chauffage), c'est la valorisation énergétique. Ces différents procédés permettent d'économiser la matière première et de contribuer à la sauvegarde et au respect de l'environnement. La fraction des plastiques qui n'est pas valorisée est stockée dans des décharges. Cependant de nombreuses failles apparaissent dans la gestion des plastiques de leur conception à leur fin de vie et une part non négligeable finit en tant que déchets marins dans les océans (Figure 5).

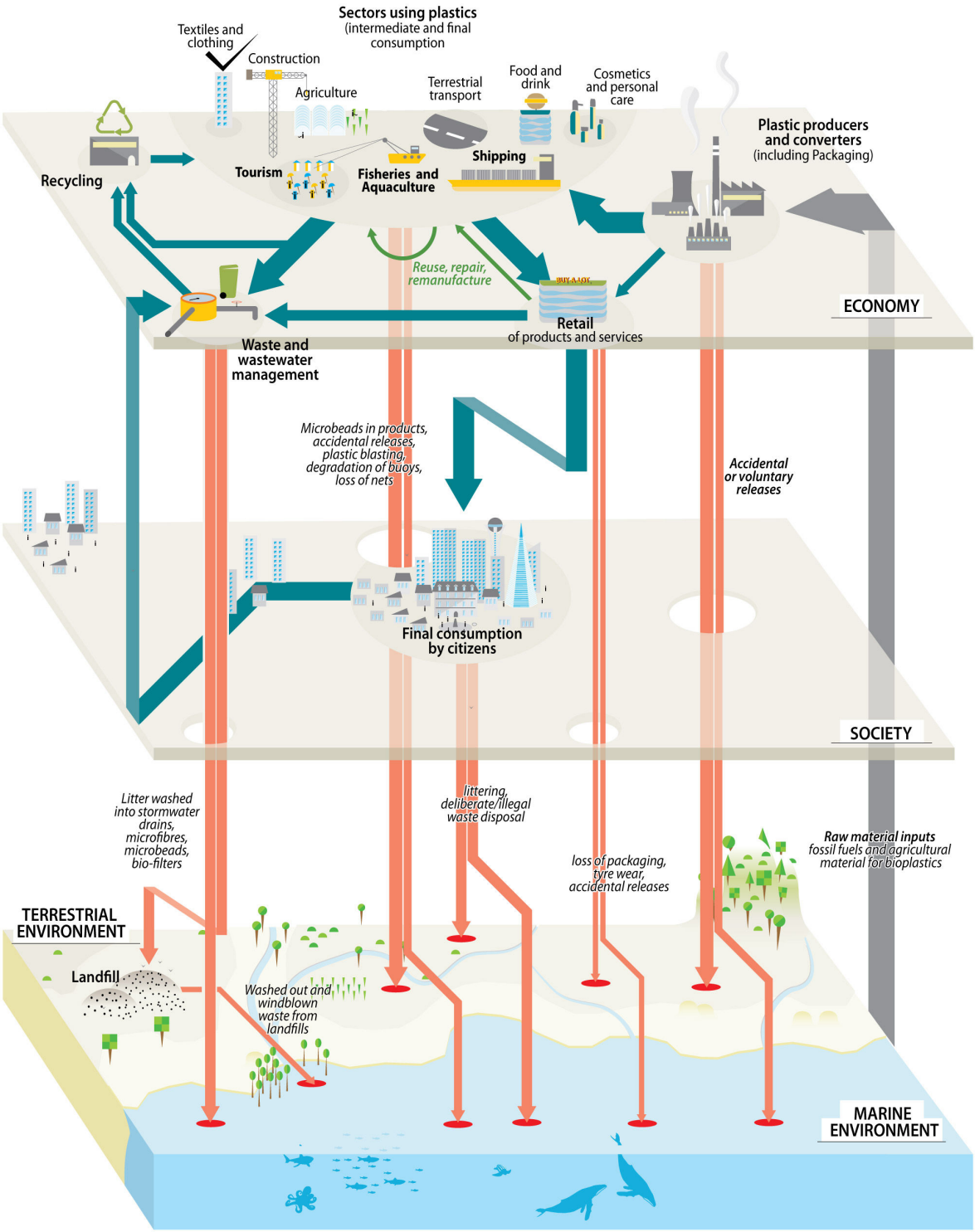


Figure 5 : Flux des plastiques de leur production jusqu'à l'environnement (UNEP and GRID-Arendal, 2016).

B. Contamination de l'hydrosphère

La contamination de l'hydrosphère par les plastiques est aujourd'hui mondialement reconnue (Eriksen *et al.,* 2014). Les caractéristiques physiques des plastiques (résistance, flexibilité et durabilité) ont mené la société à augmenter sa consommation jusqu'à rendre le plastique indispensable au quotidien (Andrady and Neal, 2009). Ces propriétés si bénéfiques pour la société représentent une menace pour l'environnement (Cole *et al.,* 2011). Les déchets marins sont majoritairement composés de plastique à la fois dans le fond des océans (Pham *et al.,* 2014) mais également à la surface de l'eau (Suaria and Aliani, 2014) et sur les plages (Topçu *et al.,* 2013). Au cours de cette dernière décennie un intérêt particulier, provenant à la fois de la société et de la communauté scientifique, a été porté sur un contaminant émergent, les microplastiques. Cette partie du manuscrit vise à présenter les sources, les modes de transport et la distribution des plastiques et notamment des microplastiques dans les systèmes aquatiques.

1. Les sources de microplastiques

Les microplastiques sont des particules de plastique dont la taille n'excède pas 5 mm (National Oceanic and Atmospheric Administration) (Arthur *et al.,* 2009), bien que pour certains auteurs ce terme s'applique aux particules de moins de 1 mm (Browne *et al.,* 2010; Claessens *et al.,* 2011; Vianello *et al.,* 2013). Bien qu'aucune limite de taille inférieure n'ait jamais été clairement définie pour les microplastiques, il est communément admis que les particules inférieures à 0,1 µm correspondent à la classe des nanomatériaux. Les microplastiques sont généralement définis par leur taille, leur forme et leur couleur. Les définitions diffèrent selon les équipes de recherche, cependant cinq catégories sont généralement utilisées pour décrire la forme des microplastiques : fragments, sphères, fibres, GPI ou granulés plastiques industriels (ou pellets) et « foam » désignant les fragments de polystyrène expansé. L'origine des microplastiques dans l'environnement aquatique est divisée en deux grandes sources. La première source de microplastiques (microplastiques primaires) correspond aux plastiques directement produits sous la forme de microparticules, et la deuxième source (microplastiques secondaires) correspond à la fragmentation de débris de plastiques plus gros (> 5 mm) via une combinaison de processus physiques, chimiques et biologiques (Andrady, 2011; Browne, 2015). Cette distinction permet une potentielle identification de certaines sources de microplastiques, permettant de pouvoir agir en amont en vue d'une réduction de leur présence dans l'environnement.

1.1. Les microplastiques primaires

Les microplastiques dits primaire retrouvés dans les milieux aquatiques proviennent des usages domestiques et industriels (Figure 6). Dans le milieu domestique, les particules de plastiques (PE, PP ; Figure 6, a, c) sont utilisés comme agents exfoliants et ont remplacé les produits naturels présents dans les cosmétiques et les dentifrices (noyaux abricots, pierre ponce, diatomite) (Fendall and Sewell, 2009; Gregory, 1996).

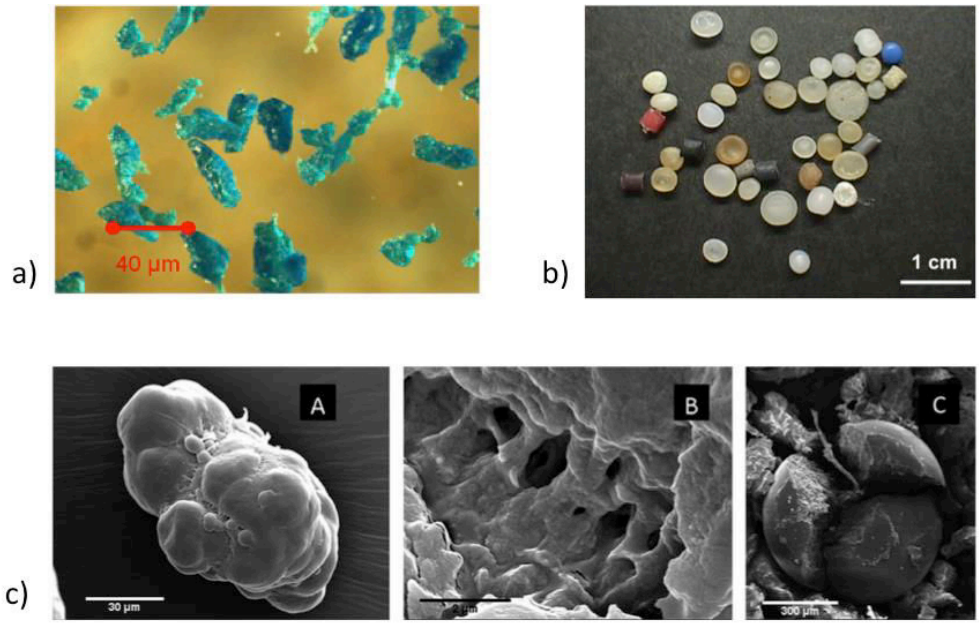


Figure 6 : Microplastiques primaires : a) microplastiques extraits d'un dentifrice ; b) granulés de pré-production industriels (GPI) ; c) microplastiques issus d'un exfoliant analysés en microscopie électronique à balayage (UNEP, 2016b).

Récemment, Napper *et al.* (2015) ont montré qu'un produit exfoliant pour le visage pouvait rejeter entre 4 594 et 94 500 microbilles de PE (diamètre moyen : 164 et 327 µm) dans les eaux usées au cours d'une seule utilisation. Du fait de leur très petite taille (souvent < 100 µm), ces microparticules passent potentiellement en totalité ou en partie au travers des différents traitements des stations d'épuration avant de se retrouver dans l'environnement aquatique (Browne *et al.,* 2011; Dris *et al.,* 2015; Mason *et al.,* 2016; Michielssen *et al.,* 2016; Murphy *et al.,* 2016). Les machines à laver représentent également, via les rejets de stations d'épuration, un apport important de microplastiques primaires dans l'environnement aquatique. L'arrivée de fibres synthétiques en STEP semble être 10 fois plus importante que les apports cosmétiques (UNEP, 2016a). Browne *et al.* (2011) ont montré que le lavage d'un seul vêtement synthétique peut relarguer plus de 1 900 fibres (polyester, acrylique, polyamide). L'apport atmosphérique de fibres synthétiques dans l'environnement aquatiques est également une source de microplastiques primaires non négligeable (Dris *et al.,* 2016). Dris *et al.* (2016) ont estimé les retombées atmosphériques entre 2 et 355 fibres.m^{-2}.$jour^{-1}$ dont la proportion de fibres synthétiques atteindrait 29 %. Dans le milieu industriel, la matière première utilisée pour

fabriquer des objets en plastique correspond à des GPI de moins de 5 mm qui se retrouvent dans l'environnement marin suite à des incidents pendant le stockage et au cours du transport (Figure 6, b) (Gregory, 1978; Shiber, 1979). Les microplastiques ont également remplacé le sable lors de nettoyage par sablage (Gregory, 1996) et font partis de la composition de certains abrasifs industriels ou automobiles (UNEP, 2016a).

1.2. La génération de microplastiques secondaires

Les microplastiques retrouvés dans les milieux aquatiques dits secondaires sont issus de la fragmentation/dégradation des macroplastiques déjà présents à l'état de déchet dans l'environnement. La dégradation des polymères correspond à l'altération de leurs propriétés ou de leur structure moléculaire ce qui peut engendrer une fragmentation, contrairement à la minéralisation qui est une dégradation complète des polymères suite à la destruction des chaînes carbonées entrainant leur conversion en de petites molécules de dioxyde de carbone ou de méthane. Très peu de plastiques peuvent être minéralisés dans l'environnement aquatique, les principaux représentants sont certains biopolymères et les polyesters aliphatiques (GESAMP, 2015). La fragmentation des polymères intervient suite à une fragilisation de leur intégrité structurelle et génère des particules de plus petite taille dont les microplastiques (Figure 7) (Browne *et al.,* 2007; Weinstein *et al.,* 2016). La fragmentation est dépendante de la nature des particules et de leur degré de cristallinité. Ce dernier est à l'origine du nombre et de la surface des pores chez les polymères, et influence ainsi leur stabilité en affectant leurs propriétés physiques et leur perméabilité à l'eau (Lambert and Wagner, 2016).

Figure 7 : Microplastiques flottants collectés en rade de Brest.

La photodégradation est la principale cause de dégradation des polymères présents sur les plages ou à la surface de l'eau, et est due à l'exposition aux rayonnements UV (Benítez *et al.,* 2013; Cooper and Corcoran, 2010; Pegram and Andrady, 1989). Ce processus engendre des réactions d'oxydation qui vont initier la destruction des liaisons chimiques C-H de la chaine polymérique et la formation de

radicaux libres. Ces derniers vont réagir avec l'oxygène et former des radicaux peroxyles. La propagation de ces réactions mène à une auto-oxydation à l'origine de la destruction de la chaine polymérique et donc de l'altération de la matrice des polymères (Gewert *et al.,* 2015). La photodégradation engendre d'autres réactions comme la déchloration qui est à l'origine du jaunissement du PVC (Gewert *et al.,* 2015). D'autres polymères (PE, PP, PC) jaunissent également suite à une exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) mais les mécanismes restent peu connus. Ce phénomène de jaunissement peut également être dû à la dégradation des additifs présents dans la matrice des polymères, comme les antioxydants phénoliques dont les produits de dégradation contiennent des structures quinoïdes qui peuvent entrainer cette coloration (Endo *et al.,* 2005). La vitesse de photodégradation peut être très variable d'un polymère à un autre de par la complexité de la composition de leur matrice (type de polymère, additif). Elle peut également varier selon les compartiments des systèmes aquatiques, elle peut être relativement rapide pour les polymères présents sur les plages, et moindre dans la zone euphotique de la colonne d'eau. Dans la zone aphotique et donc à faible teneur en oxygène, la dégradation des polymères peut être très ralentie (Ioakeimidis *et al.,* 2016). La présence d'additifs tels que les antioxydants et les stabilisateurs thermiques et UV rendent les polymères plus résistants à la photodégradation et ralentit le processus (Gewert *et al.,* 2015; Jakubowicz, 2003). De même, le développement d'un biofilm à la surface des polymères réduit les effets de dégradation en les protégeant des rayonnements UV (Weinstein *et al.,* 2016) et/ou en augmentant leur densité les faisant couler hors de la zone euphotique (Gregory and Andrady, 2003; Ye and Andrady, 1991).

Mise à part la photodégradation, d'autres processus sont, dans une moindre mesure, à l'origine de la dégradation des polymères dont la biodégradation (action des microorganismes), l'hydrolyse et enfin l'érosion via des processus mécaniques (Andrady, 2011; Costa *et al.,* 2010; Eich *et al.,* 2015; Shah *et al.,* 2008; Yoshida *et al.,* 2016). Ces dégradations altèrent la structure des polymères en entrainant une diminution de leur poids moléculaire, une perte de l'essentiel de leurs propriétés mécaniques, une altération de leurs propriétés de surface et une modification de leur signature spectrale (GESAMP, 2015).

2. La distribution des microplastiques dans l'environnement aquatique

2.1. Contamination de l'hydrosphère

La connaissance de la distribution des microplastiques est nécessaire afin d'estimer les potentielles menaces qu'ils représentent pour les biomes aquatiques. La présence de microplastiques a été rapportée dans l'ensemble de l'hydrosphère, aussi bien pour les écosystèmes aquatiques continentaux que marins, des zones intertidales aux zones abyssales. Les microplastiques sont présents dans les

biomes dulcicoles comme les lacs (Faure *et al.,* 2015; Fischer *et al.,* 2016), les fleuves (Dris *et al.,* 2015; McCormick *et al.,* 2014) et les estuaires (Browne *et al.,* 2010; Lima *et al.,* 2014). Ils ont également été décrits dans les biomes marins : les zones humides (mangroves, récifs coralliens) (Hall *et al.,* 2015; Mohamed Nor and Obbard, 2014), la zone intertidale (Ogata *et al.,* 2009; Turner and Holmes, 2011), la zone pélagique comprenant la couche de surface (Eriksen *et al.,* 2013b; Moore *et al.,* 2001) et la colonne d'eau (Ng and Obbard, 2006; Reisser *et al.,* 2015), la zone benthique (Browne *et al.,* 2010; Vianello *et al.,* 2013) et la zone abyssale (Fischer *et al.,* 2015; Woodall *et al.,* 2014). Les microplastiques contaminent les systèmes côtiers (Collignon *et al.,* 2014; Ng and Obbard, 2006), les systèmes hauturiers (Goldstein *et al.,* 2013; Law *et al.,* 2010) et même les régions les plus reculées et éloignées des activités antrophiques comme les régions polaires (Obbard *et al.,* 2014). Dans le cadre de cette thèse, l'attention sera particulièrement portée sur la contamination des écosystèmes marins côtiers par les microplastiques.

2.2. Accumulation des microplastiques dans les systèmes marins

Les multiples combinaisons entre les apports de microplastiques (continus et ponctuels) et leur comportement dans les systèmes aquatiques, sous l'effet de leur propriétés intrinsèques (surface/densité) ainsi que de processus physiques, chimiques et biologiques, engendrent des variabilités spatiales et temporelles (Ryan *et al.,* 2009). Afin de tenter de quantifier les processus gouvernant l'accumulation des débris de plastiques dans les systèmes estuariens et côtiers, Critchell and Lambrechts (2016) ont développé un modèle d'advection-diffusion en étudiant les paramètres suivants : la localisation des sources et la quantité de débris plastiques, la fragmentation des macroplastiques en microplastiques dans l'eau et sur les plages, la remise en suspension des plastiques échoués sur les plages sous l'influence du vent, la diffusion, la dérive due au vent et le taux de sédimentation (densité, fouling). Ils ont montré que la localisation des sources joue un rôle primordial dans la mise en place de zones d'accumulation des plastiques dans les systèmes côtiers.

2.2.1. Distribution spatiale

A l'échelle mondiale, plusieurs travaux ont estimé le stock de plastiques flottant dans les océans en compilant les observations *in situ* avec les modèles océanographiques et les estimations disponibles d'apport de plastiques dans les océans (Cózar *et al.,* 2014; Eriksen *et al.,* 2014; Sebille *et al.,* 2015). Les estimations varient de 5,25 à 51 mille milliards de déchets plastiques (66 à 269 mille tonnes) à la surface des océans (Cózar *et al.,* 2014; Eriksen *et al.,* 2014; Sebille *et al.,* 2015). Ces études ont montré que les microplastiques flottants tendent à se concentrer dans les zones de convergence générées par les 5 gyres subtropicaux suivants : Pacifique Nord et Sud, Atlantique Nord et Sud, et dans l'Océan Indien, ainsi que dans les zones côtières où les concentrations sont maximales (Figure 8) (Eriksen *et al.,* 2014; Sebille *et al.,* 2015). Cependant, ces estimations correspondent

approximativement à 1 % des déchets plastiques censés entrer dans les océans en 2010 (Jambeck *et al.,* 2015). Cette différence peut s'expliquer par la non-inclusion des macroplastiques dans certaines estimations (Cózar *et al.,* 2014; Sebille *et al.,* 2015). De plus, Eriksen *et al.* (2014) suggèrent que les processus restant tels que la photodégradation, la biodégradation, l'ingestion par les organismes marins, la sédimentation des particules via le fouling ou par l'entrainement d'autres particules sédimentant, ainsi que l'échouage le long des côtes peuvent expliquer cette différence. D'après ce modèle, les microplastiques représentent 92,4 % des 5,25 mille milliards de particules de plastiques flottant à la surface des océans (Figure 8).

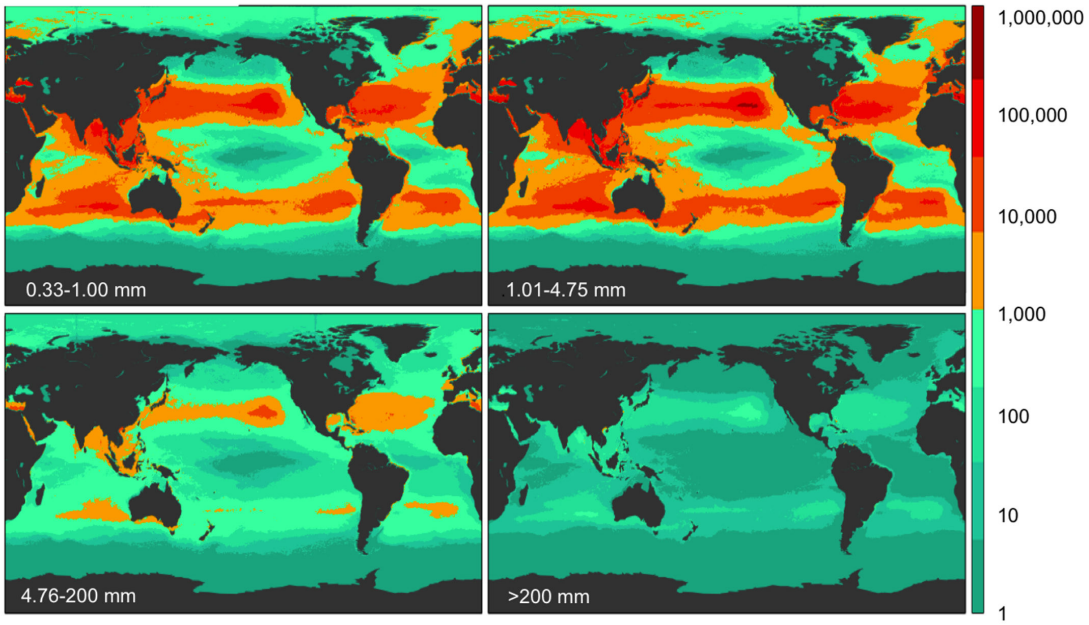


Figure 8 : Estimation de la densité de plastiques flottant (particules.km^{-2}) selon quatre classes de tailles (0,33 - 1,00 mm, 1,01 - 4,75 mm - 4,76 - 200 mm et > 200 mm) (Eriksen *et al.,* 2014).

Un nombre croissant d'étude s'intéresse à la contamination des zones côtières, notamment dans les zones de balancement des marées (Cole *et al.,* 2011), à proximité des estuaires (Lima *et al.,* 2014), des zones urbaines (Browne *et al.,* 2011), ainsi que dans des baies semi fermées (Cózar *et al.,* 2015). Vianello *et al.* (2013) notent notamment une accumulation préférentielle des microplastiques dans les zones à hydrodynamisme faible (zones abritées, lagons, rives) à l'image du comportement de la fraction sédimentaire fine. Les travaux menés par Cózar *et al.* (2015) ont montré que la mer Méditerranée est également une zone d'accumulation des déchets plastiques flottants. La contamination de la surface de ce bassin est estimée à une moyenne de 243 853 particules.km^{-2} (423 g.km^{-2}). Cette densité est proche de celle retrouvée dans les 5 gyres subtropicaux (281 à 639 g.km^{-2}) et peut s'expliquer par l'intense pression anthropique et l'hydrodynamique de ce bassin semi-fermé (Cózar *et al.,* 2014; Eriksen *et al.,* 2014). Comme dans les gyres subtropicaux, les microplastiques sont la classe de taille dominante (en terme de nombre) des déchets plastiques flottants (83 %) mais la

proportion de macroplastiques y est plus importante, ce qui est probablement due à la proximité des sources de contamination.

A une échelle spatiale plus petite (quelques dizaines de km), la variabilité dans la distribution des plastiques est influencée par les turbulences de surface (vent, vagues), la distance à la côte, la proximité des sources (Collignon *et al.,* 2012; Goldstein *et al.,* 2013; Pedrotti *et al.,* 2016). Pedrotti *et al.* (2016) ont montré une corrélation positive entre la densité de déchets plastiques flottants et la densité de la population côtière, ainsi qu'avec la distance à la côte.

2.2.2. Accumulation à long terme

La production de plastiques en augmentation constante suivie d'un apport continu de déchets plastiques et microplastiques entrainent leur accumulation à long terme dans les systèmes aquatiques. Quelques travaux ont fourni des données remontant aux années 1960, mais il reste difficile d'estimer l'évolution de la pollution de la surface des océans sur le long terme car les techniques et les zones échantillonnées ne sont pas toujours les mêmes. La première étude sur le suivi de l'évolution de la densité des microplastiques sur le long terme a été publiée en 2004 dans les îles Britanniques et en Islande (Thompson *et al.,* 2004). Les résultats montrent une augmentation des microplastiques entre les années 1960 et 1970, et 1980 et 1990 mais rien de significatif pour les décennies suivantes. Les travaux menés en 2010 dans le gyre subtropical Pacifique Nord n'ont rien montré de significatif à partir des années 1990 (Law *et al.,* 2010). Une autre étude menée dans le même gyre a rapporté une augmentation de deux ordres de grandeur entre 1972 à 1987 et 1999 et 2010 (Goldstein *et al.,* 2012). Cependant, cette augmentation peut être expliquée par l'effort d'échantillonnage de la seconde période qui a été réalisé dans la zone connue pour ces fortes concentrations en plastiques, alors que l'échantillonnage de la première période a été réalisé sur une zone plus vaste. Cette absence d'accumulation en surface au cours du temps, malgré la production exponentielle de plastiques et donc de déchets depuis plusieurs décennies, peut également être expliquée par les multiples processus (propriétés intrinsèques des plastiques, forçages hydrodynamiques et processus biologiques) qui régissent leur devenir dans les systèmes aquatiques.

2.3. Le transport des microplastiques

La connaissance du devenir des déchets plastiques dans le milieu marin reste parcellaire et de nombreux facteurs peuvent intervenir comme les caractéristiques propres à chaque particule, la nature et la localisation des sources et l'influence de processus physiques, chimiques et biologiques (Andrady, 2011; Doyle *et al.,* 2011; Wang *et al.,* 2014).

Les propriétés intrinsèques des polymères (composition moléculaire, densité, ratio surface/volume) peuvent influencer leur migration verticale dans les systèmes aquatiques (surface de l'eau, colonne d'eau, sédiment) (Murray and Cowie, 2011; Wang *et al.,* 2016). Ceux ayant une densité inférieure à celle de l'eau du système dans lequel ils se situent, auront tendance à rester en surface, alors que ceux ayant une densité plus importante auront plus de facilité à se retrouver sous la couche de surface ou à sédimenter. Cette densité est spécifique à chaque type de polymère (Tableau 2) et peut être modifiée en cas de présence d'additifs. Par exemple, Wang *et al.* (2014) ont testé la flottabilité du PVC dans l'eau du robinet en présence d'additifs. Le di-n-octyl phtalate (DnOP ; plastifiant) améliore le caractère hydrophobe du PVC et augmente sa flottabilité, alors que le carbonate de calcium ($CaCO_3$; colorant) rend le PVC plus hydrophile et diminue sa flottabilité lorsqu'il est présent à plus de 20 % (en terme de masse) (Wang *et al.,* 2014).

Les forçages hydrodynamiques (vent, circulation océanique, houle, cycle de marée) peuvent également jouer un rôle dans la distribution des microplastiques au sein de la colonne d'eau. Le transport de surface est principalement gouverné par les courants de surface des océans eux même régis par les forçages hydrodynamiques. Parmi les processus physiques environnementaux influençant la distribution verticale des microplastiques, la turbulence de la couche de surface (vent, houle, hydrodynamique, tempêtes) joue un rôle majeur. Cela peut générer un mélange de la couche d'eau entrainant une distribution verticale des microplastiques de surface dans les premiers mètres de la colonne d'eau sur le court terme (Enders *et al.,* 2015; Isobe *et al.,* 2014; Kooi *et al.,* 2016; Kukulka *et al.,* 2012; Reisser *et al.,* 2015). L'hydrodynamisme peut également jouer un rôle dans la distribution verticale des microplastiques. Dans le lagon de Venise, Vianello *et al.* (2013) ont remarqué que les microplastiques tendent à s'accumuler dans les zones à faible hydrodynamisme. Inversement, en cas d'hydrodynamisme fort dans des zones peu profondes, une remise en suspension dans la colonne d'eau des microplastiques présents dans le sédiment peut avoir lieu. Le temps passé dans les systèmes aquatiques altère la structure des microplastiques en modifiant leur forme et densité (Chae *et al.,* 2015; Cole *et al.,* 2011). Les tempêtes peuvent entraîner un mélange de la couche de surface et diminuer la quantité de microplastiques en surface en faveur de la colonne d'eau (Boerger *et al.,* 2010; G.L. Lattin *et al.,* 2004). De même, les processus de stratification et de mélanges des eaux douces et salines influencent la distribution verticale des microplastiques (Browne *et al.,* 2010; Kukulka *et al.,* 2012; Thiel *et al.,* 2013).

Enfin, les processus biologiques environnementaux peuvent également modifier la distribution verticale des microplastiques. La présence d'un biofilm à la surface des microplastiques (Cózar *et al.,* 2014; Lobelle and Cunliffe, 2011), ainsi que leur incorporation dans des agrégats de phytoplancton (Lagarde *et al.,* 2016; Long *et al.,* 2015) peuvent entrainer une modification de la sédimentation des microplastiques. De même, l'encapsulation des microplastiques dans les fèces après ingestion par des consommateurs primaires ou secondaires peut participer à leur sédimentation (Cole *et al.,* 2016).

C. Les microplastiques : un mélange complexe de composés chimiques

L'immense variété de contaminants chimiques qui interagit avec les polymères, de leur conception jusqu'à leur fin de vie, les transforme en un cocktail complexe de contaminants. Outre les additifs ajoutés à leur conception, les interactions existantes entre les contaminants et les polymères sont régies par les processus suivant : l'adsorption (fixation des contaminants à la surface d'une matrice solide), la diffusion (déplacement des contaminants à l'intérieur de la matrice) et la désorption (détachement des contaminants de la matrice polymérique) (Figure 9).

Cette partie vise à présenter de manière non exhaustive les principaux contaminants chimiques qui peuvent interagir avec les polymères au cours de leur cycle de vie, présenter ensuite les différents processus à l'origine de ces interactions, avant de repositionner ce cocktail au sein de l'écosystème marin.

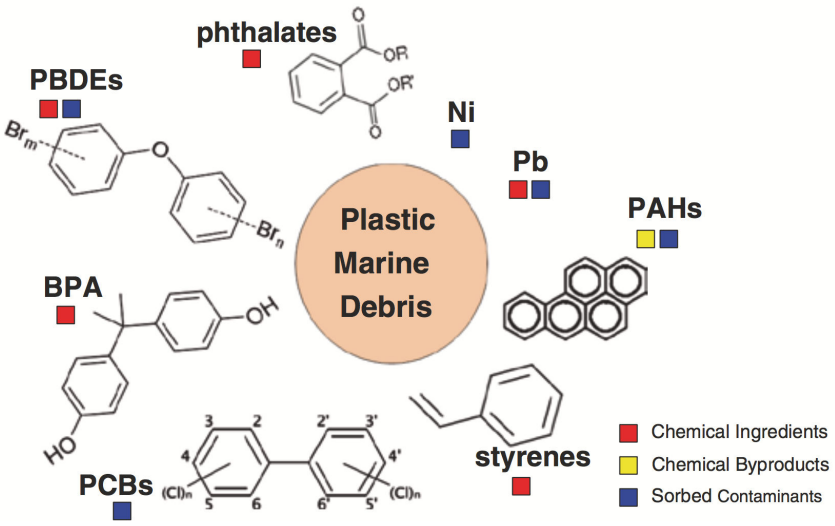


Figure 9 : Contaminants associés aux débris de plastiques incluant ceux intrinsèques aux polymères (chemical ingredients et byproduct) et les extrinsèques (sorbed contaminants) (GESAMP, 2015).

1. Les microplastiques : un cocktail toxique

1.1. Les microplastiques chargés en contaminants dès leur conception

Les éléments chimiques qui composent les polymères peuvent devenir une source de contamination pour l'environnement (Lithner *et al.,* 2011; Teuten *et al.,* 2009) (Figure 9). Les matrices polymériques sont un mélange de monomères associés à des initiateurs et catalyseurs nécessaires au procédé de

polymérisation. Des additifs sont ensuite ajoutés au mélange afin de procurer aux polymères les propriétés désirées. L'ensemble de ces composés chimiques peut se retrouver libre dans la matrice des polymères lors des réactions de polymérisation rarement complétement achevées ou au cours de la dégradation des polymères. Libres, ils peuvent migrer vers l'environnement tout au long du cycle de vie des polymères et se retrouver dans les systèmes aquatiques (Araujo *et al.,* 2002; Halden, 2010; Lithner *et al.,* 2011; Oehlmann *et al.,* 2009; Papaleo *et al.,* 2011; Rani *et al.,* 2015; Sander *et al.,* 2012; E. L. Teuten *et al.,* 2009; Wolschke *et al.,* 2015).

La plupart de ces molécules sont toxiques pour l'environnement, certaines sont connues pour être reprotoxiques (BPA, styrène, phtalates) et/ou cancérigènes probables ou reconnues (BPA, styrène, chlorure de vinyle) (Crain *et al.,* 2007; Endo *et al.,* 2005; Halden, 2010; Kwon *et al.,* 2015; Lithner *et al.,* 2011; Oehlmann *et al.,* 2009; Ohyama *et al.,* 2001; Papaleo *et al.,* 2011; Rios *et al.,* 2007). De plus, elles tendent à persister dans l'environnement aquatique du fait de leur faible biodégradabilité et à être bioaccumulées par les organismes marins. Ces composés chimiques ont été détectés dans les biomes aquatiques : la zone pélagique (Cladiere *et al.,* 2013; Kwon *et al.,* 2015; Rocha *et al.,* 2012; Saido *et al.,* 2014; Stachel *et al.,* 2003; Wolschke *et al.,* 2015), la zone intertidale (Kwon *et al.,* 2015; Saido *et al.,* 2014), la zone benthique (Llorca *et al.,* 2014; Stachel *et al.,* 2003) et au sein des communautés biologiques (Chu *et al.,* 2015; Fossi *et al.,* 2012, 2016; Jang *et al.,* 2016; Rochman *et al.,* 2014c; Santín *et al.,* 2016).

Des éléments chimiques intervenant dans la composition des plastiques ont été mesurés sur des fragments de plastique collectés dans l'océan ouvert (gyre subtropical du Pacifique Nord, Océan Pacifique et mer des Caraïbes) mais également sur les plages (USA, Costa Rica, Vietnam et Japon) dans des concentrations de 0,3 à 3 940 $ng.g^{-1}$ pour le nonylphénol (NP), 0,1 à 153 $ng.g^{-1}$ pour l'octyphénol (OP) et 0,02 à 9 900 $ng.g^{-1}$ pour les PBDE (Hirai *et al.,* 2011). Teuten *et al.* (2009) ont également détecté ces monomères et additifs sur des plastiques collectés dans le gyre subtropical du Pacifique Nord : OP (0,4 à 7 $ng.g^{-1}$), NP (24,9 à 2 660 $ng.g^{-1}$), BPA (5 à 284 $ng.g^{-1}$) et PBDE (0,4 à 57 $ng.g^{-1}$).

1.2. Des concentreurs de contaminants environnementaux

Depuis plusieurs décennies, l'accélération de l'industrialisation et de l'urbanisation a entrainé une production massive d'une grande variété de composés chimiques qui se retrouvent dans les systèmes aquatiques et tendent à s'y accumuler, persister et se bioaccumuler (Rochman, 2015). Plusieurs études s'intéressant à l'adsorption des contaminants sur les polymères ont montré l'existence d'une affinité entre contaminant et polymère. La forte affinité entre les contaminants hydrophobes et les plastiques n'est pas une chose nouvelle puisque ces derniers ont été utilisés comme échantillonneurs passifs pour

analyser la biodisponibilité des contaminants dans différentes matrices des systèmes aquatiques depuis les années 1990 (Adams *et al.,* 2007; Leslie *et al.,* 2013; Lohmann, 2012; Teuten *et al.,* 2007; E. L. Teuten *et al.,* 2009). Une étude récente menée par Ogata *et al.* (2009) utilise l'ubiquité des GPI et de leur forte affinité avec les contaminants hydrophobes pour réaliser un suivi des polluants organiques persistants (POP) sur des plages de l'ensemble de la planète (International Pellet Watch ; www.pelletwatch.org/). Jusqu'à présent, les contaminants identifiés sur les microplastiques sont les métaux et les composés chimiques hydrophobes parmi lesquels se trouvent les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides organochlorés (Ashton *et al.,* 2010; Takada, 2006) (Figure 9).

Les HAP sont des composés organiques détectés à la surface des microplastiques (Rios *et al.,* 2007; Rios Mendoza and Jones, 2015). Deux types de HAP sont distingués : les pétrogéniques qui sont des hydrocarbures présents dans les bruts pétroliers, d'origine naturelle, qui se caractérisent par une forte proportion d'hydrocarbures ramifiés ; et les pyrogéniques qui sont produits par combustion de matière organique. Les composés organochlorés comme les PCB et les pesticides sont également retrouvés à la surface des microplastiques (Hirai *et al.,* 2011; Rios *et al.,* 2010). Les PCB sont des organochlorés dérivés du biphényle. Ils sont utilisés en tant qu'isolant dans les systèmes fermés (fluides diélectriques dans les condensateurs et les transformateurs, liquides hydrauliques, fluides caloporteurs) et comme additifs dans les systèmes ouverts en tant que stabilisant et ignifugeant. Les pesticides organochlorés sont des composés organiques obtenus par la chloration de différents hydrocarbures insaturés (Juc, 2007), généralement utilisés comme insecticides, agent antimicrobien et contre les moisissures (dichlodiphényltrichloroéthane : DDT, l'hexachlorocyclohexane : HCH, l'hexachlorobenzène : HCB, l'aldrine, le chlordane, etc.). Utilisés dans le monde entier, bon nombre de ces pesticides se propagent dans l'environnement et contaminent toutes les matrices environnementales (air, eau, sol, organismes vivants) (Ricking and Schwarzbauer, 2012; Tanabe *et al.,* 1982). Enfin, bien qu'indispensables au métabolisme des êtres vivants, certains éléments traces métalliques (ETM) essentiels comme le fer (Fe), le chrome (Cr), le cuivre (Cu) ou le zinc (Zn) ou encore des ETM non essentiels comme le cadmium (Cd), le mercure (Hg) ou le plomb (Pb), souvent plus toxiques que les précédents, peuvent représenter une menace en cas de forte dose ou de chronicité d'exposition à de faibles doses (Wu *et al.,* 2016). La majorité de ces composés (HAP, PCB, pesticides et métaux) ont été classés comme polluants prioritaires par l'agence Américaine de Protection de l'Environnement (US EPA) en raison de leur grande toxicité.

De nombreux travaux ont mis en évidence la présence de PCB, HAP et pesticides sur les microplastiques quel que soit le compartiment des systèmes aquatiques dans lesquels ils ont été extraits : la zone pélagique (Hirai *et al.,* 2011; Rios *et al.,* 2007; Rios Mendoza and Jones, 2015) et la zone intertidale (Antunes *et al.,* 2013; Endo *et al.,* 2005; Frias *et al.,* 2010; Heskett *et al.,* 2012; Hirai *et al.,* 2011; Hosoda *et al.,* 2014; Jayasiri *et al.,* 2015; Le *et al.,* 2016; Mato *et al.,* 2001; Mizukawa *et*

al., 2013; Ogata *et al.,* 2009; Rios *et al.,* 2007; Van *et al.,* 2012; Wesch *et al.,* 2016). Les concentrations en contaminants chimiques (PCB, HAP et pesticides) associés aux microplastiques sont très variables d'un endroit à un autre (Tableau 3).

Rios *et al.* (2010) ont mesuré des HAP (nd - 14 459 $ng.g^{-1}$), PCB (nd - 2 856 $ng.g^{-1}$) et pesticides (nd - 454 $ng.g^{-1}$) sur des microplastiques collectés dans de le gyre subtropical du Pacifique Nord. Enfin, récemment une attention a été portée à la présence de métaux à la surface de GPI collectées en zone intertidale (Ashton *et al.,* 2010; Graca *et al.,* 2014; Holmes *et al.,* 2012; Nakashima *et al.,* 2012). Ashton *et al.* (2010) ont dosé des ETM sur des GPI collectés sur des plages (Plymouth, Angleterre) tels que les Fe (25,85 à 64,97 $\mu g.g^{-1}$), Al (7,05 à 49,79 $\mu g.g^{-1}$), Pb (0,15 à 1,08 $\mu g.g^{-1}$), Zn (0,42 à 2,34 $\mu g.g^{-1}$) et Cu (0,06 à 0,61 $\mu g.g^{-1}$).

Tableau 3 : Contaminants chimiques associés aux microplastiques collectés dans l'environnement marin (HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; PCB : polychlorobiphényle ; DDE : dichlorodiphényldichloroéthylène ; DDT : dichlodiphényltrichloroéthane ; HCH : hexachlorocyclohexane).

Matrice	Localisation	Echantillons	ΣHAP ($ng.g^{-1}$)	ΣPCB ($ng.g^{-1}$)	Pesticides ($ng.g^{-1}$)	Référence
Eau	Japon	Pellet (PP)	/	117	DDE : 3,1	Mato *et al*., 2001
	USA - Hawaï	fragment et pellet	9 200	nd	DDT : nd	Rios *et al*., 2007
	Gyre subtropical du Pacifique Nord	Fragment (PE)	< 100 - 959	1 - 23	DDE : 0,1 - 4,7	Teuten *et al*., 2009
	Gyre subtropical du Pacifique Nord	Fragments (PE et PP)	nd - 14 459	nd - 2 856	nd - 454	Rios *et al*., 2010
	Gyre subtropical du Pacifique Nord	Fragments PE Fragments PP	12 - 868 16 - 24	3 - 78 1 - 4	DDT : 0 - 2 DDT : 0,5 - 0,6	Hirai *et al*., 2011
	Océan Pacifique Nord	Fragments PP	112	14	DDT : 0,8	Hirai *et al*., 2011
	Mer des Caraïbes	Fragments PE Fragments PP	105 88	29 1	DDT : 4,8 DDT : 0,4	Hirai *et al*., 2011
	Gyre Pacifique Nord	Fragments (PE, PP, Nylon, PU)	nd - 846	nd - 223	/	Rios Mendoza and Jones, 2015
Sédiment	Japon	Pellet (PP)	/	3,97 - 97,5	DDE : 0,16 - 2	Mato *et al*., 2001
(plage)	Japon	Pellet (PE et PP)	/	nd - 2 300	/	Endo *et al*., 2005
	USA - Hawaï	fragment et pellet (PP)	nd - 6 200	nd - 980	DDT : nd - 1 100	Rios *et al*., 2007
	Japon	Fragment (PE)	60 - 9 370	12 - 254	DDE : 0,2 - 276	Teuten *et al*., 2009
	USA	Pellet (PE)	/	32 - 605	DDT : 5,09 - 267 HCH : < 0,94	Ogata *et al*., 2009
	Japon, Europe	Pellet (PE)	/	5 - 453	DDT : 2,16 - 11,7 HCH : 0,52 - 1,04	Ogata *et al*., 2009
	Australie	Pellet (PE)	/	16	DDT : 6,69 HCH : 0,14 - 0,19	Ogata *et al*., 2009

Afrique du sud	Pellet (PE)	/	41	DDT : 2,13 HCH : 33,9	Ogata *et al*., 2009
Grèce	Pellet (PE)	100-500*	nd - 290*	DDT : 1,1 - 42 HCH : 1,05 - 3,5*	Karapanagioti *et al*., 2011
Vietnam	Fragments PE	359 - 389	9 - 26	DDT : 11 - 108	Hirai *et al*., 2011
	Fragments PP	73 - 2 024	3 - 102	DDT : 14 - 99	
USA	Fragments PE	79 - 656	178 - 399	DDT : 4,1 - 7	Hirai *et al*., 2011
	Fragments PP	39 - 378	15 - 119	DDT : 2,2 - 8,4	
Costa Rica	Fragments PE	1 - 25	1 - 61	DDT : 0,6 - 23,2	Hirai *et al*., 2011
	Fragments PP	33 - 284	1 - 17	DDT : 1,6 - 124,4	
USA	Fragments et pellet (PS et autres)	30 - 1 900	nd - 47	DDT : nd - 76	Van *et al*., 2012
Portugal	Pellet (PE)	50 - 24 000*	10 - 310*	DDT : 0 - 49 HCH : 0 - 3,3*	Mizukawa *et al*., 2013
Portugal	Pellet (PE)	53 - 44 800	2 - 223	DDT : 0,42 - 41	Antunes *et al*., 2013
Brésil	Pellet	40,2 - 1 256	77,7 - 1 295	DDT : 8,9 - 441 HCH : 0,59 - 3,14	Taniguchi *et al*., 2016
Vietnam	Pellet	/	4 - 8	DDT : 12,3 - 14,1 HCH : 1,23	Le *et al*., 2016

* valeurs médianes

2. Des vecteurs de contaminants dans les systèmes aquatiques

2.1. Processus d'adsorption des contaminants

Les processus d'adsorption et de désorption sont influencés par le couple polymère – contaminant, ils sont dépendants du type de polymère, sa taille et le caractère hydrophobe du contaminant et les conditions environnementales (pH et salinité notamment) (Endo *et al.,* 2005; Teuten *et al.,* 2009).

Le type de polymère peut influencer les processus d'adsorption – désorption. Les polymères de type PE (haute et basse densité) et PP adsorberaient mieux les PCB et les HAP que les polymères de type PET et PVC (Endo *et al.,* 2005; Karapanagioti and Klontza, 2008; Rochman *et al.,* 2013; Teuten *et al.,* 2007). Les travaux de Bakir *et al.* (2014) montrent que l'équilibre d'adsorption du phénanthrène, de l' acide perfluorooctanoïque (PFOA), du DDT et des phtalates sur le PP, PE et le PVC est atteint au bout de 24 h sauf pour le couple PE – DDT où au moins 48h sont nécessaires. Une

autre étude proposée par Karapanagioti *et al.* (2010) montre des temps d'adsorption pour le PE et le PP plus long, 90 % de l'équilibre d'adsorption étant atteint au bout de 21 - 28, 49 - 128 et 63 - 105 jours pour le naphtalène, le pyrène et le phénanthrène, respectivement. Brennecke *et al.* (2016) ont montré que l'adsorption de cuivre était significativement plus importante sur le PVC (1 320,72 ± 268,60 $\mu g.g^{-1}$) que le PS (1 100,97 ± 273,23 $\mu g.g^{-1}$) après 14 jours d'incubation dans de l'eau de mer et sans traitement anti-fouling. Cette différence peut s'expliquer par une plus grande surface et polarité du PVC. Les travaux sur la cinétique d'adsorption des métaux par des GPI de polyéthylène menés par Holmes *et al.* (2012) ont montrés que l'équilibre d'adsorption était atteint en environ 1 à 4 jours. Rochman *et al.* (2014a) ont mené une étude sur la cinétique d'adsorption de métaux sur des microplastiques à long terme (1 à 12 mois) *in situ* (baie de San Diego, USA). Ils n'ont pas montré de différence d'adsorption des métaux entre les différents types de polymères exposés (HDPE, LDPE, PET, PVC, PP et PET). L'accumulation des métaux augmente au cours des 12 mois sans atteindre leur équilibre d'adsorption pour le HDPE. Pour le couple polyéthylène – PCB, plus l'épaisseur du polymère est importante plus le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption augmente (50 µm = 50 jours ; 3 mm de diamètre = 1 an) (Adams *et al.,* 2007; Mato *et al.,* 2001; Rochman *et al.,* 2013, 2014b).

Les processus de dégradation altèrent la structure des polymères et peuvent modifier leur capacité d'adsorption des contaminants. Mato *et al.* (2001) ont montré que l'altération de la surface et donc l'extension de la taille des pores rendent l'adsorption par les GPI plus efficace. Inversement, leur dégradation peut également modifier la structure de la matrice polymérique en la rendant plus cristalline. Cette modification peut diminuer la capacité d'adsorption des polymères (Karapanagioti and Klontza, 2008; Satoto *et al.,* 1997). De même, la décoloration des GPI et leur biofouling semblent influencer l'adsorption de contaminants hydrophobes tels que les PCB (Endo *et al.,* 2005). Ces différentes propriétés rendent les processus d'adsorption très complexes, *a fortiori* en raison de la multitude de polymères, contaminants et paramètres environnementaux pouvant interagir dans les systèmes aquatiques. Cela peut engendrer de fortes variabilités inter-microplastiques provenant du même endroit, mais également des variabilités spatiales et temporelles (Endo *et al.,* 2005).

Holmes *et al.* (2014) ont montré que la salinité peut influencer l'adsorption de métaux traces sur les polymères en l'augmentant ou la diminuant selon le métal concerné dans des conditions simulant un système estuarien. En plus de la salinité, le pH peut également modifier les processus d'adsorption/désorption (Bakir *et al.,* 2014). La présence de matière organique et de micro-organismes sur les microplastiques peut aussi influencer les processus de sorption des contaminants chimiques sur ces derniers, bien que ceci reste encore majoritairement non étudié (Hong *et al.,* 2017).

Jusqu'à présent, la plupart des travaux sur l'adsorption/désorption des contaminants à partir de microplastiques étaient orientés vers un seul composé chimique ce qui n'est pas représentatif des

conditions environnementales. Bakir *et al.* (2012) ont initié des travaux intégrant une variété de polluants et ont notamment montré un comportement de compétition entre le phénanthrène et le DDT (effet antagoniste) pour l'adsorption sur du PE et du PVC.

2.2. Le rôle des microplastiques dans le transfert de contaminants chez les organismes aquatiques

De nombreuses études se sont intéressées aux microplastiques comme vecteurs de contaminants dans les organismes marins. En plus des effets physiques que leur ingestion peut engendrer (cf. Chapitre I - D), les microplastiques pourraient représenter une voie potentielle de transfert de polluants vers les organismes vivants (Mato *et al.,* 2001; Thompson, 2004). L'ingestion de microplastiques peut entrainer la désorption des contaminants ajoutés dans la matrice polymérique lors de la conception des polymères mais également de ceux adsorbés dans les matrices environnementales dans lesquelles ils ont antérieurement séjourné (Fossi *et al.,* 2012; Mato *et al.,* 2001; Oliveira *et al.,* 2013; Teuten *et al.,* 2007; E. L. Teuten *et al.,* 2009; Thompson, 2004). Une étude simulant les conditions digestives (Bakir *et al.,* 2014) a également mis en évidence une désorption des POP. Teuten *et al.* (2007) ont montré chez un organisme de faible niveau trophique (*Arenicola marina*) que la présence de surfactant digestif augmente le taux de désorption du phénanthrène (HAP) adsorbé sur les microplastiques et donc accroît sa biodisponibilité. L'ingestion de microplastiques représente donc une voie de transfert des contaminants vers la chaine trophique, en plus des voies d'exposition déjà existantes comme le régime alimentaire, la matière organique, et l'eau de mer. Plusieurs études expérimentales ont montré le transfert de contaminants via l'ingestion de microplastiques par des organismes vivants de différents niveaux trophiques : notamment les moules (Avio *et al.,* 2015a), les arénicoles (Besseling *et al.,* 2012), et les poissons (Oliveira *et al.,* 2013; Rochman *et al.,* 2013). Des études récentes montrent expérimentalement que les microplastiques peuvent modifier l'élimination, la biotransformation et la toxicité des polluants (Oliveira *et al.,* 2013; Paul-Pont *et al.,* 2016). En effet, la présence de microsphères de PE retarde de plusieurs heures la mortalité induite par le pyrène (exposition à des concentrations environnementales) chez les juvéniles de gobie commun (*Pomatoschistus microps*), et entraîne une augmentation de la concentration en métabolites de pyrène dans la bile (Oliveira *et al.,* 2013). Chez le modèle bivalve *Mytilus* spp., l'exposition combinée aux microplastiques de PS et au fluoranthène (HAP) induit une sous-expression d'un gène codant pour une P-glycoprotéine impliquée dans les mécanismes de détoxication ainsi qu'une dépuration plus lente du polluant organique par rapport aux individus exposés au fluoranthène seul. Cependant, Paul-Pont *et al.* (2016) ont montré que le transfert et la bioaccumulation du fluoranthène via les microplastiques chez les moules restent négligeables en comparaison avec l'apport par voie directe et trophique. De même, une étude récente menée *in situ* par Herzke *et al.* (2016) a permis d'évaluer l'impact des microplastiques comme source de transfert de polluants organiques persistants dans les tissus du fulmar en Mer du Nord et ne montre

aucune différence significative dans l'accumulation des POP dans les tissus des fulmars en fonction de la quantité de microplastiques présents dans l'estomac.

La majorité de ces études ne prennent pas en compte les autres voies d'exposition possibles. Tout comme nombre d'entre elles exposent les organismes vivants à de très fortes concentrations en microplastiques peu représentatives des niveaux de contamination mesurés *in situ*, peu d'études essaient de replacer les microplastiques parmi les autres voies potentielles d'exposition des organismes vivants aux contaminants afin d'en estimer les risques potentiels. Bien que parfois la concentration de ces contaminants adsorbés sur les microplastiques puisse dépasser celles retrouvées dans le milieu environnant (eau, sédiment) d'un facteur variant de 10^1 à 10^6 (Mato *et al.,* 2001; Teuten *et al.,* 2007), si l'on compare le volume des plastiques présents dans les systèmes aquatiques à celui des autres matrices pouvant transférer les contaminants, cela reste négligeable (Koelmans *et al.,* 2016). En 2011, Gouin *et al.* proposent une approche thermodynamique basée sur le principe de fugacité permettant d'évaluer les différentes voies d'apport de contaminants dans les systèmes aquatiques. Pour cela, ils s'intéressent à la distribution des contaminants dans les différentes matrices représentatives de l'environnement marin : l'air, l'eau, le carbone organique et le polyéthylène sélectionné pour représenter les microplastiques, et prend en considération les volumes représentés par chacune de ces matrices. Ce modèle est représentatif d'un système côtier dont les dimensions concordent avec la zone nord-ouest des îles hawaïennes. Il est basé sur des données environnementales réalistes, par exemple le volume de plastiques intégré au modèle (55 m^3) est basé sur les résultats d'observation de Dameron *et al.* (2007). Le ratio entre chaque compartiment est le suivant, 6,6 x 10^{12} (air) : 6,55 x 10^{10} (eau) : 1,26 x 10^7 (carbone organique) : 1 (polyéthylène). Dans l'approche thermodynamique de Gouin *et al.* (2011), la présence de microplastiques (polyéthylène) dans le régime alimentaire d'un poisson piscivore entraine une diminution de la concentration en contaminants dans l'organisme. Cela est propre aux matériaux non-dégradables car dans le cas de la matière organique (dégradée par le système digestif) et en l'absence de polyéthylène, cela engendre un transfert des contaminants vers l'organisme. En considérant les niveaux actuels de contamination des systèmes aquatiques par les microplastiques, et leur proportion relative faible par rapport à d'autres matières particulaires minérales et organiques, l'apport de contaminant via les microplastiques dans la chaîne trophique semble donc négligeable en comparaison avec les autres sources existantes (Koelmans *et al.,* 2016). Le problème peut être différent pour les additifs qui sont exclusivement apportés par les matériaux plastiques. Fossi *et al.* (2012) suggèrent ainsi l'utilisation des concentrations de certains additifs (phtalates) comme traceur de l'exposition des organismes marins aux déchets plastiques.

D. Une menace pour les organismes marins

1. Interaction entre les microplastiques et les microorganismes marins

Les propriétés intrinsèques des plastiques (flottabilité, persistance) ainsi que leur caractère ubiquitaire favorisent leur colonisation par de nombreux organismes marins, et leur capacité d'être transporté sur de longues distances augmente le risque d'introduction d'organismes toxiques et/ou invasifs dans de nouveaux milieux (Goldstein *et al.,* 2012). Les débris de plastiques peuvent devenir un substrat pour des organismes macrobenthiques appartenant aux groupes taxonomiques des arthropodes, mollusques, bryozoaires et cnidaires (Bryant *et al.,* 2016; Goldstein *et al.,* 2014), mais également pour des microorganismes bactériens, fongiques et planctoniques (Figure 10) (Zettler *et al.,* 2013). La dispersion de ces micro-organismes via les microplastiques dans l'environnement marin pourrait ainsi aggraver la contamination des zones littorales par des microorganismes nuisibles et/ou pathogènes et entraîner l'apparition d'espèces non indigènes pouvant devenir invasives (Barnes, 2002).

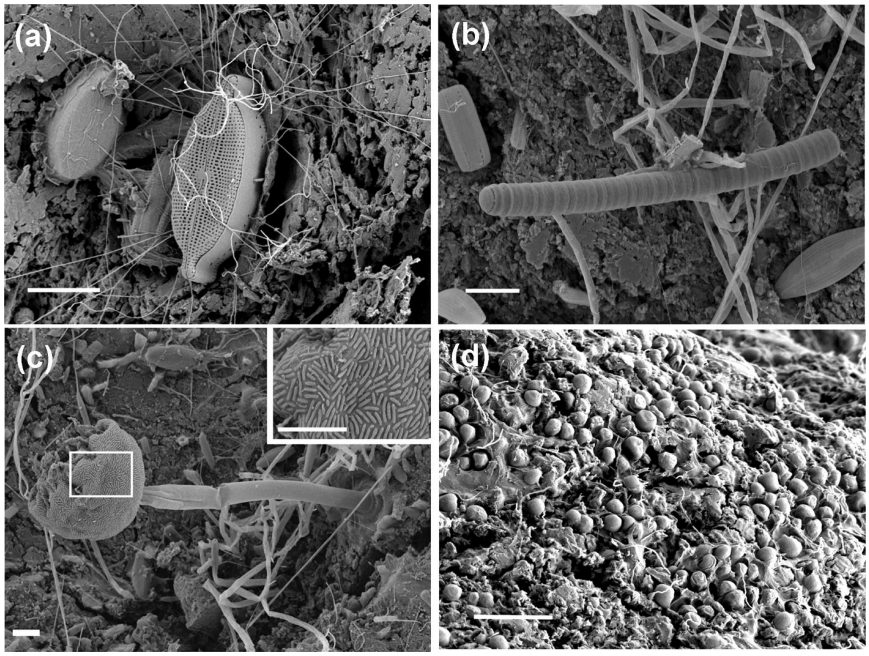


Figure 10 : Photos obtenues par microscopie électronique à balayage montrant la diversité des biofilms bactériens développés à la surface des débris de plastiques collectés dans l'environnement marin : (a) diatomée pennée avec de possibles filaments produits par des bactéries appartenant au genre *Hyphomonas*, (b) cyanobactéries filamenteuses, (c) au premier plan, un cilié suctorien couvert de bactéries ectosymbiotiques (zoom rectangle blanc) avec des diatomées et des cellules filamenteuse, (d) cellules microbiennes incrustées à la surface d'un débris de plastique. Les barres d'échelle représentent 10 µm (Zettler *et al.,* 2013).

Les microplastiques peuvent constituer un nouvel habitat favorable pour les organismes marins et être colonisés par des micro-organismes tels que certains dinoflagellés responsables d'efflorescences toxiques (*Harmful Algal Bloom* ou HAB) (*Alexandrium taylori* ; *Ostreopsis* sp. ; *Coolia* sp.) (Maso *et*

al., 2003), des bactéries dont certaines peuvent être pathogènes pour les organismes marins (*Vibrio*) (Zettler *et al.,* 2013) et des bactéries pouvant dégrader les hydrocarbones (Bryant *et al.,* 2016) et les polymères comme les bactéries (*Pseudomonas)* qui ont la capacité de dégrader le PVA (McCormick *et al.,* 2014; Shimao, 2001). La présence de bactéries du genre *Vibrio* a été décrite à plusieurs reprises sur des débris de plastiques collectés dans l'environnement marin et dans une abondance pouvant atteindre jusqu'à 24 % de la communauté bactérienne (Kirstein *et al.,* 2016; Oberbeckmann *et al.,* 2016; Schmidt *et al.,* 2014; Zettler *et al.,* 2013). Récemment, une spécificité des communautés bactériennes présentes sur les microplastiques a été démontrée en comparaison avec les communautés présentes dans l'eau de mer ou sur d'autres substrats (Schmidt *et al.,* 2014) ce qui suggère l'existence d'une nouvelle niche écologique récemment appelé « Plastisphere » (Bryant *et al.,* 2016; Reisser *et al.,* 2014; Schmidt *et al.,* 2014; Zettler *et al.,* 2013).

Récemment, Oberbeckmann *et al.* (2014) ont observé une variabilité spatio-temporelle et polymère-dépendante des communautés microbiennes composant la « Plastisphere » sur des bouteilles de PET, après une exposition de six semaines en mer du Nord, ainsi que sur des débris de plastiques collectés dans les eaux d'Europe du Nord. Un biofilm microbien peut se former à la surface du PE après une immersion de seulement une semaine dans l'eau de mer (Lobelle and Cunliffe, 2011) ou du sédiment marin côtier (Harrison *et al.,* 2014). Cette colonisation peut entrainer des modifications des propriétés physico-chimiques des plastiques en les rendant plus hydrophiles et en diminuant leur flottabilité (Lobelle and Cunliffe, 2011).

De manière générale, bien que la formation de biofilms bactériens ainsi que leurs rôles dans les processus de dégradation et de sédimentation des gros débris plastiques aient été examinés par différents auteurs (Andrady, 2011; Lobelle and Cunliffe, 2011; Muthukumar *et al.,* 2011; Shah *et al.,* 2008), les études sur la colonisation des microplastiques, et son rôle dans les mécanismes de dégradation, sédimentation et transfert dans les chaines trophiques restent rares (Wright *et al.,* 2013). Les interactions entre microplastiques et microorganismes seront discutées plus en détails dans le Chapitre V-A.

Récemment, l'intégration de microplastiques dans les agrégats de phytoplancton a mis en évidence un changement dans le comportement de ces derniers en modifiant leur vitesse de sédimentation et en affectant de ce fait leur distribution et leur biodisponibilité dans la colonne d'eau (Lagarde *et al.,* 2016; Long *et al.,* 2015). Les effets observés dans ces deux études sont de plus apparus polymère et espèce dépendants. L'intégration de microplastiques dans un agrégat formé par la diatomée *Chaetoceros neogracile* induit une diminution de la vitesse de sédimentation de cet agrégat de 473 à 165 $m.j^{-1}$, alors que dans un agrégat composé du cryptophyte *Rhodomonas salina*, la présence de microplastiques entraîne une augmentation de la vitesse de sédimentation de cet agrégat de 76 à 125 $m.j^{-1}$ (Long *et al.,* 2015).

2. Ingestion de microplastiques par les organismes marins

L'ingestion de microplastiques peut être directe via des mécanismes de filtration pour les suspensivores (particules en suspension dans l'eau ou incorporées dans des agrégats marins), d'ingestion non sélective pour les détritivores et déposivores via le sédiment (particules confondues avec la matière organique) ou suite à une confusion avec les proies pour les carnivores ; mais également indirecte via un transfert le long de la chaîne trophique (Figure 12) (Choy and Drazen, 2013; de Sá *et al.,* 2015; Wright *et al.,* 2013). Certains organismes déposivores, tels que les holothuries, semblent sélectionner volontairement les microplastiques au détriment du sédiment (Graham and Thompson, 2009). Plusieurs facteurs intrinsèques aux microplastiques peuvent affecter la biodisponibilité des microplastiques dans l'environnement aquatique : la taille des particules, leur densité, leur abondance, leur couleur, leur charge et leur biofouling (Wright *et al.,* 2013). Le large spectre de taille des débris de plastiques présents dans l'environnement représente une menace pour l'ensemble de la chaine trophique, des consommateurs primaires aux grands prédateurs (Figure 3).

2.1. In situ

De nombreuses études *in situ* ont mis en évidence l'ingestion (directe ou indirecte) de microplastiques par des organismes marins appartenant aux premiers maillons de la chaîne alimentaire jusqu'aux grands prédateurs (Lusher, 2015). Les microplastiques sont ingérés par les consommateurs primaires tels que les organismes suspensivores, les détritivores et les déposivores (Besseling *et al.,* 2012, 2015; Davidson and Dudas, 2016; Desforges *et al.,* 2014; Devriese *et al.,* 2015; Rochman *et al.,* 2015; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Welden and Cowie, 2016), les consommateurs secondaires tels que les téléostéens pélagiques et démersaux (Foekema *et al.,* 2013; Lusher *et al.,* 2013; Nadal *et al.,* 2016; Phillips and Bonner, 2015), les reptiles (Bellas *et al.,* 2016; Foekema *et al.,* 2013; Lusher *et al.,* 2013; Nadal *et al.,* 2016), les céphalopodes (Braid *et al.,* 2012; Cannon *et al.,* 2016), les prédateurs tels que les oiseaux marins (Brandao *et al.,* 2011; Eriksson and Burton, 2003) et les mammifères marins (Brandao *et al.,* 2011; Lavers *et al.,* 2014; Provencher *et al.,* 2014) (Figure 12 ; Tableau 4).

Les microplastiques, retrouvés dans les organismes marins dans des concentrations très variables d'une étude à une autre, sont également retrouvés dans des espèces d'intérêt commercial comme la moule commune (*Mytilus edulis*), l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et la crevette grise (*Crangon crangon*) ce qui pose la question des niveaux d'exposition liés aux produits de la mer consommés par l'Homme (Tableau 4) (De Witte *et al.,* 2014; Devriese *et al.,* 2015; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014).

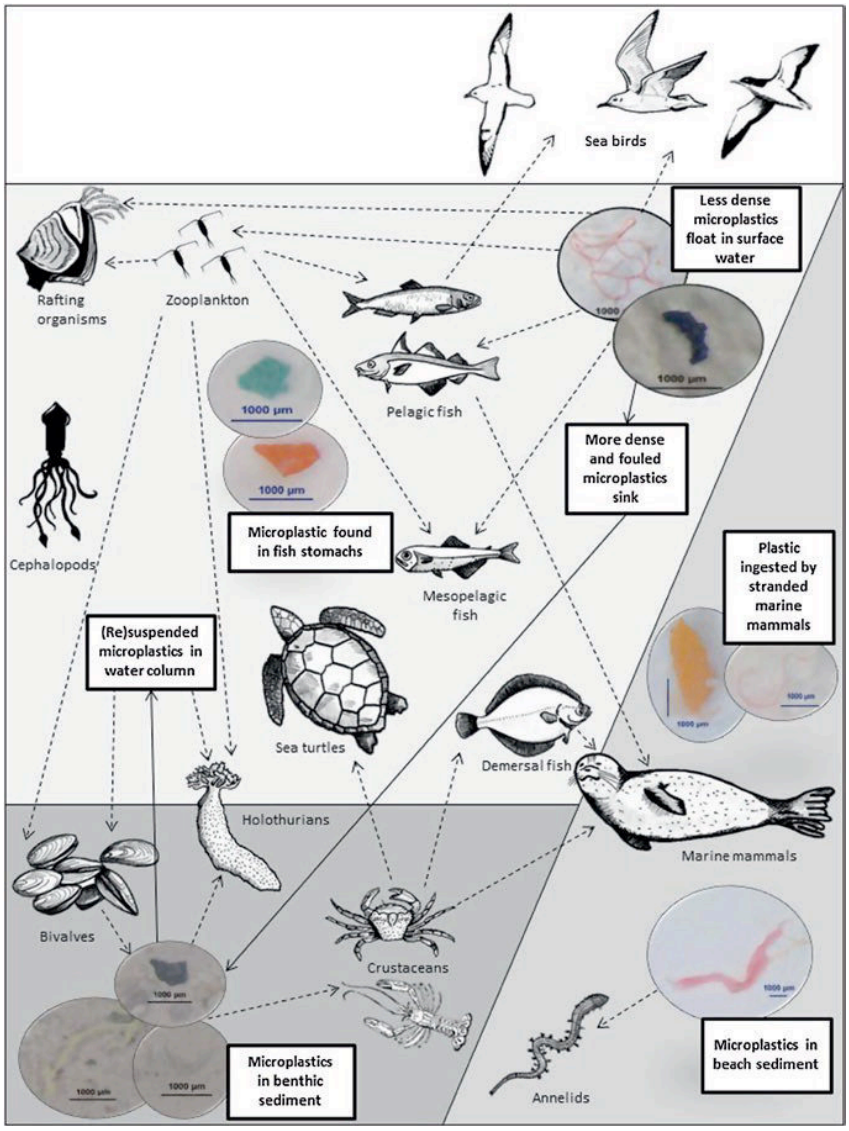


Figure 11 : Les interactions entre les microplastiques et les organismes marins via les facteurs environnementaux (trait noir) et les facteurs biologiques (trait en pointillé) soulignant un potentiel transfert trophique (Lusher, 2015).

Tableau 4 : Microplastiques ingérés par des organismes vivants de différent niveau taxonomique (GPI : granulé plastique industriel).

Groupe taxonomique	Espèce	Contamination (n= nombre total d'individus)	Types de microplastiques	Concentration	Site	Référence
Mollusques	*Dosidicus gigas*	26,7 % (n = 30)	GPI (3 - 5 mm)	Max : 11 par individu	Colombie britannique, Canada	(Braid *et al.,* 2012)
	Mytilus edulis	(n = 45)	Fibres (300 - 1 000 µm)	3,7 pour 10 g de moule	Belgique, Pays-Bas	(De Witte *et al.,* 2014)
	Mytilus edulis	(n = 36)	5 - 25 µm	0,36 (± 0,07) part.g^{-1}	Mer du Nord, Allemagne	(Van Cauwenberghe and Janssen, 2014)
	Crassostrea gigas	(n=11)	5 - 25 µm	0,47 (± 0,16) part.g^{-1}	Océan Atlantique	(Van Cauwenberghe

						and Janssen, 2014)
Arthropodes	*Neocalanus cristatus Euphausia pacificas*	-	particules	1 part pour 7 individus	Océan Pacifique (Nord Est)	(Desforges *et al.,* 2015)
	Lepas spp.	33,5 % (n = 385)	1,41 mm	1 - 30 par individu	Pacifique Nord	(Goldstein and Goodwin, 2013)
	Nephrops norvegicus	83 % (n = 120)	-	-	Clyde, Royaume-Unis	(Murray and Cowie, 2011)
	Crangon crangon	(n = 110)	95 % de fibres, 5 % de films (300 - 100 µm)	11,5 fibres pour 10 g de crevette	Belgique	(Devriese *et al.,* 2015)
Chordés						
Reptiles	*Chelonia mydas*	(n = 24)	GPI (< 5 mm)	Total = 11	Rio Grande do Sul, Brésil	(Tourinho *et al.,* 2010)
Actinoptérygiens	*Clupea harengus*	2 % (n = 566)	0,5 - 3 mm	1 - 4 par individu	Mer du Nord	(Foekema *et al.,* 2013)
	Clupea harengus	37,5 % (n = 16)	1,14 - 2,5 mm	-	Alappuzha, Inde	(Kripa *et al.,* 2014)
	Merlangius merlangus	32 % (n = 50)	2,2 (±2,3) mm	1,75 (± 1,4) part.g^{-1}	La Manche	(Lusher *et al.,* 2013)
	Trachurus trachurus	28,6 % (n = 56)	2,2 (±2,2) mm	1,5 (± 0,7) part.g^{-1}	La Manche	(Lusher *et al.,* 2013)
Oiseaux marins	*Calonectris diomedea*	83 % (n = 85)	3,9 (±3.5) mm	8 (± 7,9) part.g^{-1}	Iles Canaries, Espagne	(Rodríguez *et al.,* 2012)
	Fulmarus glacialis	93 % (n = 176)	Fragments and pellets	26,6 (± 37,5) part.g^{-1}	Nouvelle-Ecosse, Canada	(Bond *et al.,* 2014)
	Puffinus gravis	88 % (n = 84)	Fragments and pellets	11,8 (± 16,9) part.g^{-1}	Nouvelle-Ecosse, Canada	(Bond *et al.,* 2014)

2.2. Données expérimentales

Les microplastiques balaient une large gamme de taille et densité ce qui leur permet d'occuper l'ensemble de la colonne d'eau (pélagique, benthique et abyssale) et favorise leur biodisponibilité pour les organismes marin de tous les niveaux trophiques (Wright *et al.,* 2013). Les études expérimentales ont montré que les microplastiques pouvaient être ingérés par des organismes vivants de différents niveaux trophiques, des consommateurs primaires comme le zooplancton, les bivalves, les balanes, les polychètes et les bryozoaires (Browne *et al.,* 2008; Cole *et al.,* 2013; Mazurais *et al.,* 2015; Paul-Pont *et al.,* 2016; Setälä *et al.,* 2014; Sussarellu *et al.,* 2016; Thompson, 2004; Ward and Shumway, 2004) mais également par les déposivores et détritivores (Graham and Thompson, 2009; Thompson, 2004).

La taille est un facteur important dans l'ingestion des microplastiques par les organismes vivants. Par exemple, plusieurs organismes zooplanctoniques (copépodes, tuniciés, larves de mollusques, micro-zooplancton) ingèrent préférentiellement des billes de polystyrène de 7,3 µm plutôt que celles de 20,6 µm) (Cole *et al.,* 2013). Une ingestion préférentielle des microplastiques de 6 µm *versus* 2 µm a

également été montrée chez des huîtres exposées à des microbilles de polystyrène (Sussarellu *et al.,* 2016) expliquée par le mécanisme de sélection des particules sur le filtre branchial qui est en accord avec leur optimum sur la taille des microalgues retenues sur le filtre branchial (Ward and Shumway, 2004).

Récemment, une étude expérimentale a montré que le devenir des microplastiques dans l'organisme après avoir été ingérés peut être influencé par la forme des particules. En effet, l'exposition de l'amphipode *Daphnia magna* à différents types de microplastiques (particules et fibres) a montré que les microfibres de PP auraient des effets plus néfastes que les microparticules de PE, notamment dû à leur temps de résidence plus long dans le système digestif (Ogonowski *et al.,* 2016).

3. Devenir des microplastiques ingérés

Une fois ingérés par les organismes marins, les microplastiques peuvent s'accumuler dans le système digestif. En effet, après ingestion de fibres synthétiques par des langoustines communes (*Nephrops norvegicus*) collectées dans la mer de Clyde (Royaume-Unis), celles-ci s'entremêlent et forment des nœuds et des pelotes qui s'accumulent et obstruent le système digestif (Murray and Cowie, 2011).

De nombreuses études s'intéressant aux potentiels impacts de l'organisation biologique des organismes vivants après ingestion des microplastiques montrent une faible accumulation de ces particules dans l'organisme due à leur rapide excrétion via le système digestif (Cole and Galloway, 2015; Grossmann, 2014; Gutow *et al.,* 2016; Haemer *et al.,* 2014; Kaposi *et al.,* 2014; Mazurais *et al.,* 2015; Paul-Pont *et al.,* 2016; Sjollema *et al.,* 2016; Ugolini *et al.,* 2013; Watts *et al.,* 2014, 2016). Cependant, les microplastiques utilisés dans ces études, des microbilles de plastiques lisses et sphérique, ne sont pas représentatifs des microplastiques présents dans l'environnement aquatique et peuvent être évacués plus facilement que ces derniers (Mazurais *et al.,* 2015). Enfin, Browne *et al.* (2008) ont montré que les microbilles de plastiques de PS (3 et 9,6 µm) pouvaient être transloquées du système digestif au système circulatoire (hémolymphe et hémocytes) après trois jours d'exposition et y persister plus de 48 h.

Le transfert trophique des microplastiques chez les consommateurs primaires a été mis en évidence : Gutow *et al.* (2016) ont montré que les microplastiques en suspension dans l'eau adhèrent à la surface de la macrophyte (*Fucus vesiculosus*) avant d'être ingérés par le bigorneau (*Littorina littorea*) lors de sa prise alimentaire. Ce transfert trophique a également été démontré chez les consommateurs secondaires via le transfert de microbilles de PS chez des crabes (*Carcinus maenas*) suite à l'ingestion de moules bleues (*Mytilus* edulis) préalablement exposées aux microplastiques (Farrell and Nelson, 2013). Cela a également été observé lors de l'ingestion de mésozooplancton par des crevettes (*Neomysis integer*) (Setälä *et al.,* 2014). La biodisponibilité des particules peut être modifiée

lorsqu'elles sont intégrées dans des agrégats de phytoplancton, facilitant ainsi leur transfert trophique (Lagarde *et al.,* 2016; Long *et al.,* 2015). Ward et Kach (2009) ont montré que l'ingestion de nanoplastiques (100 nm PS) chez la moule était facilitée lorsqu'ils étaient incorporés dans des agrégats marins. Les microplastiques peuvent également être rendus biodisponibles pour les organismes coprophages une fois piégés dans les pelotes fécales après ingestion par le zooplancton (Cole *et al.,* 2016).

4. Impacts dus à l'exposition aux microplastiques

L'ingestion de microplastiques peut altérer l'ensemble de la hiérarchie de l'organisation biologique : des communautés biologiques (de la biosphère aux organismes), à l'organisme (de l'organisme à la cellule) et l'organisation cellulaire (de la cellule à la molécule) (Lusher, 2015; Rochman *et al.,* 2016; Wright *et al.,* 2013).

L'ingestion de microplastiques par les organismes marins peut altérer la structuration des communautés et le fonctionnement d'écosystèmes. Récemment, l'exposition des huîtres plates européennes (*Ostrea edulis*) à des microplastiques (80 $\mu g.l^{-1}$) biodégradables (PLA) et conventionnels (PEHD) a induit une altération de la structure de l'assemblage des communautés benthiques associées en réduisant la richesse spécifique et l'abondance des communautés benthiques (Green, 2016). Une réduction de l'ammonium de l'eau interstitielle et de la biomasse des cyanobactéries benthiques a également été observée suite à l'exposition de l'huître (*Ostrea edulis*) à des microplastiques (2,5 et 25 $\mu g.l^{-1}$). Ajouté à cela, une modification de l'assemblage de la faune benthique associée a également été observée avec une diminution de l'abondance des polychètes et une augmentation de l'abondance des oligochètes (Green *et al.,* 2017).

L'ingestion de microplastiques par les organismes marins peut altérer leurs fonctions physiologiques comme la nutrition, la respiration et la reproduction. La fonction de nutrition peut rapidement être altérée suite à l'ingestion de microplastiques. La prise alimentaire du crabe (*Carcinus maenas*) a été réduite de 0,33 à 0,03 $g.j^{-1}$ après quatre semaines d'exposition à des microfibres de PP (Watts *et al.,* 2015). Cette diminution de la prise alimentaire suite à l'ingestion de microplastiques a été montré chez le zooplancton marin, les annélides (*Arenicola marina*) et les crustacés (*Daphnia magna*) (Besseling *et al.,* 2012; Cole *et al.,* 2013; Wright *et al.,* 2013). Cette diminution de la prise alimentaire peut être due à une obstruction du système digestif qui induit une sensation de satiété. En effet, des fibres emmêlées et formant des nœuds et des pelotes ont été retrouvées accumulées et obstruant le système digestif la langoustine commune (*Nephrops norvegicus*) (Murray and Cowie, 2011). Des perturbations digestives, suite à l'exposition à des microsphères de PS, ont aussi été observées chez les moules et les huîtres (Paul-Pont *et al.,* 2016; Sussarellu *et al.,* 2016). Une augmentation des taux de filtration a été

observée chez l'huître en réponse à l'exposition à des microbilles de polystyrène expliquée comme un effort pour augmenter la prise alimentaire réduite liée à la présence de microplastiques dans le tractus digestif (Sussarellu *et al.,* 2016). De telles atteintes au niveau de la prise alimentaire et du métabolisme digestif peuvent entrainer une diminution de l'entrée d'énergie nécessaire au soutien de fonctions physiologiques majeures telles que la respiration, la nutrition, la croissance et la reproduction. C'est le cas de la croissance : une exposition chronique de l'amphipode (*Hyalella azteca*) à des microparticules de polyéthylène et des microfibres de polypropylène a significativement réduit leur taux de croissance (Au *et al.,* 2015).

L'exposition des organismes marins aux microplastiques peut aussi altérer la fonction de reproduction. Des huîtres exposées pendant deux mois en laboratoire à des microparticules de PS ont eu une reproduction affectée : moins d'ovules produits (réduction de 40 %) et des spermatozoïdes moins mobiles, ce qui est un indicateur de leur qualité. *In fine*, l'efficacité de reproduction, mesurée par le taux de larves D, a été diminuée de 41 %. Des conséquences sur la génération suivante ont également été observées avec une croissance larvaire diminuée de 18 % entrainant un retard dans la fixation des larves de 6 jours (Sussarellu *et al.,* 2016). La survie des organismes marins peut aussi être affectée. Une baisse significative de la survie a été relevée chez des larves de bar corrélée au nombre de microbilles de PE (10^5 MP.g^{-1}) détectées dans ces mêmes larves (Mazurais *et al.,* 2015).

Enfin, les niveaux cellulaires et moléculaires peuvent aussi être altérés par l'exposition aux microplastiques. Des altérations tissulaires (inflammation, infiltration, vacuolisation) ont été observés chez des moules exposées à des microbilles de PS, en parallèle d'une augmentation de la mortalité des hémocytes (cellules impliquées dans le système immunitaire mais aussi dans les processus de nutrition, détoxification et maintien de l'homéostasie) et d'une modification du métabolisme oxydatif (Paul-Pont *et al.,* 2016). L'exposition chronique du bar (*Dicentrarchus labrax*) à des GPI de PVC a montré des altérations pathologiques de la partie distale de l'intestin (Pedà *et al.,* 2016). Une altération du système endocrinien a été observé chez le medaka japonais (*Oryzias latipes*) exposé à des microparticules de PE avec une modification significative de l'expression des gènes régulant la production de vitellogénine (femelles) et de choriogénine (mâles) (Rochman *et al.,* 2014b). Une perturbation du système endocrinien a également été détectée chez les huîtres exposées à des microbilles de PS, avec des modifications de l'expression de gènes impliqués dans les voie de la régulation insulinique et des glucocorticoïdes, probablement à l'origine des perturbations de la qualité des gamètes mâles et femelles détectée chez les adultes exposés (Sussarellu *et al.,* 2016). Enfin, un stress oxydatif a été détecté suite à l'exposition du poisson zèbre (*Danio rerio*) à des microparticules de PS pendant 7 jours (Lu *et al.,* 2016). von Moos *et al.* (2012) ont montré une forte réponse inflammatoire (formation de granulocytes) et une déstabilisation de la membrane lysosomale chez la moule bleue (*Mytilus edulis*) après 6 h d'exposition à des microplastiques de PE.

- CHAPITRE II -

Présentation de la rade de Brest

A. Cadre géographique et bathymétrie 85

B. Description des masses d'eau 87
1. Hydrologie 87
1.1. Température 87
1.2. Salinité 87
2. Hydrodynamique 88
2.1. Circulation tidale 88
2.2. Circulation résiduelle 91

C. Description des substrats 92
1. Diversité et répartition des faciès sédimentaires 92
2. Dynamique sédimentaire 93

D. Diversité biologique 95

E. Activités socio-économiques 96

A. Cadre géographique et bathymétrie

La rade de Brest (48° 10' - 48° 25' N, 4° 10' - 4° 35' W) est une vaste étendue d'eau située à l'extrémité nord-occidentale de la France. Ce bassin maritime semi-fermé s'ouvre à l'ouest sur la mer d'Iroise via un étroit chenal, le Goulet (6 km de long, 1,8 km de large, ~50 m de profondeur) (Monbet and Bassoulet, 1989). La rade est entourée de six bassins versants dont la surface totale est de 2 645 km^2. Les deux principaux sont ceux de l'Aulne (1 821 km²) sur la rive sud et de l'Elorn (environ 380 km²) sur la rive nord, et les quatre autres sont les suivants : le bassin septentrional (95 km^2), le bassin de Plougastel (29 km^2), le bassin oriental (286 km^2) et le bassin méridional de la rade (34 km^2) (Troadec *et al.,* 1997) (Figure 12).

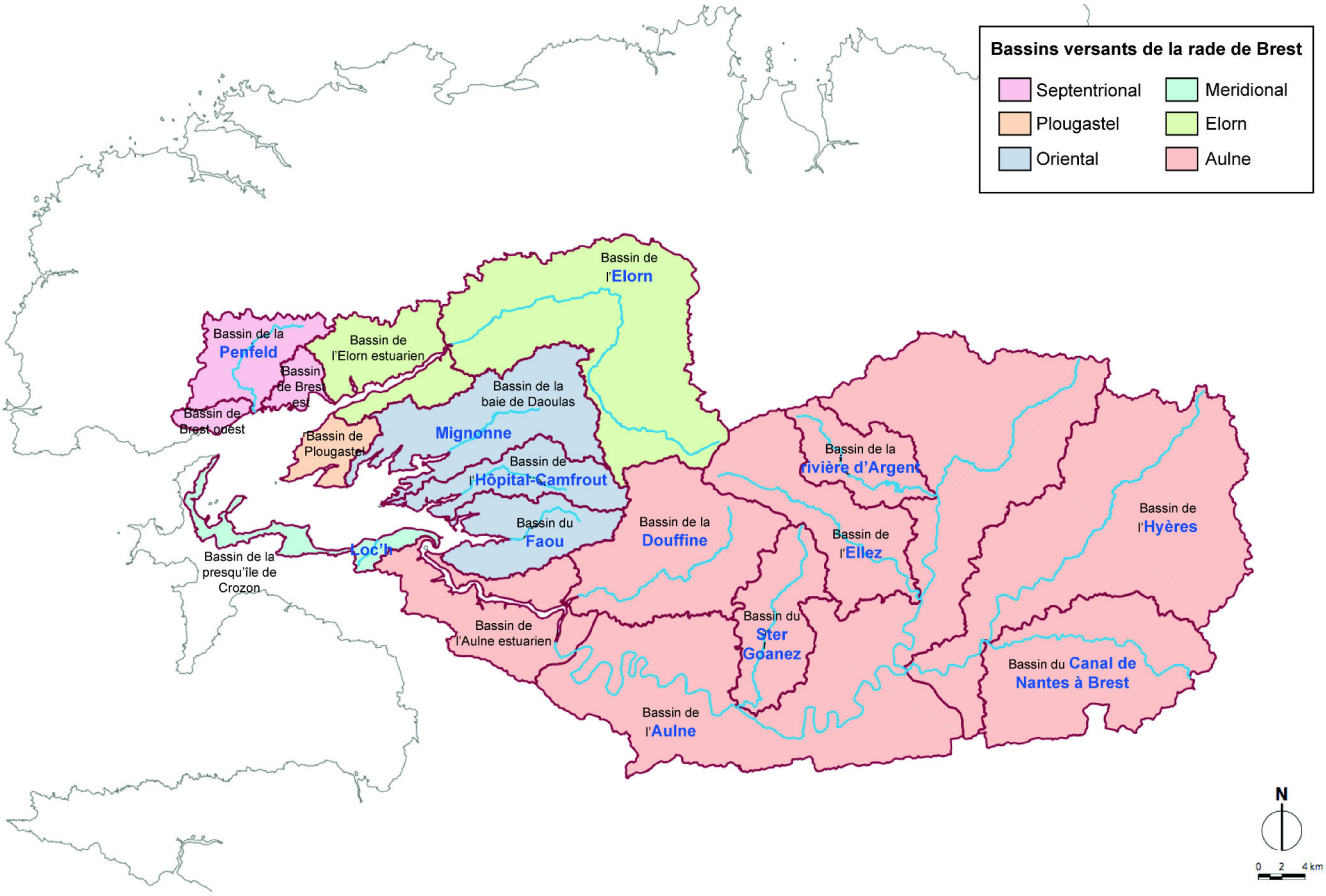


Figure 12 : Composition des bassins et sous-bassins versants de la rade de Brest. Les principaux cours d'eau à l'origine des bassins versants sont écrits en bleu (modifiée d'après Troadec *et al.,* 1997).

Ce système côtier est soumis à l'influence des eaux maritimes en provenance de la mer d'Iroise et des eaux fluviales fournies par les deux principaux fleuves qui s'y jettent, l'Aulne (débit moyen de 27,70 m^3.s^{-1}) et l'Elorn (débit moyen de 6,88 m^3.s^{-1}) (Delmas, 1981). La rade est soumise à un important

régime macrotidal (marnage variant entre 2,8 m et 8,24 m selon les périodes de mortes eaux et vives eaux) qui fait osciller sa superficie de 150 à 180 km² et son volume d'eau de 1,65 à 2,94 milliards de m^3 (Delmas, 1981). La rade de Brest est un système marin peu profond avec 13 % des fonds qui sont situés sous l'isobathe des 20 m et 52 % des fonds n'excédant pas 5 m. L'ensemble des chenaux des différents fleuves se jetant en rade de Brest dont ceux de l'Aulne (30 m) et de l'Elorn (15 m) se rejoignent en un chenal commun qui se poursuit au-delà du goulet (Figure 13).

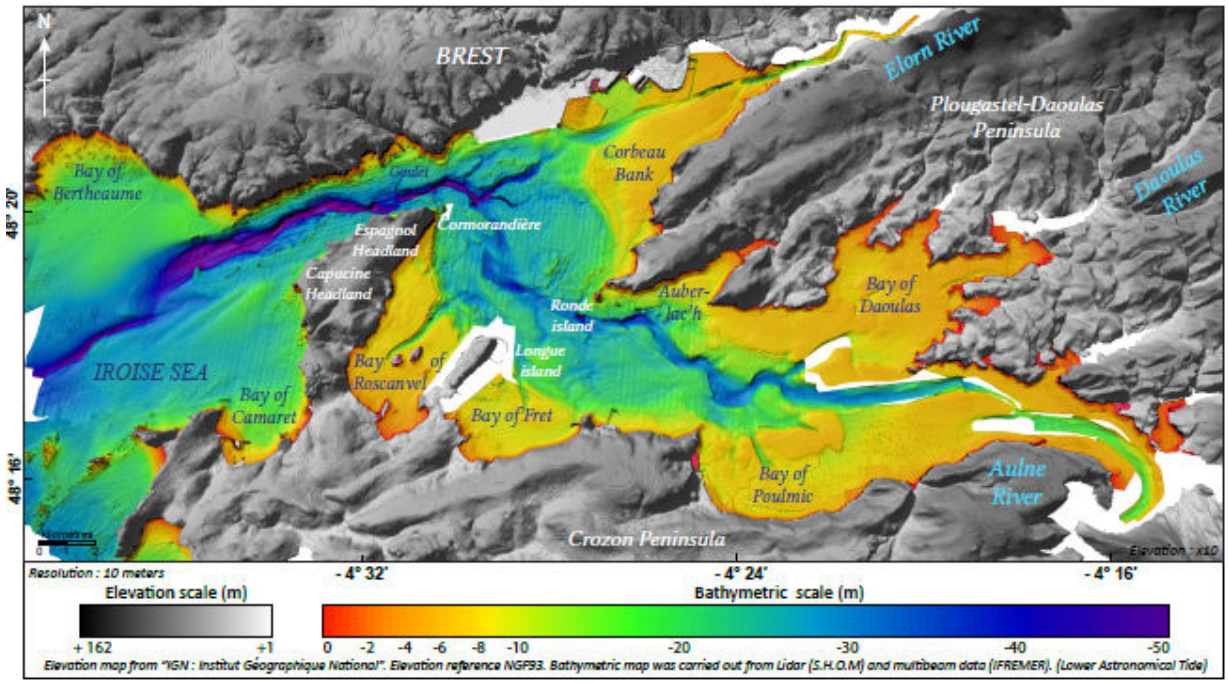


Figure 13: Bathymétrie de la rade de Brest (Gregoire *et al.,* 2016).

B. Description des masses d'eau

1. Hydrologie

Les variations thermo-halines temporelles et spatiales des masses d'eau de la rade de Brest dépendent de trois facteurs : le cycle de marée de type semi-diurne (12h15), le cycle de vives eaux et mortes eaux (14,7 jours) et le cycle annuel influencé par la variation des débits fluviaux (Delmas, 1981).

1.1. Température

La température des masses d'eau de la rade de Brest (moyennée sur trois profondeurs) varie entre 7 et 19 °C à l'échelle annuelle. A l'échelle spatiale, une stratification thermique peut apparaître au niveau des estuaires de l'Elorn et de l'Aulne avec un régime très différent entre les périodes hivernale et estivale. En situation hivernale (vers février - mars), la température varie entre 7,5 et 8,5 °C. Cette saison est notamment marquée par des périodes de crues favorisant l'installation d'une thermocline. En situation estivale (vers juillet - août), la température varie entre 17 et 20 °C (Monbet and Bassoulet, 1989).

1.2. Salinité

Une stratification haline temporelle peut apparaitre en rade de Brest. La variation haline des masses d'eau est due à deux régimes hydrologiques : la période de crue et la période d'étiage. (Delmas, 1981). De même, les cycles de vives eaux et mortes eaux peuvent générer des variations halines bimensuelles. Le mélange vertical des masses d'eau est faible en période de mortes eaux et est très important en période de vives eaux. La mise en place d'une forte stratification haline apparaît notamment dans les régions situées en aval des fleuves lors de la combinaison entre les cycles de mortes eaux et la période hivernale où les crues sont importantes (salinité > 33 au centre de la rade, 14 au sud de l'Auberlac'h et 28 à l'embouchure de l'Elorn). Les variations de salinité sont plus marquées au niveau de l'estuaire de l'Aulne (60 à 70 % de l'apport en eau fluviale) que de l'Elorn (15 % de l'apport en eau fluviale) (Delmas, 1981) (Figure 14). En période d'étiage, la salinité des masses d'eau de la rade s'homogénéise (période estivale, salinité > 35) (Delmas, 1981; Monbet and Bassoulet, 1989).

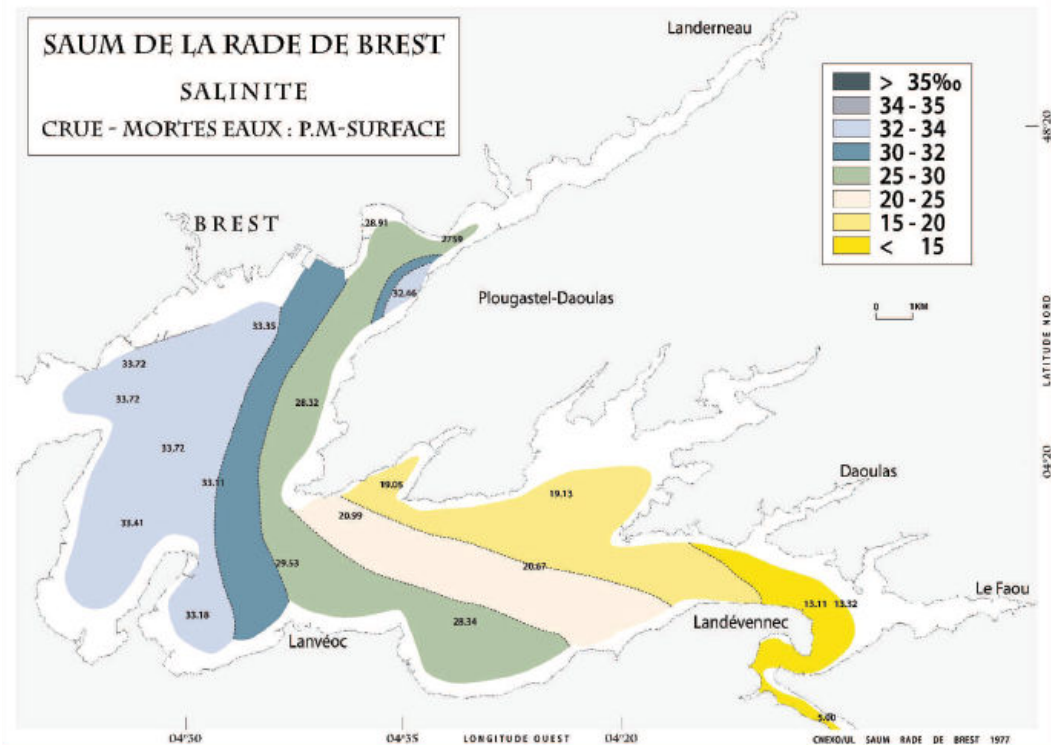


Figure 14: Salinité des eaux de surface en période de crue au cours de la pleine mer de mortes eaux (Monbet and Bassoulet, 1989).

2. Hydrodynamique

La circulation des masses d'eau en rade de Brest est majoritairement générée par les cycles de marée et les débits fluviaux, le vent étant un facteur secondaire (Troadec *et al.,* 1997). La marée génère un fort brassage interne en rade et des échanges modérés entre celle-ci et la mer d'Iroise. La houle provenant de la mer d'Iroise (hauteur : 3 m à l'entrée du Goulet) et entrant en rade de Brest est fortement affaiblie par son passage dans l'étroit Goulet (hauteur < 0,5 m) et n'atteint pas le fond de la rade. La majorité de la rade est donc protégée de la houle du large et n'est soumise qu'à l'action des vagues formées localement par le vent, appelée clapot ou « mer de vent ». De plus, il n'y a pas de réelle circulation des masses d'eau induite par le vent car le fetch est très petit. Les direction et intensité du vent en rade de Brest sont très variables.

2.1. Circulation tidale

La rade de Brest contient un volume d'eau moyen de 2 milliards de mètres cubes. Chaque cycle de marée génère un flux de 700 millions de mètres cubes qui traverse le Goulet, soit un tiers du volume d'eau de la rade (Troadec *et al.,* 1997). La marée est de type semi-diurne et son marnage moyen est de 4,5 m. La circulation générée par les cycles de marée diffère selon le cycle tidal (Figure 15) (Guérin, 2004; Troadec *et al.,* 1997) :

- le **flot** engendre un courant canalisé au niveau du goulet qui se divise en deux veines en entrant dans la rade : la première veine longe la rive nord et se dirige vers l'Elorn et la deuxième, la plus importante, se dirige vers l'estuaire de l'Aulne et alimente au passage le centre et le sud-est de la rade. Cette deuxième veine est à l'origine de la formation d'un vortex anticyclonique qui occupe la partie centrale de la rade et de petits tourbillons latéraux derrière la pointe de l'Armorique et le cap de l'anse de Poulmic. Le courant de flot remet en suspension les particules sédimentées et la masse d'eau s'homogénéise sur toute la hauteur de la colonne d'eau (Guérin, 2004).

- le **jusant** génère une circulation presque uniforme orientée vers le Goulet. Des tourbillons latéraux se forment à l'extérieur de la rade, au niveau des anses de Bertheaume et de Camaret. Le flot suivant tend à ramener les eaux expulsées vers l'intérieur de la rade.

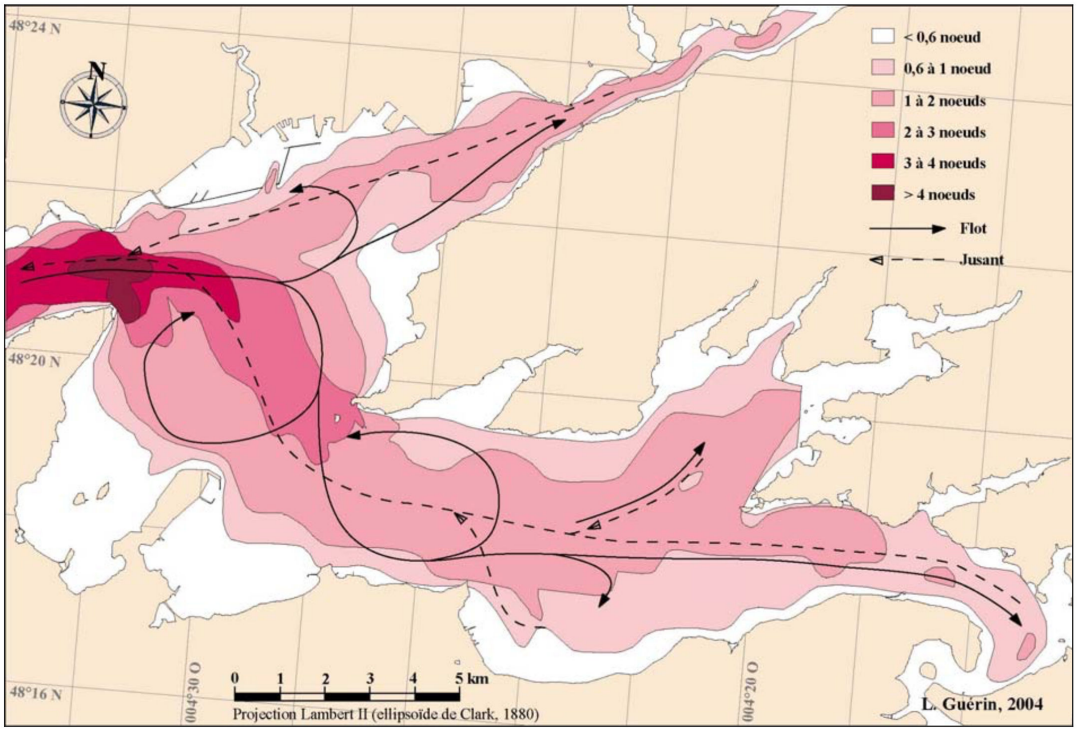


Figure 15 : Courants tidaux en rade de Brest (coefficient 95) : circulation au flot et au jusant (Guérin, 2004 d'après Monbet and Bassoulet, 1989).

Les caractéristiques hydrologiques et les trajectoires à long terme des masses d'eau de la rade de Brest permettent de la diviser en trois secteurs (Delmas, 1981; Monbet and Bassoulet, 1989) (Figure 16) :

- un **secteur nord**, influencé par les apports fluviaux de l'Elorn (15 % des apports en eau douce en rade de Brest), a un caractère estuarien peu marqué dû au faible débit de ce dernier (débit moyen de 6,88 $m^3.s^{-1}$) induisant de faibles variations de salinité annuelles et un temps d'évacuation des eaux fluviales compris entre 7 et 15 jours pour les périodes hivernale et estivale respectivement ;

- un **secteur sud** sous l'influence de l'Aulne qui fournit 60 à 70 % de l'eau douce en rade de Brest (débit moyen de 27,70 $m^3.s^{-1}$), son débit peut atteindre 200 $m^3.s^{-1}$ en période de crue ce qui peut générer d'importantes variabilités de salinité à l'origine de la mise en place d'une halocline. Enfin le temps d'évacuation des eaux fluviales est de 7 à 8 jours en période de crues et de 20 à 30 jours en période d'étiage ;

- un **secteur central** (centre rade et zone de mélange) qui est une zone intermédiaire de brassage intense entre les masses d'eau provenant de la mer d'Iroise et celles provenant des secteurs nord et sud de la rade, cela lui confère une homogénéité de salinité à l'année et un renouvellement constant des masses en toute saison compris entre 4 et 9 jours.

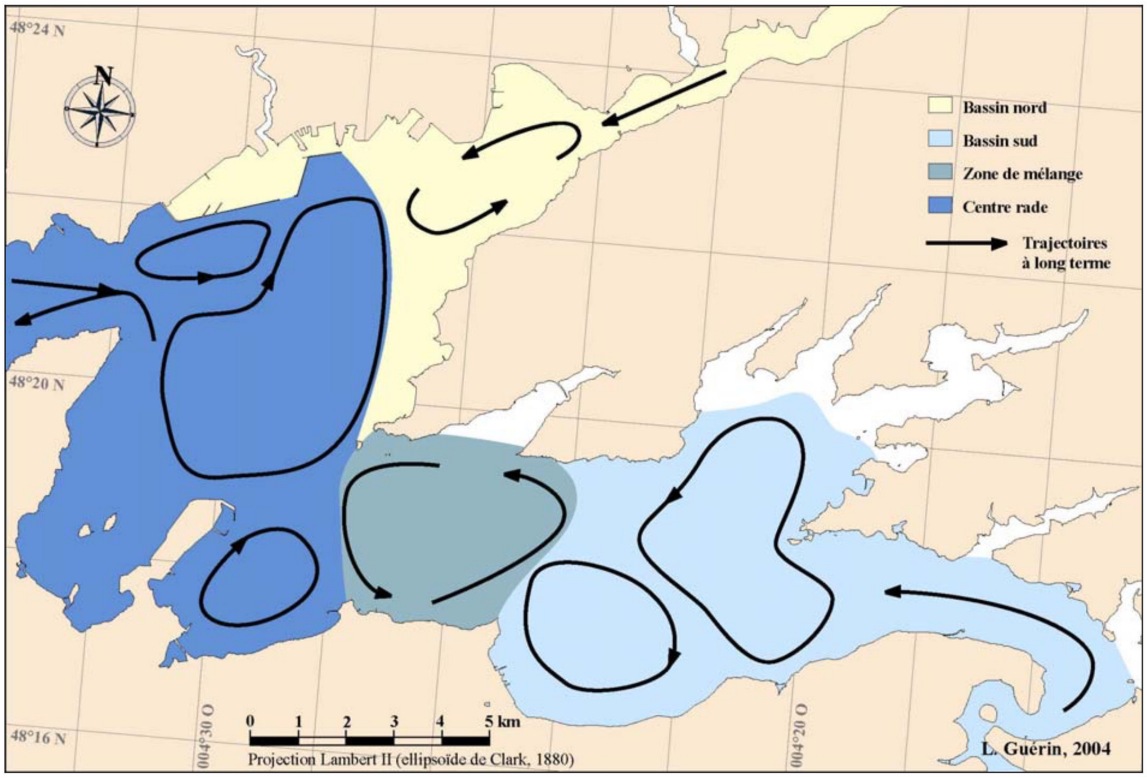


Figure 16: Trajectoire des masses d'eau sur le long terme en rade de Brest (Guérin, 2004 d'après Salomon and Breton, 1991)**.**

La majorité des apports fluviaux en rade de Brest (environ 1 milliard de $m^3.an^{-1}$) provient de l'Aulne (60 à 70 %) et de l'Elorn (15 %). Le reste de l'eau douce est apporté par la Douffine (8 %), la Mignonne (5 %), le Camfrout (3 %), le Garvan (2 %), le Faou (2 %) et la Penfeld (2 %) (Monbet and Bassoulet, 1989).

L'hydrodynamique particulière des masses d'eau de la rade de Brest lui confère des capacités dispersives plus efficaces à court terme qu'à long terme (Troadec *et al.,* 1997). Le mélange des masses d'eau entre la mer d'Iroise et la rade de Brest au cours des cycles de marée (à court terme) permet donc une dilution rapide des pollutions ponctuelles. Cependant la majorité de l'eau évacuée hors de la

rade au jusant est réintroduite au cours du flot suivant. Cela affaiblie la capacité dispersive des eaux de la rade sur le long terme (Le Pape *et al.,* 1996). En effet, le renouvellement des eaux de la rade, calculé à partir du temps moyen d'évacuation de l'eau fluviale de la rade, est estimé entre 10 jours et 3 mois (Le Pape *et al.,* 1996; Monbet and Bassoulet, 1989; Troadec *et al.,* 1997). Cela génère une capacité dispersive faible à l'échelle mensuelle et présente un risque en cas de pollution chronique.

2.2. Circulation résiduelle

Une circulation résiduelle est formée lors de la rencontre entre les eaux maritimes amenées par la marée et les eaux fluviales. La formation de cette circulation des masses d'eau est accrue en période de crue et de vives eaux (Monbet and Bassoulet, 1989). Ce phénomène est notamment observé à l'embouchure des estuaires de l'Aulne et de l'Elorn où se forme une superposition d'un flux de surface dirigé vers l'aval et d'un flux de fond dirigé vers l'amont (Monbet and Bassoulet, 1989).

C. Description des substrats

1. Diversité et répartition des faciès sédimentaires

Les caractéristiques hydrodynamiques générées par les circulations de flot et de jusant sont à l'origine des différents faciès sédimentaires et de leur distribution en rade de Brest (Figure 17) (Monbet and Bassoulet, 1989). Les trois principaux faciès sédimentaires sont : le sédiment grossier, le sédiment sableux et le sédiment vaseux (Monbet and Bassoulet, 1989). La couverture sédimentaire du secteur central de la rade de Brest, fortement influencée par les courants de marée, est composée de sédiments grossiers répartis selon un gradient granulo-décroissant du Goulet vers l'intérieur de la rade. A l'approche des embouchures des fleuves de l'Elorn et l'Aulne dans les secteurs nord et sud respectivement, à faible influence des courants tidaux, le faciès sédimentaire est majoritairement composé de sédiment vaseux. Ce sédiment peut être associé à de la matière graveleuse carbonatée provenant des communautés de maërl (*Lithothamnium corallioïdes*) et de crépidules (*Crepidula fornicata*) (Gregoire, 2016).

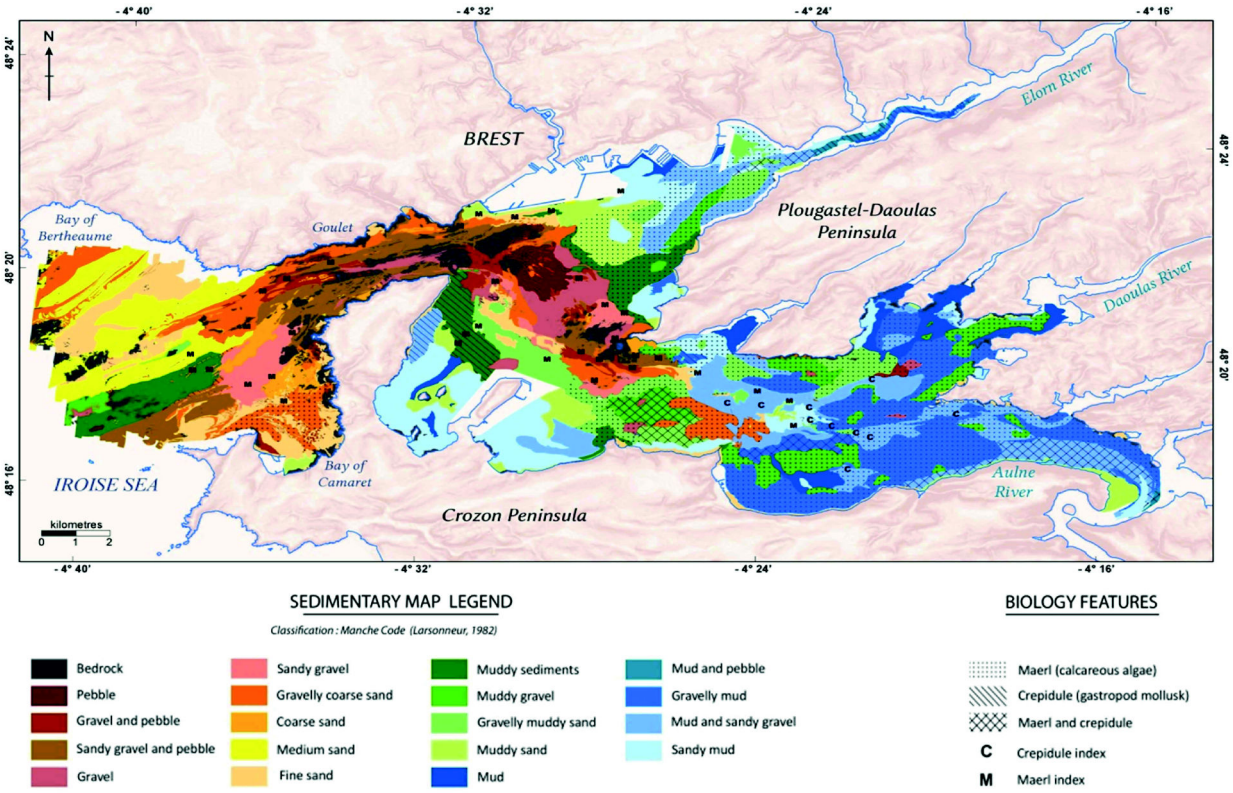


Figure 17: Carte de la nature et répartition des sédiment en rade de Brest (projection Lambert conformal conic , Lambert 93) (Gregoire *et al.,* 2016).

2. Dynamique sédimentaire

La dynamique de transport des sédiments est influencée par les courants tidaux, le chenal du secteur nord est dominé par les courants de flot et le chenal du secteur sud par les courants de jusant (Figure 18) (Gregoire, 2016). Les flux entrant (flot) et sortant (jusant) de la matière en suspension en rade de Brest via le Goulet au cours des cycles de marée sont estimés à 99 et 155 t.an^{-1}, respectivement. Environ 90 % de la matière en suspension expulsée provient du centre de la rade, le reste est originaire de la baie de Roscanvel et de l'anse de Saint-Anne-du-Portzic (Beudin *et al.,* 2013). L'apport en matière en suspension varie selon les saisons et les cycles de marée (Monbet and Bassoulet, 1989). Sur l'ensemble de la rade, le taux de matière en suspension reste relativement faible avec un maximum < 15 mg.l^{-1} en période de crue et un minimum de 5 mg.l^{-1} en période d'étiage (Monbet and Bassoulet, 1989). Les apports fluviaux de matière en suspension sont estimés à 1 000 et 7 000 t.an^{-1} pour l'Elorn et l'Aulne respectivement, sachant que la majorité de ces apports ont lieu en période de crue, soit quelques jours par an (Monbet and Bassoulet, 1989).

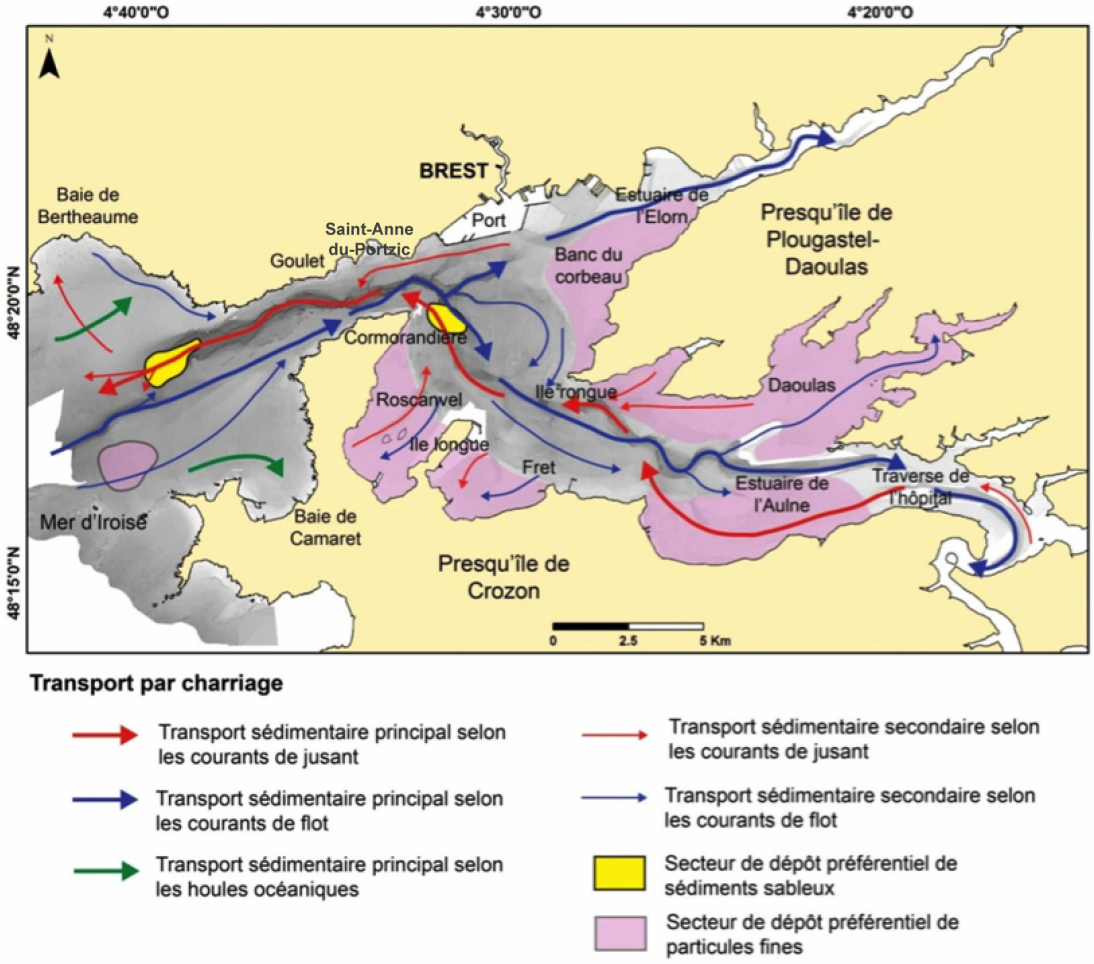


Figure 18: Dynamique sédimentaire par charriage et transport par suspension (Gregoire, 2016).

Le fort brassage des masses d'eau en rade de Brest couplé à une bathymétrie faible entraine un taux de sédimentation relativement faible qui oscille entre 0,05 (proximité du Goulet) et 0,5 cm.an^{-1} (estuaires de l'Elorn et de l'Aulne) (Figure 19). L'apport total annuel de sédiment en rade de Brest est estimé entre 68 et 136 kt.an^{-1}. Le dépôt de sédiment se fait préférentiellement dans les estuaires de l'Aulne (72 %) et de l'Elorn (18 %). Cependant l'apport fluvial de matière en suspension ne suffit pas à expliquer le dépôt annuel de sédiment en rade de Brest. La remobilisation du sédiment contenu dans les chenaux fluviaux par les courants et les activités de pêche à la drague peuvent contribuer au dépôt de sédiment en rade de Brest (Ehrhold *et al.,* 2016).

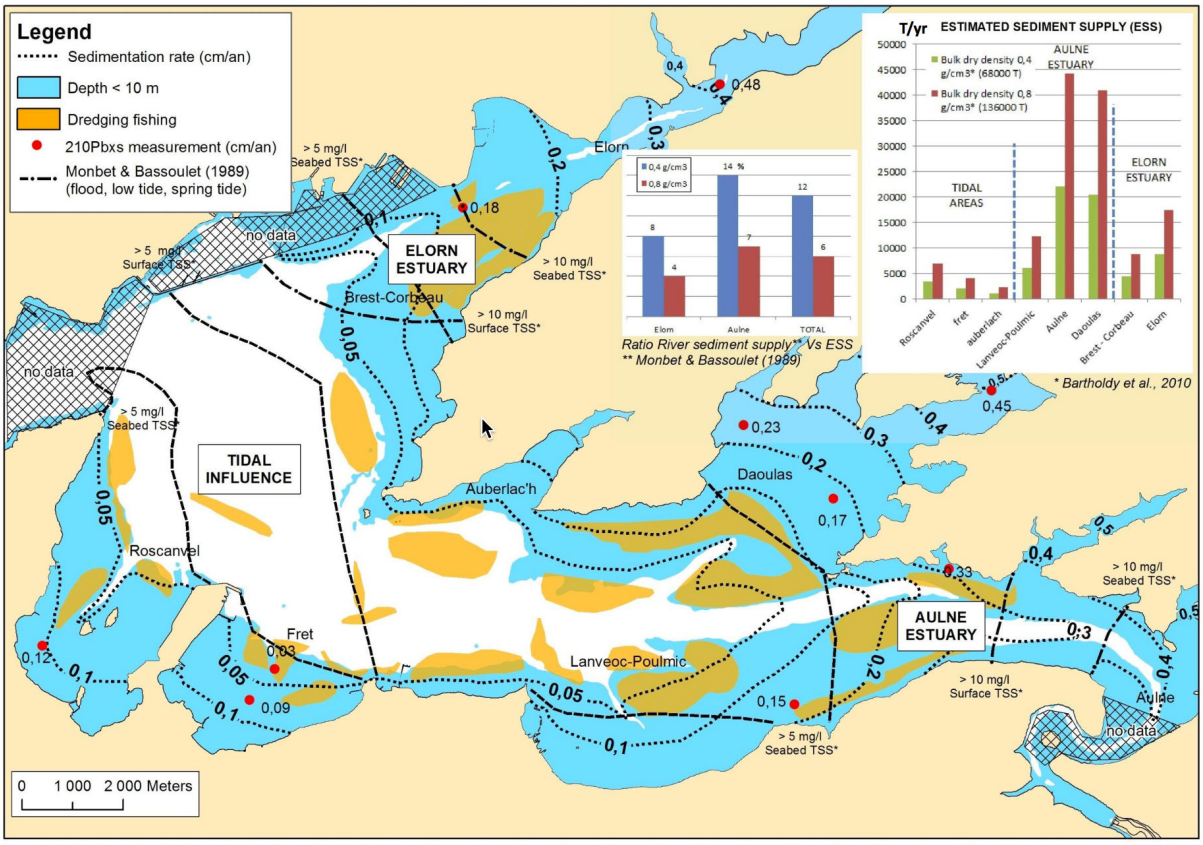


Figure 19: Taux de sédimentation en rade de Brest estimés à partir des profils de $^{210}PB_{ex}$ et interpolés selon la morphologie de la rade. Le graphique de droite indique le dépôt de sédiment annuel (t.an^{-1}) selon les zones de la rade et le graphique central indique le pourcentage de sédiment fournis par les principaux fleuves (Ehrhold *et al.,* 2016).

D. Diversité biologique

La rade de Brest est composée de nombreux habitats naturels à caractère patrimonial et invasif, dont plusieurs sont reconnus d'importance européenne de part leur étendu et leur conservation remarquable. La grande diversité des faciès sédimentaires, modelés par l'hydrodynamique générée par les courants tidaux, est à l'origine d'une diversité importante des peuplements benthiques en rade de Brest (Guérin, 2004). La rade de Brest contient des habitats subtidaux à caractère patrimonial tels que les bancs de maërl et les bancs d'huîtres plates. Elle contient également un habitat à caractère invasif, les bancs de crépidules qui est le principal suspensivore en terme de biomasse. Les bancs de maërl, dominés par l'espèce *Lithothamnion corallioides*, constituent un réservoir de biodiversité (Grall, 2009) et notamment une niche écologique pour les peuplements épibenthiques et endobenthiques. Les bancs d'huîtres plates (*Ostrea edulis*) présents en rade de Brest font partis des deux seuls sites de captages naturels d'huîtres en France avec la baie de Quiberon.

Les peuplements benthiques sont dominés par les suspensivores, groupe trophique qui se nourrit de particules en suspension (Guérin, 2004; Hily, 1991). Les suspensivores sont dominés en terme de densité et de biomasse par une espèce invasive, la crépidule (*Crepidula fornicata*) à l'exception du centre de la rade où les taxa dominants sont représentés par les bivalves (*Pecten maximus* et *Aequipecten opercularis*) et les échinodermes (*Marthasterias glacialis, Ophiothrix fragilis* et *Ophiocomina nigra*) (Chauvaud *et al.,* 2000; Guérin, 2004). Les bancs de maërl sont dominés par les gastéropodes (*Gibbula magus*), les bivalves (*Tapes aureus*, *Venus verrucosa*), les ascidies (*Styela coriacea*) et les crustacés (*Liocarcinus arcuatus*). Les fonds sableux sont dominés, en dehors de la crépidule, par les bivalves (*Glycymeris glycymeris*, *Pecten maximus*, *Laevicardium crassum* et *Aequipecten opercularis*), les ascidies (*Styela coriacea*), les gastéropodes (*Calyptraea chinensis*, *Hinia reticulata, Buccinum undatum*) et les échinodermes (*Ophiothrix fragilis*, *Ophiocomina nigra*, *Ophiura albida* et *Asteria rubens*). Les fonds envasés sont dominés par les ascidies (*Styela coriacea*), les gastéropodes (*Calyptraea chinensis*, *Hinia reticulata* et *Gibbula magus*), les crustacés (*Liocarcinus aruatus*) et les bivalves (*Pecten maximus* et *Venus verrucosa*). Enfin, les bancs de crépidules (*Crepidula fornicata*) sont dominés, en dehors de la crépidule, par les ascidies (*Styela coriacea*), les bivalves (*Chlamys varia*, *Modiolus barbatus* et *Venerupis senegalensis*) et les gastéropodes (*Hinia reticulata*, *Amonia ephippium*, *Calyptraea chinensis*) (Guérin, 2004).

E. Activités socio-économiques

Les bassins versants de la rade de Brest sont urbanisés et les activités territoriales et maritimes sont multiples (agriculture, installations industrielles, assainissement de l'eau, tourisme, activités militaires, activités maritimes professionnelles et de loisirs). La rade de Brest est soumise à une pression anthropique intense via les activités professionnelles, récréatives et de loisirs.

Un total de 27 communes borde la côte (rade et estuaires) et la densité de population est d'environ 360 habitants.km^{-2}. Le bassin versant de la rade de Brest est composé de plusieurs intercommunalités (Tableau 5). La métropole de Brest correspond à la rive la plus urbanisée de la rade de Brest avec une densité de population de 948,9 hab.km^{-2}. La station d'épuration localisée dans la zone portuaire de Brest a une capacité de traitement des eaux usées de 170 000 habitants. Une autre, localisée à l'entrée du Goulet (Maison Blanche), permet d'épurer les eaux usées de 60 000 habitants (données Brest Métropole).

Tableau 5 : Densité de populations (hab.km^{-2}) des intercommunalités et métropole du bassin versant de la rade de Brest (CC : communauté de communes) (données INSEE 2013).

Intercommunalités	Nombre d'habitants en 2013	Surface (km^2)	Densité population (hab.km^{-2})
Brest Métropole	207 210	218,4	948,9
CC Landerneau Daoulas	47 322	371,4	127,4
CC Presqu'île de Crozon	16 770	194 ,2	86,4
CC Aulne maritime	7 546	103,1	73,2

La richesse des eaux de la rade de Brest favorise le développement des activités professionnelles telles que la conchyliculture et la pêche maritime qui contribuent au dynamisme socio-économique local. Les deux principales activités conchylicoles sont l'ostréiculture (huîtres plates (*Ostrea edulis*) et huîtres creuses (*Crassostrea gigas*)) et la mytiliculture (moule bleue, *Mytilus edulis*) (Troadec *et al.,* 1997), et les autres sont représentées par la pectiniculture (coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus*), la vénériculture (palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum* ; pétoncles, *Chlamys varia*) et dans une moindre mesure la cérastoculture (coque, *Cerastoderma edule*). En 2005, la production d'huîtres creuses en rade de Brest s'élevait à 602 t et 3 t pour la production de la palourde japonaise (Larzilliere, 2014). La production mytilicole est de 850 t.an^{-1} (Larzilliere, 2014). D'autres activités telles que la pêche professionnelle (embarquée et à pied) ont lieu en rade de Brest. Les bivalves sont les plus ciblés par la pêche professionnelle, mais les crustacés (araignées, bouquet, crabes verts, étrilles) et les téléostéens (civelles, dorades, bars) sont également pêchés. Les techniques de pêches embarquées sont

multiples : pêche au filet, pêche à la palangre, caseyage à crustacés et pêche à la drague (Larzilliere, 2014). Cependant, la pêche embarquée s'effectue principalement en mer d'Iroise, et seulement ponctuellement en rade de Brest (suivant la période ou l'espèce recherchée) (Larzilliere, 2014). Les activités agricoles peuvent être regroupées en trois secteurs, le sous-bassin de l'Elorn spécialisé dans l'élevage porcin (présence de cheptels de bovins et de volailles), le sous-bassin ouest de l'Aulne où le polyélevage est pratiqué et enfin le sous-bassin de l'Aulne est caractérisé par l'élevage avicole. La zone de Brest est spécialisée dans la production légumière et floristique sous serre (Troadec *et al.,* 1997). La rade de Brest est le siège d'activités industrielles portuaires intenses avec le transport maritime (matière première destinée à l'alimentation animale, trafics frigorifiques) et la réparation navale civile (Larzilliere, 2014). Les activités militaires en rade de Brest relèvent de l'armée de terre et de la marine nationale et sont regroupées entre la Base Aéronavale, l'Ecole Navale, la base sous-marine, la pyrotechnie et le centre parachutiste d'entraînement aux opérations maritimes (Larzilliere, 2014). Les activités récréatives et de loisirs y sont également multiples avec la pêche à pieds de loisir, la pêche maritime de plaisance, la navigation de plaisance et les loisirs nautiques (Larzilliere, 2014; Troadec *et al.,* 1997).

Enfin, la rade de Brest fait partie d'un vaste réseau formé par les Zones Atelier dont la problématique est l'étude de l'interaction entre un milieu et les sociétés qui l'occupent et l'exploitent. La Zone Atelier Brest-Iroise (ZABrI) a été labellisée par l'Institut Ecologie et Environnement (INEE) du CNRS en 2012 et a pour objectif d'améliorer la compréhension du fonctionnement et de l'évolution du socio-écosystème côtier, dans un contexte de changement et dans une perspective de gestion intégrée (http://www-iuem.univ-brest.fr/zabri/fr). La gestion durable du littoral face aux risques côtiers représente un enjeu majeur pour l'environnement et la société. De nombreux suivis scientifiques sont réalisés par Ifremer en rade de Brest et sont les suivants : le réseau de contrôle microbiologique des zones de production conchylicole (REMI), le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY), le réseau d'observation de la contamination chimique (ROOCH), le suivi des gisements naturels de mollusques (REPAMO), et le réseau benthique (REBENT). L'Observatoire marin de l'IUEM participe à la mise en œuvre de plusieurs services d'observation nationaux comme le Service d'Observation du Milieu LITtoral (SOMLIT), l'observation de la dynamique du trait de côte (DYNALIT), le suivi géomorphologique du littoral et le réseau benthique (REBENT), mais également des services d'observations internationaux comme le réseau global d'observation des océans (ARGO). La qualité des eaux de la rade et de son bassin versant est également suivie par Brest Métropole (réseau RADE), l'Observatoire marin de l'IUEM (bouée MAREL, ECOFLUX) et notamment par la Marine Nationale (radioactivité et tributylétain) (Larzilliere, 2014).

- CHAPITRE III -

Développements méthodologiques

Préambule **103**

A. Micro-spectroscopie Raman **105**

1. Introduction 109
2. Experimental Section 111
   2.1. Reference materials and particles collected at sea 111
   2.2. Raman micro-spectroscopy method 111
   2.3. Application of the method to an environmental sample 112
   2.4. Data analysis 112
3. Results and discussion 112
   3.1. Method validation 113
   3.2. Application of the methodology on large environmental sample 117
4. Conclusion 119
5. Acknowledgements 120

Supplementary information 121

B. Digestion de tissus biologiques **123**

1. Introduction 127
2. Materials and methods 129
   2.1. Experiment 1: elimination of the non-suitable protocols 129
   2.2. Experiment 2: impact of the three selected digestion protocols on the integrity of 15 plastic families 130
   2.3. Experiment 3: application of selected digestion protocols on seafood products 131
   2.4. Statistics 133
3. Results and discussion 134
   3.1. Experiment 1: elimination of the non-suitable protocols 134
   3.2. Experiment 2: impact of the three selected digestion protocols on the integrity of 15 plastic families 135
   3.3. Experiment 3: application of selected digestion protocols on seafood products 141
4. Conclusion 143
5. Acknowledgments 144

Supplementary information **145**

Préambule

L'intérêt récent de la communauté scientifique pour l'évaluation de la contamination de l'hydrosphère par les microplastiques a généré la production d'une multitude de travaux et autant de méthodes analytiques différentes. Cela démarre avec les techniques d'échantillonnage des matrices environnementales comme l'eau, le sédiment et le biote, suivi de leur quantification, tout en passant par l'extraction des particules directement par reconnaissance visuelle lors des étapes de filtration/tamisage/dissection ou après traitements chimiques des échantillons. Leur description physique à savoir la taille, la forme, la couleur ou la rugosité des particules et leur identification chimique peut être réalisée via différentes techniques dont les plus utilisées sont la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la spectroscopie Raman et dans une moindre mesure la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse puis à la spectrométrie de masse (Py-GC-MS) (Qiu *et al.,* 2016; Rocha-Santos and Duarte, 2014; Shim *et al.,* 2017). Une harmonisation de ces différentes méthodes analytiques (échantillonnage, extraction, quantification et identification) est nécessaire en vue de faciliter la comparaison des résultats entre les différents travaux de recherche (Filella, 2015; Galgani *et al.,* 2013; GESAMP, 2016; Löder and Gerdts, 2015).

Ainsi, c'est dans ce contexte que plusieurs mises au point méthodologiques ont dû être réalisées avant de pouvoir établir une évaluation du niveau de la contamination de la rade de Brest. Ces mises au point concernent essentiellement les étapes d'extraction, de quantification et d'identification de microplastiques collectés dans l'environnement marin (eau de surface, sédiment et biote). Ce troisième chapitre a donc pour objectif de :

Proposer deux méthodologies qui contribuent à fiabiliser et faciliter les processus d'extraction, de quantification et d'identification des microplastiques pour l'évaluation de la contamination de l'environnement marin.

Ces développements méthodologiques ont fait l'objet de deux publications scientifiques :

Marine Pollution Bulletin 113 (2016) 461–468

Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul

A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter

Frère L. [a], Paul-Pont I. [a], Moreau J. [b], Soudant P. [a], Lambert C. [a], Huvet A. [c], Rinnert E. [b,*]

[a] Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France
[b] Ifremer, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures, CS 10070, 29280 Plouzané, France
[c] Ifremer, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, CS 10070, 29280 Plouzané, France

Environmental Pollution 215 (2016) 223–233

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization☆

Alexandre Dehaut [a], Anne-Laure Cassone [b], Laura Frère [b], Ludovic Hermabessiere [a], Charlotte Himber [a], Emmanuel Rinnert [c], Gilles Rivière [d], Christophe Lambert [b], Philippe Soudant [b], Arnaud Huvet [e], Guillaume Duflos [a], Ika Paul-Pont [b,*]

[a] ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France
[b] Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR6539/UBO/CNRS/IRD/IFREMER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France
[c] IFREMER, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM), Centre Bretagne, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France
[d] ANSES, Direction d'Evaluation des Risques, 14 Rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort Cedex, France
[e] IFREMER, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539/UBO/CNRS/IRD/IFREMER, 29280 Plouzané, France

La méthodologie d'identification moléculaire et de description morphologique des particules développée dans l'article 1 a été utilisée pour traiter l'ensemble des microplastiques collectés dans le cadre de ces travaux de thèse et décrits dans les Chapitres IV et V. La méthodologie de digestion des tissus biologiques développée dans l'article 2 a été utilisée pour évaluer le niveau de contamination des organismes marins de différents niveaux trophiques et habitats de la rade de Brest (Chapitre IV-B).

A. Micro-spectroscopie Raman

La méthodologie développée dans cet article a pour objectif de proposer une méthode semi-automatique rapide et efficace de caractérisation physique et chimique des particules collectées dans l'environnement marin. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM, Ifremer, Plouzané) avec l'appui scientifique de J. Moreau et sous la responsabilité scientifique et technique d'E. Rinnert.

L'atout de cette méthode est le couplage entre un micro-spectromètre Raman et un logiciel de traitement d'image ParticleFinder (LabSpec6, Horiba) permettant au cours d'une même analyse d'obtenir des informations physiques (morphologie) et chimiques (composition moléculaire) des particules.

La combinaison entre ces différents outils a permis de développer une méthode d'analyse semi-automatique qui permet le traitement rapide des échantillons (plusieurs centaines de particules traitées au cours d'une même analyse) tout en minimisant l'intervention de l'opérateur (propice à de potentielles contamination ou perte d'échantillon) ainsi que le temps agent (Figure 20).

La méthode a été validée en vérifiant la répétabilité des mesures physiques et chimiques (mélange des 110 particules, 103 microplastiques flottants collectés en rade de Brest et 7 plastiques de référence, entre les trois répétitions). Aucune différence significative, en termes de pourcentage de particules identifiées et pour chacun des 7 descripteurs de taille et morphologie étudiés, n'a été observée entre les trois répétitions des 110 particules analysées. Cette méthode a ensuite été appliquée sur un échantillon plus important de particules collectées à la surface de l'eau en rade de Brest (n = 962) dont 71 % ont été identifiés comme des microplastiques répartis en trois familles de polymère (PE, PP et PS). Cette analyse a mis en évidence une différence dans la répartition des polymères selon les classes de taille : le PS est majoritairement retrouvé dans la classe 2 - 5 mm (59 %), le PE dans la classe 1 - 2 mm (40 %) et le PP dans la classe 0,335 - 1 mm (42 %).

Cette méthode d'identification de la composition moléculaire des microplastiques présente quelques inconvénients tels que la décomposition de la matière suite à l'échauffement de l'échantillon ou à des réactions photochimiques (notamment des substances colorées) et l'émission de fluorescence de manière beaucoup plus intense que l'effet Raman lorsqu'elle se produit ; ces désagréments peuvent toutefois être évités par un changement de longueur d'onde du laser utilisé ou encore une diminution de la puissance du laser. Ces éléments sont en conséquence discutés au regard de la littérature existante.

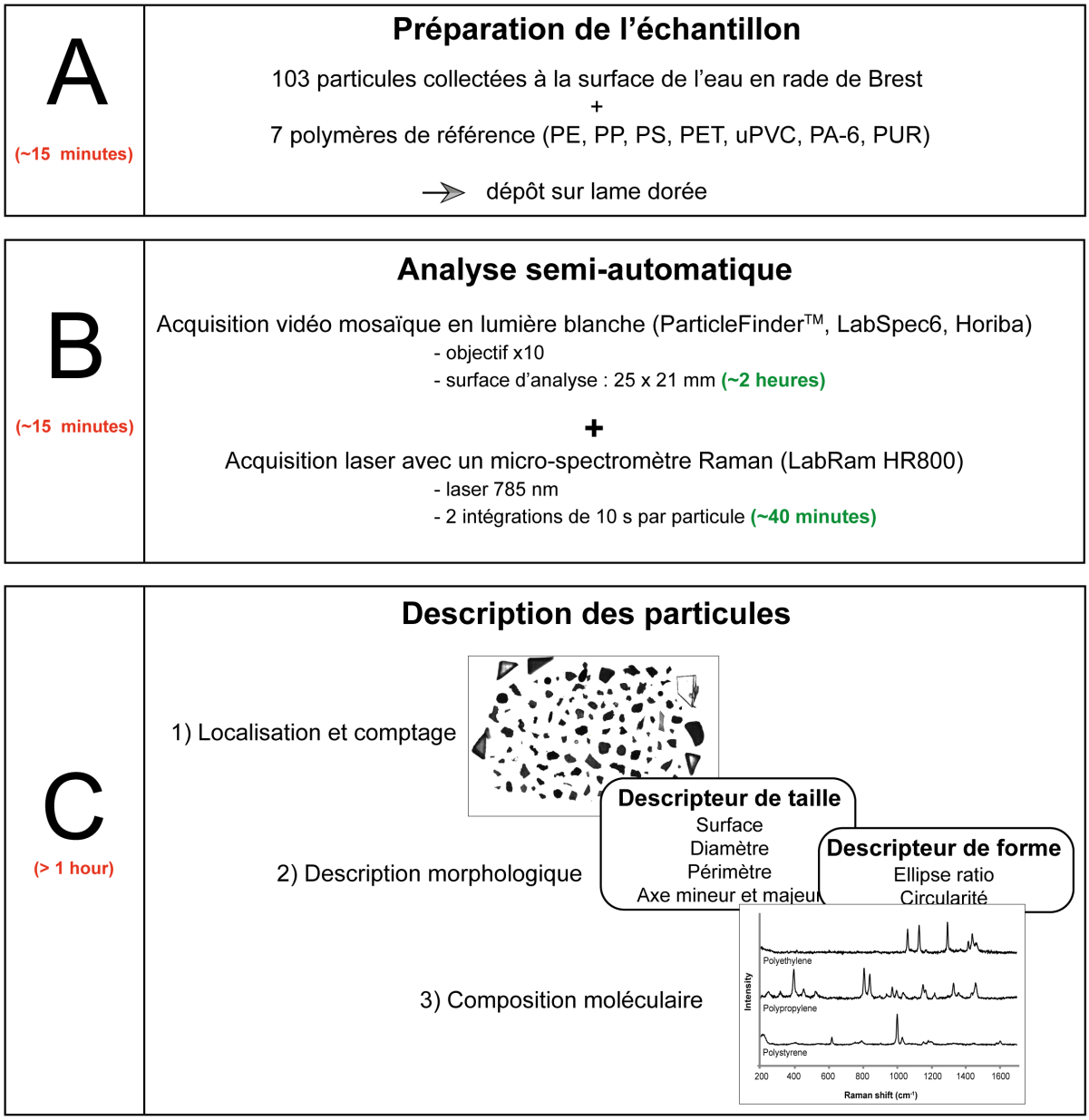
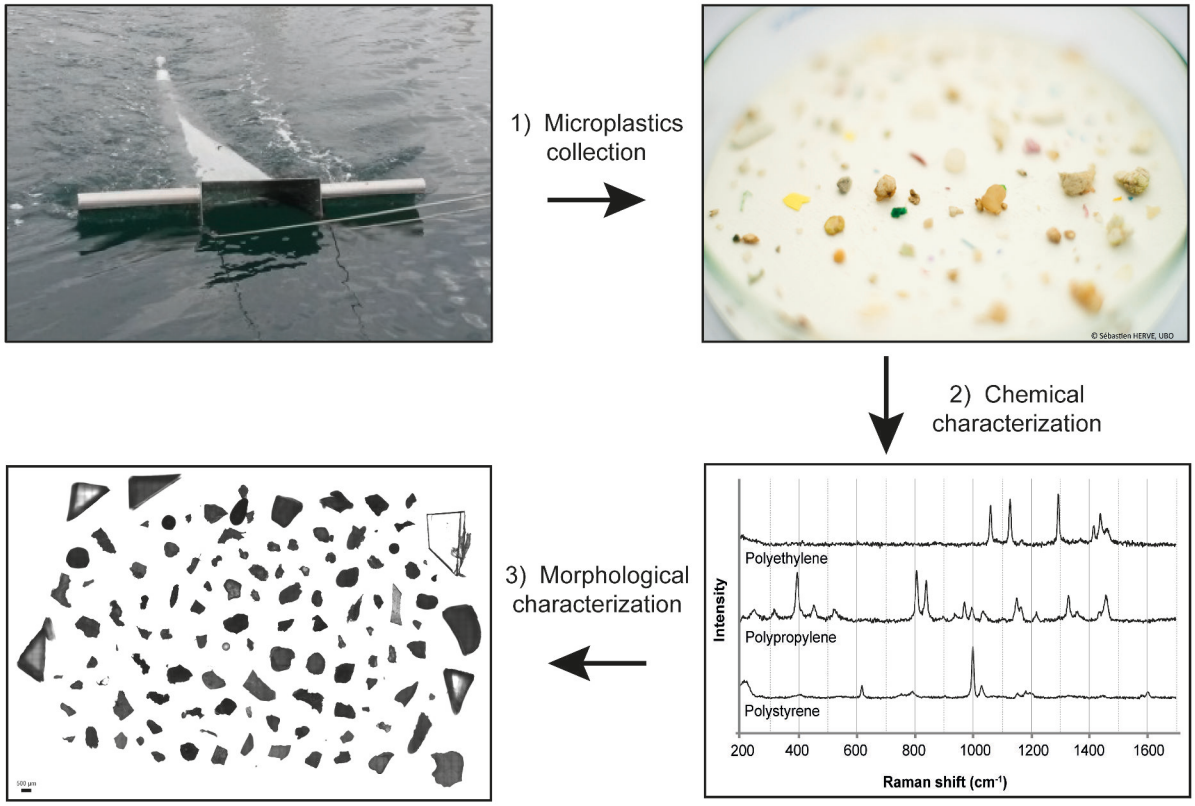


Figure 20: Méthodologie utilisée pour caractériser les particules collectées dans l'environnement marin (en rouge : temps agent estimé, en vert : temps machine en autonomie) (PE : polyéthylène, PP : polypropylène, PS : polystyrène, PET : polyéthylène téréphtalate, uPVC : polychlorure de vinyle non plastifié, PA-6 : polyamide 6, PUR : polyuréthane).

A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter

Laura Frère, Ika Paul-Pont, Jonathan Moreau, Philippe Soudant, Christophe Lambert, Arnaud Huvet and Emmanuel Rinnert

Published in Marine Pollution Bulletin (2016)



Fast semi-automated Raman micro-spectroscopy method:
Chemical and morphological characterization of 110 particles (surface 25x21 mm) < 3 hours

Abstract: Every step of microplastic analysis (collection, extraction and characterization) is time-consuming, representing an obstacle to the implementation of large scale monitoring. This study proposes a semi-automated Raman micro-spectroscopy method coupled to static image analysis that allows the screening of a large quantity of microplastic in a time-effective way with minimal machine operator intervention. The method was validated using 103 particles collected at the sea surface spiked with 7 standard plastics: morphological and chemical characterization of particles was performed in less than 3 hours. The method was then applied to a larger environmental sample (n=962 particles). The identification rate was 75% and significantly decreased as a function of particle size. Microplastics represented 71% of the identified particles and significant size differences were observed: polystyrene was mainly found in the 2–5 mm range (59%), polyethylene in the 1–2 mm range (40%) and polypropylene in the 0.335–1 mm range (42%).

Keywords: Microplastics; Raman micro-spectroscopy; surface seawater; morphology; environmental monitoring; automating

1. Introduction

For more than a decade, microplastic litter has been of concern to society and the scientific community, with increasing research effort dedicated to establishing the fate of microplastic litter and its impact on aquatic ecosystems. The upper size limit of microplastics was defined as 5 mm at the first International Microplastic Workshop organized by US National Oceanographic and Atmospheric Agency in 2008, while no standard boundary has yet been set for the lower size limit. A recent study led by Eriksen *et al.* (2014)estimated that more than 5 trillion plastic pieces pollute the surface of the world's oceans, with microplastics accounting for 92.4% of the global particle count. These plastic debris is the result of the ever increasing global plastic production, from 1.7 in 1950 to 311 million tons in 2014. The subsequent release of plastic waste into the marine environment was estimated at 4.8 to 12.7 million tons per year (Jambeck *et al.,* 2015). Microplastics are either classified as "primary" for the particles and fibers that are directly manufactured at the micrometric size (coming from a variety of sources including cosmetics, clothing, and industrial processes such as pre-production pellets and industrial abrasives) or as "secondary" when they result from the breakdown of larger plastic debris in the environment. The majority of marine plastics are considered to originate from land-based sources, introduced via many pathways: riverine inputs, waste water treatment plants, wind driven transport, marine based activities (Cole *et al.,* 2011). Once in marine ecosystems, microplastics are efficiently transported across the oceans and seas and many studies have reported their presence in all compartments: waters, sediments and biota (Lusher, 2015; Wright *et al.,* 2013).

As a consequence, an increasing number of studies are investigating microplastic concentration and distribution in coastal ecosystems in order to understand the extent as well as the hazard of this emerging pollution (Lusher, 2015). Currently several methodological limitations prevent accurate interpretation and comparison of environmental data (Filella, 2015). These mainly concern non-harmonized sampling methods leading to the inclusion or exclusion of certain types of microplastic (< 335 µm, fibers, etc.), sample contamination, inconsistent units used to express data, lack of certificate reference material, standardization and adequate reporting, and problems with the accuracy and representativeness of samples. Regarding the latter, misidentification may occur when relying only on visual inspection under a dissection microscope to separate microplastic-like polymers from other organic and inorganic materials, and when analyzing only a fraction of the sampling. Both of these commonly occur due to time and cost constraints (Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012). The non-utilization of complementary methods to confirm the chemical composition of microplastic-like polymers may lead to high levels of misidentification, which has been estimated from 20% (Eriksen *et al.,* 2013a) to 70% (Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012), with a negative correlation between successful identification and particle size (Filella 2015; Löder et Gerdts 2015). Indeed, a high probability of a misidentification exists when particle size is below 50 µm (Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012; Lenz *et al.,* 2015).

The most common techniques used to confirm the nature of micro-particle samples are infrared and Raman spectroscopies, which are both nondestructive (Rocha-Santos and Duarte, 2014). Raman and FTIR spectroscopies are complementary techniques, because molecular vibrations which are Raman inactive can be FTIR active and vice versa. However, Raman is able to achieve a better spatial resolution (down to 1 µm) than FTIR (10 µm) (Lenz *et al.,* 2015). Raman spectroscopy involves the irradiation of the sample with a monochromatic laser source and determines vibrations that cause a change in the polarizability of the sample (Neha *et al.,* 2014). The interaction of the laser light with the molecules and atoms of the sample results in differences in frequency of the backscattered light compared to the irradiating laser frequency (Imhof *et al.* 2012; Imhof *et al.,* 2013). For both methods, the main disadvantage is the considerable time required for the sample analysis. As a consequence, particle recognition and identification are often carried out on a subsample, due to the extensive time that would be required to analyze the whole sample (Enders *et al.,* 2015; Harrison *et al.,* 2012; Song *et al.,* 2015). To counteract this limitation, automated spectral mapping should be developed and used preferentially, as it could provide high throughput and thorough analysis of large sample sizes. The critical parameters required for the implementation of such automated scanning relate to the need to find an optimal combination of laser wavelengths that minimizes the interference between samples containing particles of a highly diverse nature (biological, inorganic, plastic), and to avoid background signals produced by the sample holder. Lastly, automatic data analysis is necessary for the data collection of other relevant information from microplastic litter, such as morphological characteristics, which is valuable for estimating its source (e.g. cosmetics, clothing, and industrial processes) and the fragmentation processes involved.

The aim of the present work was to develop, test the reproducibility and validate a time effective method using semi-automated scanning of particles to enable the thorough analysis of large quantities of environmental samples for microplastic characterization. The method involves a combination of static image analysis of particles with an automated Raman micro-spectroscopy analysis. The optimal combination between laser wavelength and sample holder was determined in order to enhance accurate particle detection and relevant Raman signal. The method was tested by analyzing a set of 103 particles collected at sea, spiked with 7 known reference polymers. Reproducibility was tested by comparing chemical characterization, shape and size data in three replications of the analysis. Finally, once validated, this method was applied to a larger sample (n=962 particles collected at sea) in order to test potential correlations between morphological features and the chemical nature of the particles.

2. Experimental Section

2.1. Reference materials and particles collected at sea

Fragments (2592 ± 727 µm; SI, table S1) of seven additive-free reference polymers supplied by GoodFellow (Lille, France) were used as spikes: polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), unplasticized polyvinyl chloride (PVC), polyethylene terephthalate (PET), polyamide-6 (PA-6) and polyurethane (PUR). These 7 reference polymers were randomly positioned among 103 collected particles on a gold coated microscope slide prior to Raman micro-spectroscopy analysis. These 103 particles were randomly selected for the method validation from floating micro-particles collected in the Bay of Brest (Brittany, France) in September 2014 using a Manta trawl. The top ten centimeters of surface seawater was sampled by using a Manta trawl (0.6 x 0.16 x 2 m) with a 335 µm mesh size. The net was rinsed with seawater to concentrate all floating material into the cod end. The sample was transferred into a 0.2 l sterile glass jar before laboratory analysis. Particles were sorted under a dissecting microscope (Leica Microsystems MZ6) and stored on a fiber glass filter at -20 °C (Frère *et al.,* in revision).

2.2. Raman micro-spectroscopy method

Measurements were carried out using a LabRAM HR800 Raman micro-spectrometer (Horiba Scientific), equipped with a Horiba Scientific ParticleFinder module for LabSpec6. This equipment provided easy and quick localization, counting and morphological characterization (size, area, perimeter, shape) of the 110 particles. Once all particles had been placed on a gold coated microscope slide, a video montage of the entire sample covering a large field of view of 25 x 21 mm area was captured with the aid of the motorized stage. From this, a single microscope image was obtained. The gold coated microscope slide was chosen as it avoids the signals generated by borosilicate glass or "unclean" non-gold microscope slides and does not contribute to the Raman signal. Moreover, for imaging, a reflective support allows better picture quality by lighting from above, rather than from below as with transparent microscope slides; this is especially true if plastics are translucent and / or very diffuse. Statistics of key 2D morphological features (minor and major size, particle area, diameter, and perimeter) and 2D shape descriptors (ellipse ratio and circularity) were calculated by the software for each particle.

After particle localization and morphological characterization, automated Raman analysis was performed. The ParticleFinder software module allowed automatic motorized stage positioning and analysis of particles. One spectrum was collected on the center of each particle. Parameters were selected to obtain a good compromise between spectra quality and time needed for the measurements: analyses were carried out using a 785 nm wavelength of a laser diode (Oxxius), as best

fluorescence/signal ratio, and were performed using a 10-fold magnification objective (Olympus) with numerical aperture of 0.25 and in a wavenumber range of 200 – 1700 cm^{-1} with a spectral resolution of around 4 cm^{-1} using 300 lines per millimeter grating. Spectra were collected with two accumulations of an integration time of 10 seconds for each particle. Spectral calibration was performed by zero-order correction of the used grating and with a crystalline silicon wafer using the known band at 520 cm^{-1}. The chemical identification of particles was realized using commercial Raman libraries (KnowItAll Informatics Systems, Bio-Rad, Raman ID Expert) and the home database.

Raman micro-spectroscopy analysis was repeated 3 times in 3 different runs under the same conditions (R1 to R3) except for particle spatial location. Indeed, between each run, particles were randomly switched and were therefore analyzed at a different spatial location and at a different orientation on the gold coated microscope slide.

2.3. Application of the method to an environmental sample

Once validated, the method presented here was applied to a larger set of floating micro-particles collected in the Bay of Brest (Brittany, France) in April and October 2014 using a Manta trawl and following the protocol detailed above in 2.1. All microplastic-like particles extracted from these samples (n=962 particles; fibers excluded) were subsequently analyzed for thorough morphological and chemical characterization. This chemical identification of particles was carried out using commercial Raman libraries and the home database as described above.

2.4. Data analysis

To test the reproducibility of the method, a Chi-Square test and a Kruskal-Wallis test were applied to compare the proportion of observations in each chemical family and the mean of the morphological characteristics (minor and major size, particle area, diameter, perimeter, ellipse ratio and circularity) respectively between the 3 runs. All particles analyzed (n=110 for method validation and n=962 for method application) were assigned to one of three size classes, based on the major axis length: 0.335 – 1 mm range, 1 – 2 mm range and 2 – 5 mm range. For the environmental sample, a Chi-Square test was applied to compare the number of observations for each chemical family between the three size classes. Kruskal-Wallis tests followed by Bonferroni-Dunn post hoc tests were used to compare morphological characteristics between each chemical family identified in the environmental sample. All statistical analyses were conducted using the RStudio 0.99.491 platform (R Development Core Team, 2015). The significance level for all analysis was set at 95%.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

3.1.1. Chemical characterization

All reference polymers were successfully identified for each of the three runs (Figure 1). Out of the 103 particles collected at sea, 74 - 75% of them were successfully identified and 71 – 72% of the particles were microplastics of different polymer nature (PE, PP, PS, PUR; Figure 2). The other identified particles (3 – 5%) corresponded to inorganic particles (calcium carbonate ($CaCO_3$) and quartz (SiO_2)). The non-identified particles (25 – 26%) exhibited either spectra of a blue pigment (phthalocyanine blue, PB15) masking the signal of the polymer (5 – 6%), spectra with no identification in either the commercial libraries or the home database (4%), spectra exhibiting no signal (2 – 8%) or saturated signal (8 – 14%) (Figure 2). Saturated signals are mainly due to fluorescent molecules coming from pigments or environmental organic matter such as biofilm. It is noteworthy that the proportion of particles exhibiting saturated signal could potentially be reduced by wavelength modification or by applying a pre-treatment of the samples to remove the organic matter (e.g. biofilm, algae, etc.) covering the microplastics, as performed by Imhof *et al.* (2016). But these optional alternatives in the methodology are time consuming. The fraction of non-identified particles may originate from the presence of different compounds such as additives and/or dyes within the polymer matrix which may modify considerably the spectrum and thus complicate the identification of the particle (Imhof *et al.,* 2016; Lenz *et al.,* 2015; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). In the present study, only two dyes were identified: PB15 (blue dye) and titanium dioxide (TiO_2, white dye). While TiO_2 did not prevent polymer identification (SI, figure S1), in some case the PB15 (blue dye) overlaid completely the polymer matrix. A chemometric approach, based on Moreau and Rinnert's (2015) work, was applied in order to separate the spectral sources in a mixture (polymers, additives, etc.) but it was not possible to reveal the polymer spectrum by subtracting the pigment spectrum due to its more intense Raman signal (Van Cauwenberghe *et al.,* 2013; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). No significant difference in particle identification success was noticed between the 3 runs (Chi-Square test, p-value > 0.05), emphasizing the robustness of the assay.

Some studies adapted the analytical parameters such as laser-set wavelength, integration times or magnifications for each particle to improve the rate of identification for particles with no or poor Raman signal quality (Collard *et al.,* 2015; Enders *et al.,* 2015). Similarly, Imhof *et al.* (2016) suggested increasing the acquisition time up to 100-500 sec per particle in order to distinguish the polymer spectrum from the pigment. However, these single particle optimizations result in a substantial increase of the processing time, which is not appropriate for fast analysis of large sample set. The novelty in the present study is that analytical parameters were the same for all particles, which represents a time-saving improvement for microplastic characterization. Raman analysis took approximately 40 minutes for each run (surface analyzed: 25 x 21 mm; 110 particles) and did not need

machine operator intervention as the analysis was automated once particles were detected with ParticleFinder software.

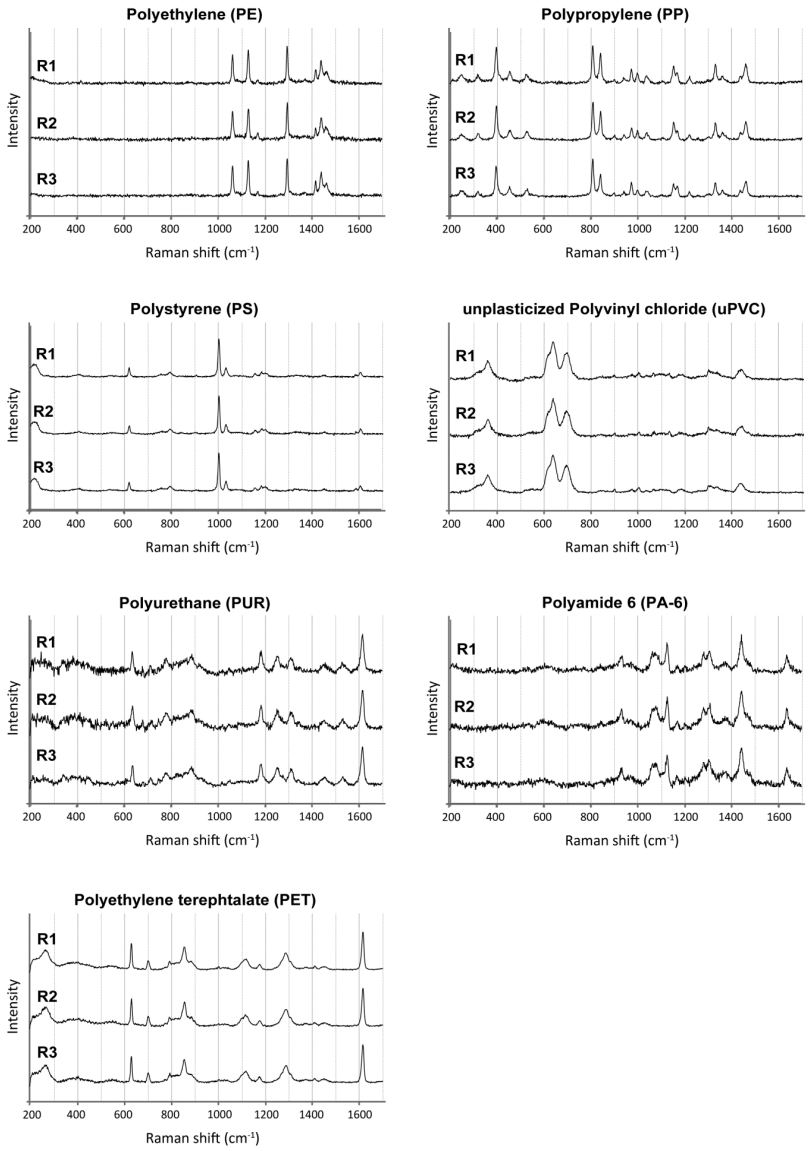


Figure 1: Spectra of the 7 reference polymers used, obtained by Raman analysis for 3 independent runs (R1 to R3). Intensity was normalized by the highest intensity peak.

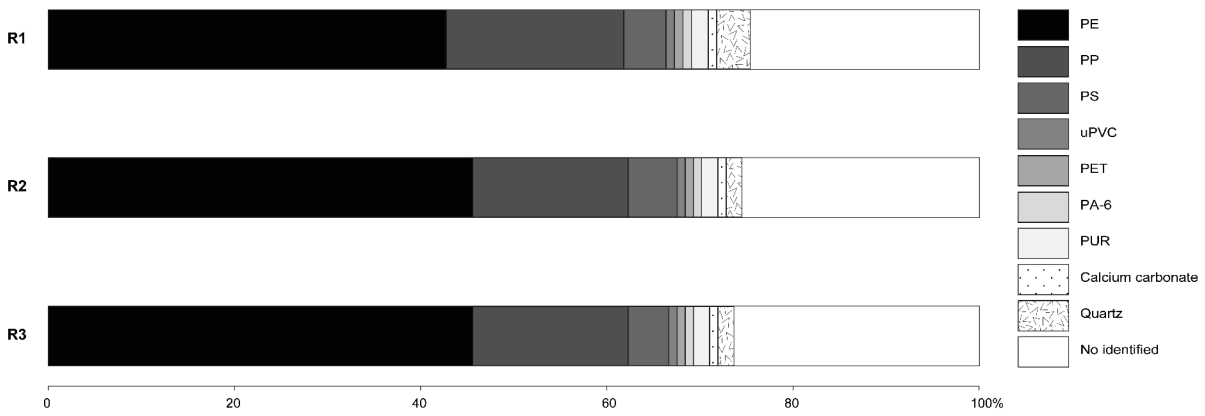


Figure 2: Proportion of each polymer family for 3 independent measures (R1 to R3). (PUR = polyurethane, PA-6 = polyamide-6, PET = polyethylene terephthalate, uPVC = unplasticized polyvinyl chloride, PS = polystyrene, PP = polypropylene, PE = polyethylene).

3.1.2. Morphological characterization

The 110 particles (103+7) were successfully located and individually characterized using size and shape descriptors defined by ParticleFinder (Figure 3) and no significant difference was noticed between the 3 runs for each of the 7 descriptors (Kruskal-Wallis test, p-values > 0.05). Size and shape descriptors such as major and minor axis, perimeter, diameter, area, ellipse ratio and circularity (Table 1) allowed the thorough measurement of irregular objects, and particle positioning by the machine operator did not affect these measurements. Such morphological assessment is of relevance to better characterize microplastics because inadequate understanding of the particle size is probably behind the loss of particles in water sample analyses (Filella, 2015). Indeed, in most microplastics studies particles size are expressed in terms of diameter or longest dimension, which are clearly not sufficient to unequivocally inform on the particle size and shape, especially when considering irregular and fibrillar particles. Such thin/irregular particles may then slip through the net of the sampling device (for instance here a Manta trawl) especially for particles with size close to the lower size limit of the mesh. Some studies used a specific image analysis software to characterize single particle morphology, involving several manipulations of particles with a risk of particle loss and a great increase in the processing time (Dekiff *et al.,* 2014; Enders *et al.,* 2015; Imhof *et al.,* 2016.). In the present study, about 2 hours were required to create the image of the 110 particles, but as it was automated it did not require operator time. Once the image was created, around 15 minutes were necessary to apply and adjust thresholds and morphological filtering operations to enhance particles localization prior to Raman analysis in order to be sure that all particles will be taken into account during the Raman spectra acquisition.

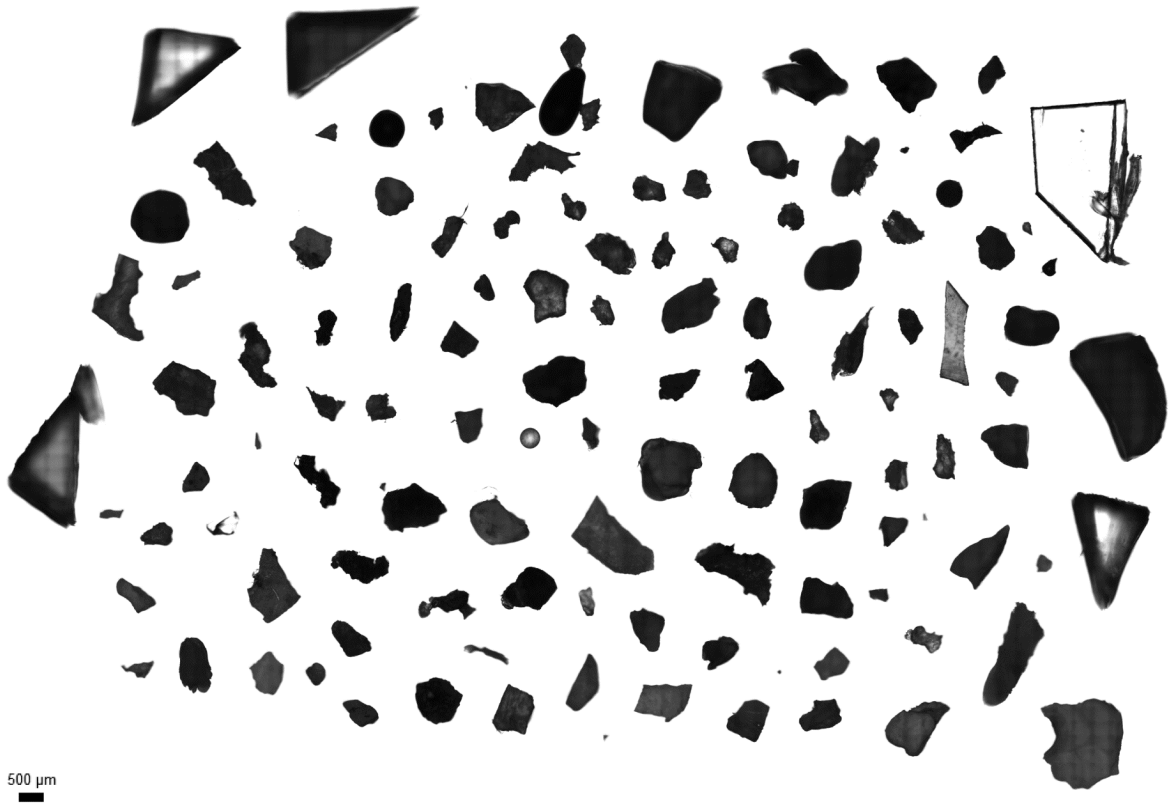


Figure 3: Image of the montage of the 110 particles analyzed for method validation (picture of replicate R1).

Table 1: Summary of morphological and shape descriptors of the 103 collected microplastics.

Collected particles		Size descriptors					Shape descriptors	
		Area (mm²)	Diameter (mm)	Perimeter (mm)	Major axis (mm)	Minor axis (mm)	Ellipse ratio	Circularity
Replicate R1	**Min**	0,081	0,322	1,247	0,368	0,198	0,216	0,603
	Max	3,379	2,074	9,536	3,354	1,642	0,984	0,947
	Mean	0,577	0,786	3,255	1,051	0,646	0,669	0,812
	SD	0,561	0,344	1,513	0,513	0,294	0,173	0,075
Replicate R2	**Min**	0,061	0,279	1,021	0,312	0,172	0,216	0,603
	Max	2,420	1,755	6,639	2,066	1,664	0,984	0,947
	Mean	0,494	0,740	3,045	0,974	0,611	0,669	0,812
	SD	0,386	0,287	1,204	0,394	0,263	0,173	0,075
Replicate R3	**Min**	0,063	0,283	1,099	0,304	0,131	0,169	0,534
	Max	2,354	1,731	6,595	2,344	1,653	0,982	0,949
	Mean	0,497	0,745	3,070	0,985	0,614	0,672	0,817
	SD	0,378	0,280	1,229	0,403	0,255	0,169	0,080

3.1.3. Outcomes of the complete analysis

The results of the 3 runs validated the method for microplastics collected in surface water in the Bay of Brest with a size range between 0.335 and 5 mm. This methodology offers the possibility to analyze the morphological and chemical features of all micro-particles with the same device, thus avoiding any transfer or loss of particles, and in a time effective way. Indeed, less than 3 hours were required for the complete analysis of 110 particles (surface area analyzed: 25 x 21 mm) representing a real improvement in the time required for microplastics characterization.

Only two studies have published time efficient measurement using chemical mapping: either by reflectance (Tagg *et al.,* 2015) or transmittance (Löder *et al.,* 2015) micro-FTIR spectroscopy to identify microplastics in polymer-spiked wastewater and in marine environment samples (plankton and sediment), respectively. Depending on the instrumental parameters selected for the analysis of whole filters, the measurements in these studies were achieved in less than 9 h for the entire analysis of a membrane filter of 47 mm (Tagg *et al.,* 2015) and in 10.75 h for a circular area of ~11 mm of an aluminum oxide filter of 25 mm (Löder *et al.,* 2015). These methods were performed for microplastics < 500 µm. Our time-saving measurement method for microplastic analyses includes a wider range of sizes (0.335 to 5 mm) and of different types (pellet, fragment and film), coupling polymer identification and morphological analyses.

3.2. Application of the methodology on large environmental sample

3.2.1. Visual sorting is not sufficient

Out of the 962 particles collected in surface water, 75% were chemically characterized. Microplastics (PE 48%, PP 12%, PS 11%) represented 71% of the whole sample (Figure 4), similar to the 68% of microplastics found in environmental samples after micro-spectroscopy Raman analysis (Lenz *et al.,* 2015). The 4% of identified particles remaining are quartz (2%) and carbonates (2%). The non-identified particles (25%) exhibited only PB15 dye spectrum (3%), spectra with no correspondence with databases (6%), or a signal that was either absent or saturated (16%) (Figure 4). Many published studies used visual sorting (Collignon *et al.,* 2014; Eriksen *et al.,* 2013b; Faure *et al.,* 2012; Free *et al.,* 2014; Ivar do Sul *et al.,* 2013; Lima *et al.,* 2014; McCormick *et al.,* 2014; Van Cauwenberghe *et al.,* 2013). However our results clearly indicate that visual sorting may lead to misestimating of actual microplastic concentrations thus suggesting that a complementary analysis is needed to confirm the polymer nature of the particles. This was highlighted recently for both particles and fibres (Song *et al.,* 2015) (Wesch *et al.,* 2016). In addition, it is noteworthy that the proportion of identified particles significantly decreased with the decrease of the major axis (Chi-square test, p-value < 0.05) (Figure 4), which is accordance with the results of (Lenz *et al.,* 2015). At the same time, the proportion of

minerals (quartz and carbonates) increased as the size decreased. This emphasizes the difficulty in visually differentiating microplastics from other organic and inorganic particles in smaller size classes. The non-identified fraction in the smallest size class (0.335 – 1 mm) could be better identified with an adaptation of the microscope objective. Further study is needed to test the identification success rate with different sized objectives.

As the proposed method is time effective, a large sample size can be analyzed in a reasonable amount of time, which prevents the downsizing to subsamples as is done in most studies (Claessens *et al.,* 2011; Cózar *et al.,* 2014; Dekiff *et al.,* 2014; Desforges *et al.,* 2014; Free *et al.,* 2014; Goldstein *et al.,* 2013; Martins and Sobral, 2011; Reisser *et al.,* 2013; Sadri and Thompson, 2014; Zhao *et al.,* 2015). When only subsamples are analyzed, the ratio between the total number of visually identified microplastics and the part that could be confirmed by spectral analysis must be used to correct the microplastics concentration of the whole sample (Enders *et al.,* 2015). However it is not necessarily accurate and most importantly, it is sometimes impossible especially when the analyzed subsample represents a fraction too small (Ballent *et al.,* 2013) or when the distribution of sizes varies greatly within each subsample.

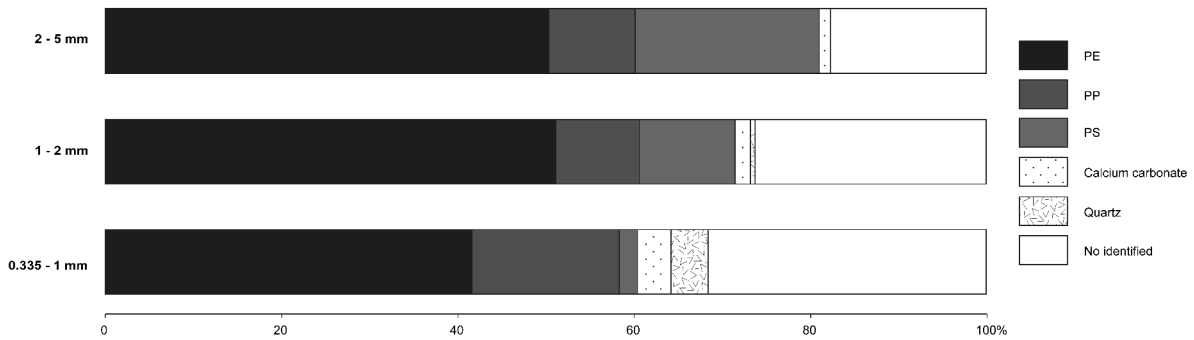


Figure 4: Proportion of particles identified and not identified in seawater samples (n=962 collected particles) depending on size class (0.333-1/ 1-2/ 2-5 mm) (Chi-Square test, p-value < 0.05).

3.2.2. The utility of particle morphology description

The main properties that drive the fate of particles are size, shape and density. Indeed, they are known to influence the particles' buoyancy, sedimentation, biofouling and fragmentation processes (ter Halle *et al.,* 2016). Hence, the assessment of these morphological parameters is of interest when studying microplastic contamination in the marine environment. For all the parameters tested (minor and major axis, perimeter, diameter, area, ratio ellipse and circularity) significant differences were observed in the distribution of quartz, PE, PP and PS particles (SI, table S2). For instance, the distribution of collected particles differed among the size (defined by the major axis) classes (SI, table S3; p-values <

0.05). Quartz was found exclusively in the smaller size classes: 13% in the 1 – 2 mm range and 87% in the 0.335 – 1 mm range. This may be due to their high density (d=2.63 g cm^{-3}) leading to the fact that bigger sand particles do not remain buoyant in the water column even in conditions of water mixing. On the other hand, PS particles were mainly found in the 2 – 5 mm range (60%). The disappearance or low proportion of PS in the small size classes (< 2 mm) in surface water may be related to physical processes such as wind blowing particles on shore, fragmentation processes and water mixing influencing sinking behavior. Rising or sinking velocity depends on the difference in density of the polymer (1.04 - 1.09 g cm^{-3} for PS or 0.01 – 1.05 g cm^{-3} for expanded PS) to seawater (~1.027 g cm^{-3}), and on the size and shape of the object (Ballent *et al.,* 2013). The model developed by Enders *et al.* (2015) showed that there is a fundamental difference between the vertical dispersion of small and large microplastics, with vertical distribution of microplastics increasing as their size decreases. These authors also showed that for particles collected in surface water, microplastics exhibiting a density lower than seawater were significantly larger (> 1 mm) than microplastics with higher density. This was not observed here as PS was found in higher proportion in the 1 – 5 mm range (94%, probably due to the presence of expanded PS) than PE (74%) and PP (58%) (SI, table S3). In addition, even though PE and PP were more evenly distributed among the three size classes, a significantly higher proportion of PP (42%) was observed in the smaller sizes (0.335 – 1 mm) compared to PE (26%) despite the fact that both polymers exhibit similar densities (0.90 - 0.92 g cm^{-3} for PP vs. 0.91 - 0.95 g cm^{-3} for PE) (SI, table S3). This difference in microplastic size distribution in surface water may be related to fragmentation or biological processes influencing their fate: the propensity to be incorporated into phytoplankton aggregates (Lagarde *et al.,* 2016; Long *et al.,* 2015) or into the food chain, as demonstrated in laboratory experiments (Cole *et al.,* 2015; Farrell and Nelson, 2013), may differ according to the polymer type. In addition, it could be reasonable to speculate that the efficiency of particles collection using a Manta trawl may vary according to the particles size and shape. For instance Shaw *et al.* (1994) observed that the concentration of microplastics was lower as their size approaches the lower sampling limit and the authors hypothesized that this reduction could be due to a preferential removal of this size of particles by marine organisms. Alternatively, this could also be attributed to differences in hydrodynamics and particle movements (Ter Halle *et al.,* 2016) or loss of irregular shaped fragments through the net as suggested by Isobe *et al.* (2014). Further studies measuring morphological descriptors are of interest to address the specific size distribution of chemical families in various environments as well as the efficiency of the sampling methods for particles of different size and shape.

4. Conclusion

The assessment of microplastics in marine environment is a multi-step process (sampling, extraction, detection and quantification of microplastics), in which each step is time consuming. The high variability in chemical composition and morphology of microplastics represents a bottleneck for field and laboratory analysis while it is a real challenge for answering crucial questions about the sources and fate of microplastics in aquatic environments. The present study offers a reproducible and time effective method for rapid and thorough morphological and chemical characterization of microplastics using a semi-automated scanning of particles coupled to micro-Raman spectroscopy. The rapid analysis of large number of collected particles allows for an exhaustive assessment of large sample sizes and not only small subsamples. Until recently, most published studies using spectroscopy confirmatory methods did not necessarily provide the success rate of particle identification or the detailed proportions of true microplastics vs. other organic or inorganic particles. Yet this information is crucial for assessing the representativeness of the results as well as the efficiency of this type of analysis. To ensure reproducibility, comparability and representativeness of the spectroscopic analyses in the emerging field of microplastic research, standard operating procedures describing the way to sample, extract, conduct analyses and also report data should be implemented as was done for instance in the field of molecular biology for Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis to assure a high degree of standardization (see the MIQE guidelines, Bustin *et al.,* 2009).

Finally, the thorough assessment of particle morphological features of 962 particles collected at sea revealed significant differences in size/area distribution as a function of the chemical nature of the particle. These results raised questions about physical (fragmentation, sedimentation, water mixing) and biological processes (bioavailability, interactions with living cells) that may influence microplastic distribution in the first layers of the water column, and whether these influences could be polymer dependent. Further studies measuring these particle morphological features are encouraged for addressing the specific size distribution of the polymer families for various environments.

5. Acknowledgements

This study was partly funded by the MICRO EU Interreg-funded project MicroPlastics (MICRO 09-002-BE). We acknowledge I. Bihannic, M. Tardivel, K. Boukerma, F. Colas, V. Larat, S. Vergnole and M. Cachera for helpful discussions and technical assistance. We thank E. Harney for his help in editing the English. L. Frère was funded by a joint Brest Métropole and Brest University grant.

Supplementary information

Table S1: Size of all reference polymers used as spikes.

Plastic references	Major axis (µm)	Minor axis (µm)
PA-6	3312	1404
PE	3300	1304
PET	1221	890
PP	2923	1229
PS	2735	1617
PUR	2360	701
uPVC	2292	1421

Table S2: Kruskal-Wallis rank sum test to assess the difference in morphological features as a function of particle nature.

Morphological and shape features	p-values	degree of freedom	Posthoc Dunn test results
Major axis	$< 2.2\ 10^{-16}$	4	PS ≠ PE, PP, Q, CaCo3 PE ≠ PP, PS, Q PP ≠ PE, PS, Q
Minor axis	0.1103	4	No significant difference
Diameter	$< 2.2\ 10^{-16}$	4	PE ≠ PP, PS, Q PP ≠ PE, PS, Q PS ≠ PE, PP, Q, CaCo3
Perimeter	$3.3\ 10^{-16}$	4	PE ≠ PS, Q, CaCo3 PP ≠ PS, Q PS ≠ PE, PP, Q, CaCo3
Area	$< 2.2\ 10^{-16}$	4	PE ≠ PP, PS, Q, CaCo3 PP ≠ PE, PS, Q PS ≠ PE, PP, Q, CaCo3
Ratio Ellipse	0.1498	4	No significant difference
Circularity	$< 2.2\ 10^{-16}$	4	PE ≠ PP, PS, Q, CaCo3 PP ≠ PE, PS, Q, CaCo3 PS ≠ PE, PP, Q, CaCo3

Table S3: Density (g cm^{-3}) and size distribution (%) of collected particles in surface water (seawater density: ~1.027 g cm^{-3}).

Particle types	Density (g cm^{-3}) (GESAMP, 2015)	Size distribution in surface water (%)		
		0.335 - 1 mm	1 - 2 mm	2 - 5 mm
Polyethylene	0.91 - 0.95	26	40	34
Polypropylene	0.90 - 0.92	42	30	28
Polystyrene (expanded polystyrene)	1.04 - 1.09 (0.01 – 1.05)	5	35	59
Quartz	2.63	86	14	0
Calcium carbonates	2.70 – 2.90	52	29	19

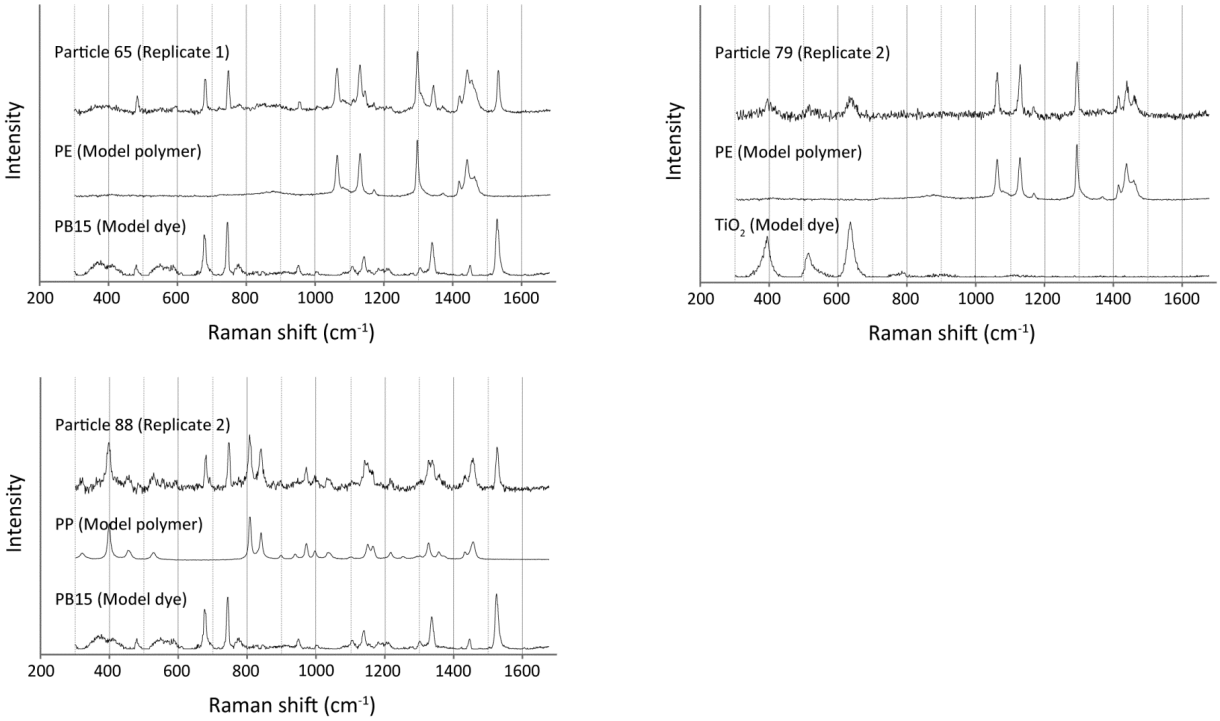


Figure S1: Spectra of colored particles collected in the Bay of Brest, polymer and dye references obtained by Raman analysis (PE: polyethylene, PP: polypropylene, PB15: phthalocyanine 15, TiO_2: Titanium dioxide). Each intensity was normalized by the highest intensity peak.

B. Digestion de tissus biologiques

L'article présenté dans ce sous-chapitre met en avant les résultats de la comparaison de 6 protocoles d'extraction des microplastiques à partir des tissus d'organismes marins revus et adaptés de la littérature afin de sélectionner le plus adapté à l'analyse des tissus biologiques (Figure 21). Ces travaux ont été réalisés conjointement entre le LEMAR (A.L. Cassone, CNRS), le Laboratoire de Sécurité des Aliments (ANSES) de Boulogne-sur-Mer (G. Duflos, A. Dehaut, L. Hermabessière, C. Himber) et la Direction de l'Evaluation des risques (G. Rivière) au sein d'un projet financé CRD-ANSES. Les analyses par spectroscopie Raman ont été réalisées au LDCM sous la responsabilité scientifique et technique d'E. Rinnert.

Pour l'extraction des microplastiques des matrices biologiques il est essentiel d'identifier une méthode de digestion permettant une destruction rapide et efficace des matrices biologiques sans altération des polymères potentiellement présents.

La première étape (expériences 1 et 2) a consisté à vérifier que l'intégrité de 15 polymères de référence (AC, PEHD, PEBD, PA-12, PA-6, PC, PET, PMMA, PP, PS, PSxL, ePS, uPVC, PTFE, PUR) n'était pas altérée en fonction des traitements des protocoles testés (Figure 21). La mesure de l'altération des polymères a été réalisée en suivant l'évolution de leurs masses, en observant visuellement les éventuels changements de forme et de couleur et en analysant leur composition moléculaire (microscopie optique, micro-spectroscopie Raman, Py-GC/MS) avant et après l'application des différents protocoles. Ces mesures ont permis de sélectionner les protocoles KOH 10 % (60 °C, 24 h), et $K_2S_2O_8$ 0,27 M et NaOH 0,24 M (65 °C, 24 h) répondant aux critères suivants : pas de changement de masse, de forme, de couleur ou de composition moléculaire significatif des différents polymères testés, excepté pour l'acétate de cellulose (AC) qui est partiellement dégradé par ces deux protocoles (Figure 21). Ces protocoles ont été ensuite appliqués sur des matrices biologiques (moules, étrilles, dorades grises) (expérience 3), l'efficacité de digestion de ces matrices a été calculée et une expérience d'enrichissement (spiking) a été réalisée avec un polymère dense (PA-6) afin de valider la méthode (Figure 21). L'ensemble de ces tests a montré que le traitement des matrices biologiques avec une solution basique de KOH 10 % pendant 24 h à 60 °C permet une extraction performante des microplastiques via une digestion efficace des matrices biologiques sans altération des polymères.

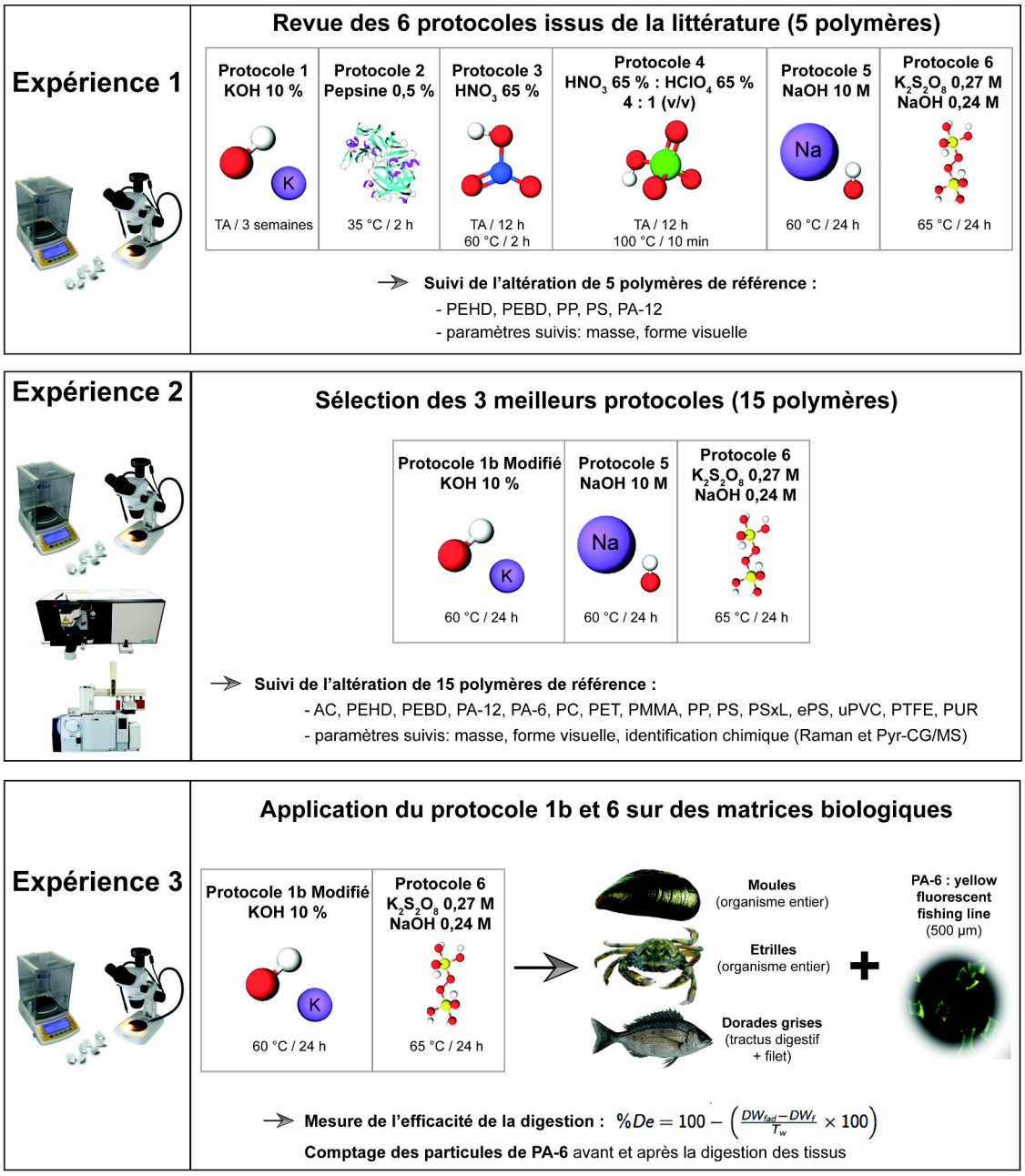


Figure 21 : Revue et optimisation de 6 protocoles de référence dans la littérature pour extraire les microplastiques d'une matrice biotique (TA : température ambiante) (AC : acétate de cellulose, PEHD : polyéthylène haute densité, PEBD : polyéthylène basse densité, PA-12 : polyamide 12, PA-6 : polyamide 6, PC : polycarbonate, PET : polyéthylène téréphtalate, PMMA polyméthylmétacrylate, PP : polypropylène, PS : polystyrène, PSxL : polystyrène réticulé, ePS : polystyrène expansé, uPVC : polychlorure de vinyle non plastifié, PTFE : polytétrafluoroéthylène, PUR : polyuréthane).

Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization

Alexandre Dehaut, Anne-Laure Cassone, Laura Frère, Ludovic Hermabessière, Charlotte Himber, Emmanuel Rinnert, Gilles Rivière, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Arnaud Huvet, Guillaume Duflos and Ika Paul-Pont.

Published in Environmental Pollution (2016)

Abstract: Pollution of the oceans by microplastics (< 5 mm) represents a major environmental problem. To date, a limited number of studies have investigated the level of contamination of marine organisms collected *in situ*. For extraction and characterization of microplastics in biological samples, the crucial step is the identification of solvent(s) or chemical(s) that efficiently dissolve organic matter without degrading plastic polymers for their identification in a time and cost effective way. Most published papers, as well as OSPAR recommendations for the development of a common monitoring protocol for plastic particles in fish and shellfish at the European level, use protocols containing nitric acid to digest the biological tissues, despite reports of polyamide degradation with this chemical. In the present study, six existing approaches were tested and their effects were compared on up to 15 different plastic polymers, as well as their efficiency in digesting biological matrices. Plastic integrity was evaluated through microscopic inspection, weighing, pyrolysis coupled with gas chromatography and mass spectrometry, and Raman spectrometry before and after digestion. Tissues from mussels, crabs and fish were digested before being filtered on glass fibre filters. Digestion efficiency was evaluated through microscopical inspection of the filters and determination of the relative removal of organic matter content after digestion. Five out of the six tested protocols led to significant degradation of plastic particles and/or insufficient tissue digestion. The protocol using a KOH 10% solution and an incubation at 60 °C during a 24 h period led to an efficient digestion of biological tissues with no significant degradation on all tested polymers, except for cellulose acetate. This protocol appeared to be the best compromise for extraction and later identification of microplastics in biological samples and should be implemented in further monitoring studies to ensure relevance and comparison of environmental and seafood product quality studies.

Keywords: microplastics, digestion, method, seafood products, tissue, plastic integrity

1. Introduction

Worldwide annual production of plastics has been steadily increasing since 1950 and was estimated at 311 million tons in 2014 (PlasticsEurope, 2015). Plastics include more than twenty families of polymers among which six are referred to as the "big six": polypropylene (PP), high- and low-density polyethylene (HDPE & LDPE), polyvinyl chloride (PVC), polyurethane (PUR), polyethylene terephthalate (PET) and polystyrene (PS) and correspond to 80% of the plastic production in Europe (PlasticsEurope, 2015). Very little plastic is recycled and it fragments or degrades at a very slow rate, thus accumulating in all environments. The first observations of microplastic pollution in marine ecosystems were recorded in 1972 (Carpenter *et al.,* 1972). More recently, it has been estimated that 10% of plastics produced end up in oceans (Thompson, 2006), comprising 60% to 80% of the marine litter (Laist, 1987; Moore, 2008). From the surface to the ocean floor, studies have described between 7000 tons and 250,000 tons of plastics floating at the surface of seawater (Cózar *et al.,* 2014; Eriksen *et al.,* 2014), in the water column (Lattin *et al.,* 2004) and in seabed sediments (Fischer *et al.,* 2015; Fries *et al.,* 2013; Van Cauwenberghe *et al.,* 2013). Plastics in oceans are encountered in macro- (>25 mm), meso- (5-25 mm) and microplastic forms (<5 mm) (Arthur *et al.,* 2009; Shim and Thompson, 2015; Thompson, 2004). Primary microplastics are referred to as microparticles produced as such, *i.e.* plastic pellets, exfoliating cosmetics or synthetic clothing fibres (Chang, 2015; Napper *et al.,* 2015; Mato *et al.,* 2001; van Wezel *et al.,* 2015), while secondary microplastics derive from the breakdown of larger plastic debris (Browne *et al.,* 2007; Cole *et al.,* 2011; Shah *et al.,* 2008; Thompson, 2004).

Ingestion of microplastics has been shown in laboratory and field studies for numerous marine organisms including zooplankton, worms, bivalves, crustaceans, demersal and pelagic fish, seabirds, reptiles and mammals (Codina-García *et al.,* 2013; Cole *et al.,* 2013, 2014; De Witte *et al.,* 2014a; Lusher, 2015; Lusher *et al.,* 2013, 2015; Moore *et al.,* 2001; Sussarellu *et al.,* 2016; Tourinho *et al.,* 2010; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Van Cauwenberghe *et al.,* 2015; Watts *et al.,* 2014). Studies of fish have found between 2% to 40% of individuals to be contaminated, with a mean number of particles from 1 to 7.2 per individual (Boerger *et al.,* 2010; Foekema *et al.,* 2013; Lusher *et al.,* 2013). For molluscs and especially *Mytilus edulis*, this microplastic load was reported to vary from 0.2 to 0.5 plastic particles per gram of tissue, leading to an average number being around one particle per individual (De Witte *et al.,* 2014; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). It is noteworthy that all types of fibres could not be doubtlessly assessed in these latter studies due to the use of nitric acid. Microplastic accumulation through trophic levels is suspected to occur, as has already been reported at the lower levels of the food web (Farrell and Nelson, 2013; Setälä *et al.,* 2014).

There is a great concern surrounding microplastics in numerous environmental and food science fields of research, as these pollutants can be deleterious for biota; first by their nature as a mechanical hazard

(Cole *et al.,* 2011), and most importantly as they are suspected to transfer microorganisms or pollutants adsorbed on their surface, additives, and other toxic chemicals into the guts of organisms, which may affect physiological functions (Browne *et al.,* 2013; Teuten *et al.,* 2009; Thompson, 2004; Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Zettler *et al.,* 2013). Microplastics might also represent a threat for human consumers through the consumption of seafood products; although potential risks for human health posed by plastics as such, or as carriers of pollutants remains undocumented (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). If they wrote that adsorbed pollutants should not be a threat considering the "low significance of this transport from microplastics", a greater concern arose from intrinsic additives, active at low concentrations such as phthalates, bisphenol A or flame retardants.

Numerous methods have been developed to extract microplastics from sediment and biological tissues. They can be classified as acidic (Claessens *et al.,* 2013; De Witte *et al.,* 2014), alkaline (Cole *et al.,* 2014; Foekema *et al.,* 2013), oxidizing (Nuelle *et al.,* 2014; Avio *et al.,* 2015) and enzymatic methods (Cole *et al.,* 2014). However, most of these methods are not adapted for large scale monitoring as they are either time consuming or too expensive to be implemented on a large scale. As a consequence, these methods do not accurately meet, to date, the call of some international bodies such as OSPAR or the Marine Strategy Framework Directive to provide standard, effective and cost efficient analytical methods (European Commission, 2010; OSPAR, 2015). Indeed, the relatively low percentage of animals exhibiting plastics in their tissue reported so far in the literature (Lusher, 2015) implies that a high number of animals should be analysed for routine plastic monitoring as advised by OSPAR (OSPAR, 2015). More worrying is the often insufficient efficiency in digesting biological tissues and the damage that can potentially be observed in plastics after the digestion and extraction processes. For instance, most published papers, as well as OSPAR recommendations, are using protocols containing nitric acid to digest biological tissues, despite reports of substantial degradation of some polyamide types (Avio *et al.,* 2015; Cole *et al.,* 2014; OSPAR, 2015). This might lead to underestimations of microplastic loads and misinterpretations of the actual levels of contamination in marine organisms. This is especially true as polyamide (PA) is among the 10 most produced plastics, this polymer is therefore likely to be released and found in the environment. Finally, the range of tested families of plastics is often small in published studies, with little concern for the impact of the digestion procedure on plastic identification by either Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, or Pyrolysis-GC/MS (Pyr-GC/MS) (Cole *et al.,* 2014; Foekema *et al.,* 2013; Fries *et al.,* 2013; Lusher *et al.,* 2014; Nuelle *et al.,* 2014; Van Cauwenberghe *et al.,* 2015).

The present study aims to identify a protocol to digest organic matter from biological samples that conforms to the technological limitations for large scale monitoring of microplastic contamination in fish and shellfish consumed by humans. To do so, existing and adapted methodologies were reviewed, and their limits were defined by testing: (i) polymer integrity in up to 15 plastic families through microscopic inspection and weighing; (ii) polymer identification using Pyr-GC/MS and Raman micro-

spectrometry analyses prior to and after digestion; and (iii) efficiency in digesting biological tissues of molluscs, crustaceans and fish, achieved by filtration, visual inspection and evaluation of the remaining organic matter content on the filters. A first experiment (experiment 1) was conducted on 5 polymer types (including polyamide) to quickly rule out non-suitable digestion protocols, *i.e.* protocols leading to substantial degradation of polyamide and potentially other polymers. Subsequently, a more thorough experiment (experiment 2) was performed in order to test the suitable selected digestion protocols on a wider range of polymer types. Finally, the protocols identified in experiment 2 were tested on biological matrices (experiment 3).

2. Materials and methods

Out of the fifteen types of plastics tested in this study, fourteen were supplied by Goodfellow Cambridge Ltd (Lille, France) (Supplemental Table 1). These included cellulose acetate (CA), high and low density polyethylene (HDPE & LDPE), polylauryllactam (PA-12), polycaprolactam (PA-6), polycarbonate (PC), polyethylene terephthalate (PET), poly(methyl-methacrylate) (PMMA), polypropylene (PP), polystyrene (PS), crosslinked polystyrene (PSXL), polytetrafluoroethylene (PTFE), polyurethane (PUR) and unplasticized polyvinyl chloride (uPVC). Expanded polystyrene (ePS) was collected on our own.

2.1. Experiment 1: elimination of the non-suitable protocols

For this preliminary study, five uncoloured, granule-like, plastics particles (*ca.* 3 µm diameter): LDPE, HDPE, PP, PA-12 and PS were tested using the six digestion protocols described below. Three particles of each of the plastic families were weighed five times on a 1 mg sensitivity analytical balance (Sartorius CP224S, Dourdan, France). Each sample was also photographed using an Olympus SZ61 binocular microscope mounted with a DP21 camera (Rungis, France) and 2650K light. Weighing and image capture were performed before and after application of the digestion protocols to determine their potential deleterious effects.

Six existing protocols were tested. **Protocol 1** was adapted from Foekema *et al.* (2013): plastics were incubated for 3 weeks at room temperature (21 ± 2 °C) with 20 mL of 10% (w/w) potassium hydroxide (KOH) solution (Fisher Labosi, Elancourt, France). **Protocol 2** was based on the study of Karl *et al.,* (2014). Briefly a solution of 0.5% (w/v) pepsin was prepared in 0.063M hydrochloric acid (HCl) (VWR, Fontenay-sous-bois, France) from a 2,000 FIP-U/g pepsin solution (Panreac, Lyon, France). Plastics were incubated for 2 h at 35 °C in 20 mL of pepsin solution in a beaker placed on a VELP Scientifica AREX heating bench (Usmate, Italy) equipped with a VTF temperature sensor to

maintain the specified temperature. **Protocol 3** was adapted from Van Cauwenberghe *et al.* (2015) & Van Cauwenberghe and Janssen (2014). Plastics were placed in 20 mL of a 65% nitric acid (HNO_3) solution (Merk, Fontenay-sous-Bois, France) and maintained at room temperature overnight prior to being heated at 60 °C for 2 h and diluted with warm (80 °C) distilled water. **Protocol 4** was adapted from the method used by De Witte *et al.,* (2014) recommended by the Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic (OSPAR, 2015). Plastics were added in 20 mL of solution containing a 4:1 (v/v) mix of 65% HNO_3 and 65% perchloric acid ($HClO_4$) solutions (VWR) respectively. Tubes were left at room temperature, overnight, and were boiled for 10 min before being diluted with warm distilled water (80 °C). **Protocol 5** was adapted from the work of Cole *et al.,* (2014): plastics were incubated at 60 °C during 24 h with 20 mL of 10M sodium hydroxide (NaOH) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). **Protocol 6** was developed based on the method reported by Maher *et al.* (2002) using an oxidizing solution prepared extemporaneously, composed of 0.27M peroxodisulfate potassium ($K_2S_2O_8$) (Sigma-Aldrich) and 0.24M NaOH. Plastics in oxidizing solution were incubated at 65 °C for 24 h. All experiments were performed in clean glass tubes, except protocol 2 that required a clean beaker.

2.2. Experiment 2: impact of the three selected digestion protocols on the integrity of 15 plastic families

Only methods that exhibited acceptable results in experiment 1, *i.e.* no degradation of plastic polymers, and that met Marine Strategy Framework Directive and OSPAR recommendations (time effective and low cost), were kept for a more thorough study on a wider range of plastics.

2.2.1. Protocols

Based on the results of the preliminary study, only protocols 5 and 6 demonstrated suitable outcomes, *i.e.* short duration of digestion and no degradation of plastics; thus they were selected for a thorough study on a wider range of plastics. An altered protocol (**Protocol 1b**) was also selected after modification of protocol 1, reducing the 3 weeks at room temperature step to a 24 h incubation step at 60 °C.

2.2.2. Processing of plastic samples

The range of plastic polymers tested was expanded from 5 to 15 families. Analyses were performed on 3 replicate samples per plastic family. Samples of plastic were cut with a scalpel as thin as possible to obtain small fragments (1-5 mm) and put into glass Petri dishes. To test the impact of the digestion

protocols, 10 mL of each tested solution was poured into a Petri dish with plastic fragments and incubated without agitation. Before and after application of digestion protocols, fragments were rinsed with bi-distilled water and dried for 2.5 h at 50 °C. A series of weighings (n=5 per replicate) were performed for each plastic sample on a 0.1 mg precision analytical balance (Sartorius Genius, Dourdan, France). A photograph of each fragment was taken as described in 2.1. One replicate sample of each plastic was analysed by Raman micro-spectrometry and another one by Pyr-GC/MS in order to evaluate whether digestion protocols interfere with the identification of plastic families. All analyses (photographs, weighings, Raman micro-spectrometry and Pyr-GC/MS) were performed before and after application of digestion protocols.

2.2.3. Plastic identification

For Raman analysis, each particle was placed on a gold coated microscope slide and analysed using a combination of static image analysis of particles with a HORIBA Scientific LabRam HR800 Raman micro-spectrometer (Villeneuve d'Ascq, France) with laser wavelength set at 785 nm and a 10x Olympus objective. The analysis of particles was carried out using a combination of static image analysis of particles and automated Raman micro-spectroscopy, allowing the analysis of number, size, shape and chemical composition of a large number of particles. Polymers were identified using spectroscopy software (KnowItAll, Bio-Rad) with queries against our own database containing pre-established polymer spectra.

For Pyr-GC/MS analysis, a small piece (< 0.5 mm^3) of each sample was placed in a pyrolysis cup on the AS-1020E autosampler of a Frontier Lab EGA/PY – 3030D (Fukushima, Japan), before being pyrolysed at 600 °C. Pyrolysis products were directly injected, with a split of 20, on a coupled Shimadzu GC-2010 device (Noisiel, France) and separated on a Restek RXi-5ms ® column (Lisses, France). Helium was used as carrier gas with a linear velocity of 40 cm/s. The oven program was set as follows: 5 min at 40 °C increasing to 320 °C at 20 °C/min, maintained for 14 min. Mass spectra were obtained by a Shimadzu QP2010-Plus mass spectrometer coupled to the GC. Interface temperature was fixed at 300 °C to prevent re-condensation, ionization voltage was set at 70 eV and a mass range extending from 33 to 500 m/z was analysed with a 2000 Hz scan speed. Samples were identified using F-Search software 4.3, querying pyrograms against Frontier Lab's database and our own database containing pre-established pyrograms with plastic samples. Identification was established based on the similarity percentage between average mass spectra. As advised by the Pyr-GC/MS supplier, a minimal value of 80% was necessary to certify the proper identification.

2.3. Experiment 3: application of selected digestion protocols on seafood products

2.3.1. Protocols

Two out of the three previous protocols (1b and 6), were selected to be tested for digestion of biological tissues. A sequential approach was used: they were first tested on mussels, then on crabs and fish, and whenever a protocol was not considered as efficient on a seafood product, it was ruled out for the next product. While incubation time and temperature remained unchanged, digestion of tissues and cartilage for crabs from seafood products were carried out on a Labomoderne AG610 multi-positions magnetic hot plate stirrer (Paris, France) at 300 rpm.

2.3.2. Seafood products

Tissues from three different marine animals were analysed: mussels (*Mytilus edulis*), velvet crabs (*Necora puber*) and black seabreams (*Spondyliosoma cantharus*). All tools and glassware used for the digestion tests were carefully rinsed with distilled water filtered through 90 mm GF/A 1.6 µm glass fibre filters (Whatman, Velizy-Villacoublay, France). Water used to rinse all seafood products was systematically distilled and filtered before use. All analyses were performed on 3 individuals per species and digestion protocols. All animals were collected in the Bay of Brest (France) and stored at -20 °C prior to analysis. Mussels (5.4 ± 1.3 g, mean ± standard deviation) were shelled, weighed and rinsed before being placed in 250 mL of digestion solution. Crabs were rinsed and carefully shelled. Tissues and cartilages were gathered with pliers and scalpels and weighed (5-10 g) before being placed in 250 mL of digestion solution. Black seabream were first sized and weighed before being rinsed, carefully gutted to extract the whole alimentary tract and filleted. Fillet (150.7 ± 37.3 g) and whole alimentary tract (34.9 ± 12.8 g) were weighed and respectively placed in 500 mL and 250 mL of digestion solution. After applications of protocols, digestates were filtered through GF/A 1.6 µm glass fibre filters. In the case of the presence of debris in the digestate, especially for whole alimentary tract, a density-based separation step using sodium tungstate was subsequently added. Briefly, a 70% (w/w) sodium tungstate (Acros Organics, Geel, Belgium) solution (d = 1.5g/cm^3) was added to the digestate (2:1, v/v) right after the 24 h digestion. The mixture was then thoroughly stirred for 10 minutes before being left to settle for 1 h. The supernatant, containing the floating plastic particles (Corcoran *et al.,* 2009), was subsequently collected and filtered, as previously described.

Concerning the spiking approach described in 2.3.4, triplicate samples of cod (*Gadus morhua*) fillets (23.6 ± 3.2 g), saithe (*Pollachius virens*) whole alimentary tract (9.7 ± 0.6 g) and mussels (4.0 ± 0.9 g) were studied.

2.3.3. Assessment of digestion efficiencies

The propensity of the selected protocols to properly digest flesh was assessed through microscopic inspection of filters using a Zeiss Stemi 2000-C binocular microscope (Marly-le-Roi, France). This device was mounted with a Canon EOS 600D camera and illuminated with a 2500K light. A digestion was qualified as efficient in the absence of debris, organic matters, shell or cartilage, which can hinder microplastic detection on the filter. Also, dry weight of each filter, obtained by placing filters at 60 °C for 24 h, was measured before and after digestion to assess the proportion of remaining organic matter on each filter after digestion. Digestion efficiencies (*%De*) were calculated as follows, where *%De* corresponds to the digestion efficiency, DW_f and DW_{fad} correspond respectively to the dry weights (n=5) of the "clean" filter before filtration and the filter covered by organic matter and debris after digestion. Finally, T_w corresponds to the average weight of tissues subjected to digestion (n=50).

$$\%De = 100 - \left(\frac{DW_{fad} - DW_f}{T_w} \times 100\right)$$

2.3.4. Spiking tests

A spiking approach was also performed to endorse protocol 1b. A commercial yellow fluorescent fine fishing line was cut into small particles of ca. 500 µm. Its polymer composition was identified thanks to Pyr-GC/MS as PA-6 (94% similarity). Ten yellow PA-6 particles were spiked in the samples of tissue with a thin sewing needle. Samples were digested for 24 h at 60 C and 300 rpm with 250 mL of 10% (w/w) KOH. A recovery percentage was calculated with a ratio of the count of yellow particles lying on filters after filtration and the number of initially spiked particles. Finally, nylon particles recovered after digestion were analysed by Pyr-GC/MS.

2.4. Statistics

Results of weight measurements were represented on bar charts as means of the 5 replicates. Error bars on charts represent the expanded weighing uncertainty of the results (U_{eb}), evaluated based on the recommendations of the International organization for standardization (ISO/IEC Guide 98-3, 2008). This parameter provides a fine determination of uncertainty compared to the value given by the maximum permissible error and takes into account uncertainty related to reproducibility and resolution of the analytical balance.

U_{eb} was estimated as follows, with d being the resolution of analytical balance and e the standard deviation obtained after evaluation of the reproducibility by consecutive weighing (n=50). Mean values with more than 0.1 mg difference were considered as significantly different.

$$U_{eb} = 2 \times \sqrt{\left[\left(\frac{d}{2 \times \sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{e}{\sqrt{3}}\right)^2\right]}$$

Size evolution was assessed using the histogram tool on GIMP 2 software (2.8.16). Briefly, each fragment area was selected and the number of pixels was recorded. A loss percentage was evaluated as a ratio of pixel numbers before and after treatment by each protocol.

3. Results and discussion

3.1. Experiment 1: elimination of the non-suitable protocols

This experiment aimed to test the six protocols on a small subsample of polymers, as degradation of polymers such as polyamide allows the exclusion of some of the tested protocols. Protocols 1 and 2 did not lead to any weight change (Supplemental Table 2) or plastic degradation, as confirmed by the absence of visual change. However protocol 1 could not be kept as such, due to the long extraction duration (3 weeks), which was considered to be too constraining to be performed routinely and on a large scale. Although having proved to be effective for research of parasites in fish fillets (Karl *et al.,* 2014), and having no adverse effect on the tested polymers, protocol 2 was not conserved. Indeed, debris and organic matter were already observed after the digestion step (Llarena-Reino *et al.,* 2013) and could have been problematic for experiment 3, particularly with clogging issues. Protocol 2 was consequently not retained for further investigation. Protocols 3 & 4 both used nitric acid and led to poor results regarding plastic integrity. The main observations that stand out after digestion with protocol 3 were: (i) the degradation of PA-12 (**Fig. 1a, b**), accompanied by a decrease in particle weight; and (ii) marked sample yellowing (**Fig. 1c, d**) observed for all polymers. Identical modifications were also observed for plastics subjected to protocol 4, though to a lesser extent, probably due to the dilution of HNO_3 by one volume of $HClO_4$. Similarly, Claessens *et al.* (2013) observed a critical melting of PS particles directly exposed to HNO_3, although this was not observed when particles were embedded in tissues, suggesting the importance of the amount of acid directly in contact with plastics. The present study confirms previous findings of polyamide degradation (Claessens *et al.,* 2013; OSPAR, 2015). Such a result is a major concern, as this plastic family represents a significant volume of production worldwide, and may thus be found in the environment with an increased likelihood (Dantas *et al.,* 2012; Lusher *et al.,* 2013; Rochman *et al.,* 2015). Therefore, the use of HNO_3 to digest seafood products for microplastic surveys should be proscribed. Protocols 5 and 6 did not affect the plastic polymers tested here. No modification of weight and shape was observed. Furthermore, these protocols have the additional advantages of short incubation duration (24 h) and use relatively low cost chemicals. Based on these results, it was decided to keep protocols 5 and 6 as such, and to revise protocol 1 as suggested by Rochman *et al.* (2015), by reducing the incubation time to 24 h and increasing the incubation temperature to 60 °C (Protocol 1b).

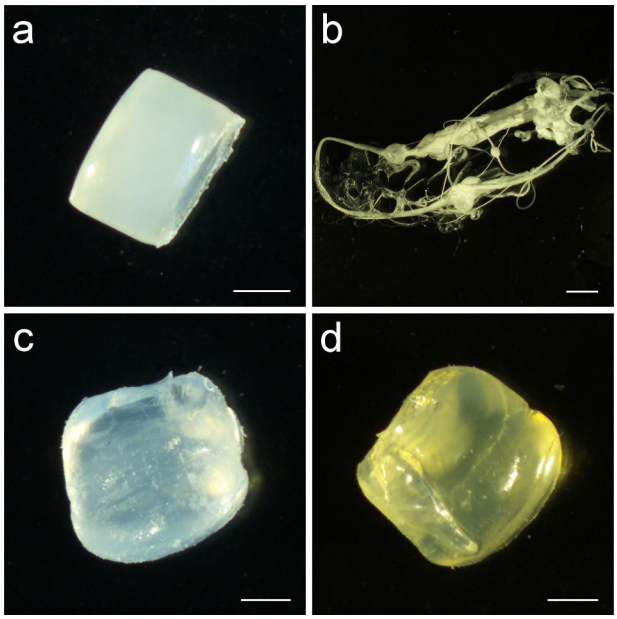


Fig. 1. Microscopic observations of plastics treated with protocol 3 (65% HNO3 at room temperature overnight, then 60 C for 2 h). On the upper half: pictures of poly- lauryllactam (PA-12) before (a) and after (b) application of protocol. On the lower half: pictures of low density polyethylene (LDPE) before (c) and after (d) application of the protocol.

3.2. Experiment 2: impact of the three selected digestion protocols on the integrity of 15 plastic families

Protocols 1b, 5 and 6 were tested on a wide range of 15 plastic families (1-5 mm), using microscopic observation, precision weighings, Raman micro-spectrometry and Pyr-GC/MS identifications.

3.2.1. Change in weights

The majority of plastics appeared not to be affected by the application of protocols 1b, 5 and 6, with no significant changes in weight for the three replicates of respectively 10, 11 and 10 families (**Table 1**; Supplemental Fig. 1, 2 & 3). Regardless of the tested protocol, ePS masses were too close to the quantification limit of the analytical balance, with weights lower than 0.1 mg. This was not surprising considering that expanded polystyrene mainly contains air. Thus, weighing was not conclusive for ePS, and impacts of the protocols on sample integrities were exclusively evaluated by microscopic observations, Pyr-GC/MS and Raman spectroscopy analyses.

Regarding protocols 1b and 6, incoherent weight increase/decrease were observed for one out of the three replicates of respectively HDPE, PC and PP and with PA-6, PMMA and PTFE, as illustrated for PC in Fig. 2. Microscopic inspections of fragments did not show any variation suggesting these results could not be considered as representative of the overall trend for each of these families. This

emphasized the need of a strict control by microscopy, as performed in this study, when assessing impact of protocols on microplastics integrity.

A single family of plastic, CA, was substantially degraded by each of the three protocols (**Fig. 2**). The mass reduction was close to 50% with protocol 1b (**Fig. 2a**), and was even more pronounced with protocol 5 (**Fig. 2b**) and 6 (**Fig. 2c**). For the latter, the degradation of the plastic was almost total with a drop in weight to below the limit of quantification by the analytical balance.

Protocol 5 led to the degradation of two additional plastics: PC and PET (**Fig. 2b**). The case of PC is especially obvious with a complete dissolution of the plastic during the post-protocol flushing. The decrease recorded for PET was less drastic but still large, around 50%.

Table 1 : Summary of passed/unpassed analyses by plastics in experiment 2.

Protocols	Analyses	CA	ePS	HDPE	LDPE	PA-12	PA-6	PC	PET	PMMA	PP	PS	PTFE	PUR	PSXL	uPVC
1b 10% KOH (*60°C, 24 h*)	Weighing	✗	NA	✓*	✓	✓	✓	✓*	✓	✓	✓*	✓	✓	✓	✓	✓
	Visual	Sh, Si	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Sh	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Pyr-GC/MS	✗	✓#	✓#	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓
	Raman	✗	✓#	✓#	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓
5 10 M NaOH (*60°C, 24 h*)	Weighing	✗	NA	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Visual	Sh, Si	✓	✓	✓	✓	✓	Sh, Si	Sh, Si	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Pyr-GC/MS	✗	✓#	✓#	✓#	✓	✓	NA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓
	Raman	✓	✓#	✓#	✓#	✓	✓	NA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓
6 0.27 M $K_2S_2O_8$/0.24 M NaOH (*65 °C, 24 h*)	Weighing	✗	NA	✓	✓	✓	✓*	✓	✓	✓*	✓	✓	✓*	✓	✓	✓
	Visual	Sh, Si	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Pyr-GC/MS	✓	✓#	✓#	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓#	✓
	Raman	✓	✓#	✓#	✓#	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓#	✓

(CA: cellulose acetate; ePS: expanded polystyrene; HDPE: high density polyethylene; LDPE: low density polyethylene; PA: polyamide; PA-12: polylauryllactam; PA-6: polycaprolactam; PC: polycarbonate; PE: polyethylene; PET: polyethylene terephthalate; PMMA: poly(methyl-methacrylate); PP: polypropylene; PS: polystyrene; PTFE: polytetrafluoroethylene; PUR: polyurethane; PSXL: crosslinked polystyrene; uPVC: unplasticized polyvinyl chloride).
✓: weighing, visual (absence of noticeable change) and identification analysis passed.
✗: degraded polymers or identification problem.
Sh: change in the shape.
Si: change in the size.
"*": no change on weighing analysis for 2 out of 3 analysis.
"#": only native molecule identified (not the type of polymerization).
NA: not analysed because of technical issues.

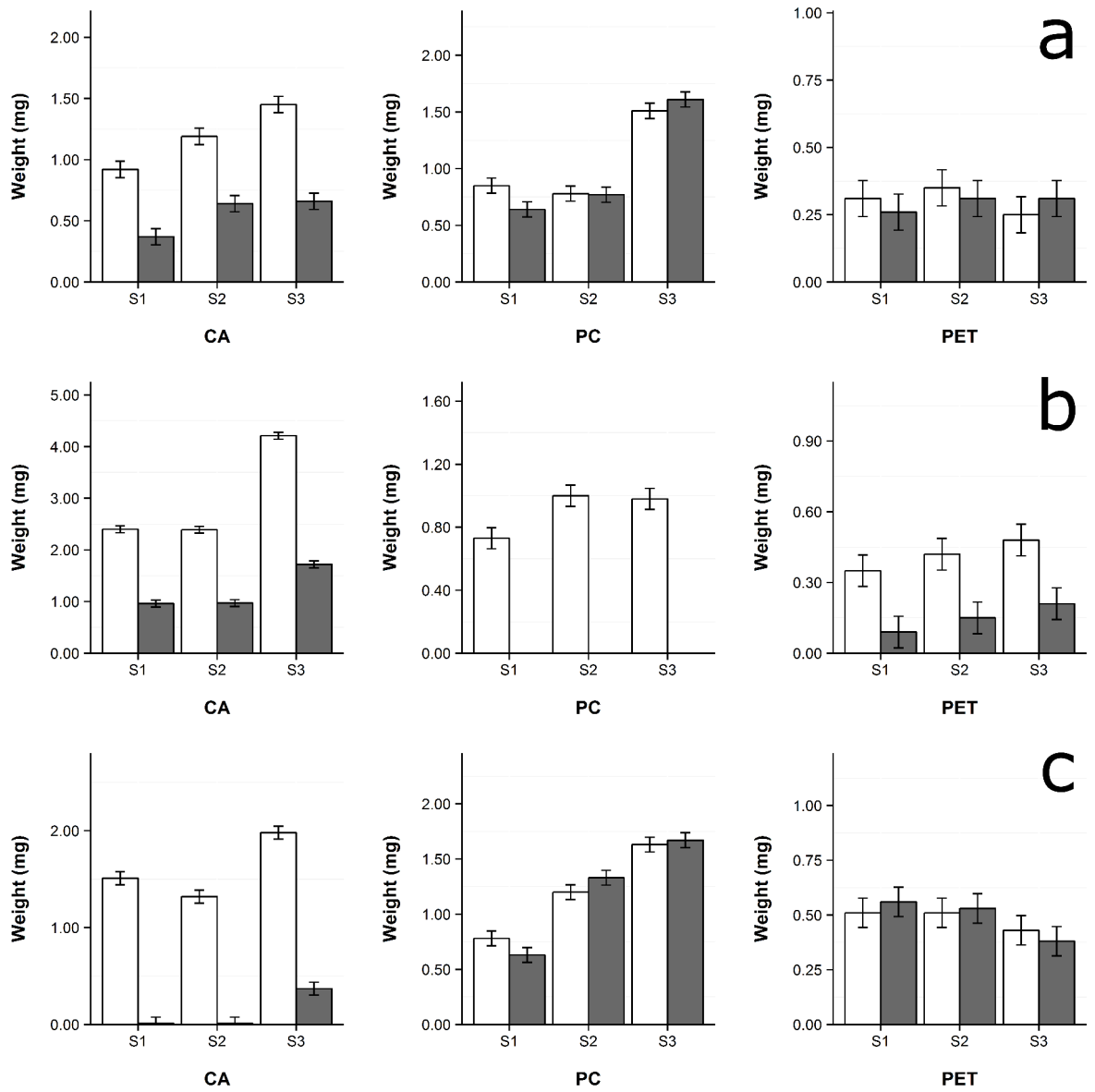


Fig. 2. Bar chart representing evolution of weight (mg) for cellulose acetate (CA), polycarbonate (PC) and polyethylene terephthalate (PET) before and after application of protocol 1b, 10% KOH, 24 h, 60 C (a), protocol 5, 10 M NaOH 60 C, 24 h (b) and protocol 6 $K_2S_2O_8$/NaOH 65 C, 24 h (c). White and dark grey bars represent the mean of 5 repeated weight measures of three plastic samples (S1, S2 & S3) respectively before and after application of protocols. Error bars on charts represent the expanded weighing uncertainty of the results U_{eb} (see 2.4).

3.2.2. Microscopic inspection

All protocols led to a marked modification of CA fragment sizes and shapes (**Fig. 3**). Decrease in size was particularly important and comprised between 64 and 67% for protocol 5 and between 69 and 95% for protocol 6. A noticeable opacification of CA was observed with protocol 1 and apparitions of streaks were observed with protocols 5 and 6 (**Fig. 3**).

The weight changes described for PET and PC after application of protocol 5 were confirmed by visual inspection (**Fig. 3**), where a marked decrease of fragment size (53-60%) was observed together with the apparition of streaks on PET, and a complete dissolution of PC during the post-protocol flushing (**Fig. 3**). Before this decomposition, the colour of PC was yellow/brown.

No substantial modification of plastic shapes and sizes was recorded with protocol 1b, 5 and 6 for all the other plastic families, corresponding respectively to 14, 12 and 14 types of the 15 tested polymers.

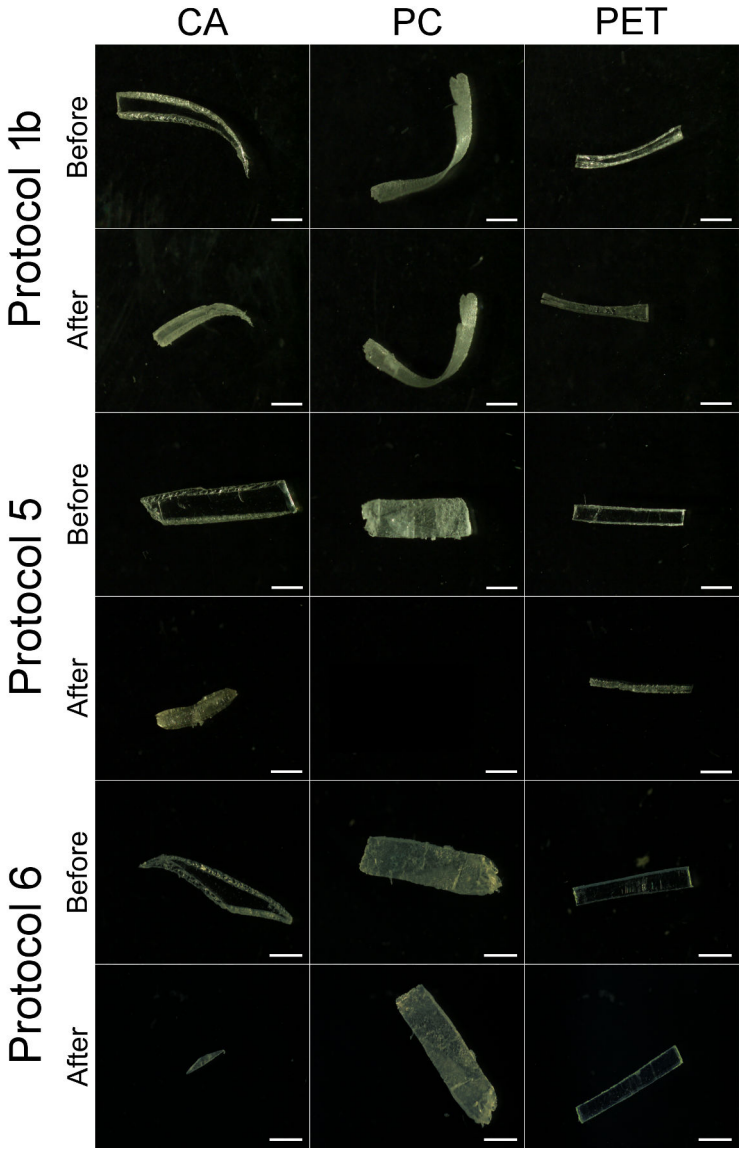


Fig. 3. Pictures of the three types of polymers; cellulose acetate (CA), polycarbonate (PC), polyethylene terephthalate (PET) mostly affected by protocols 1b (10% KOH, 24 h, 60 C), 5 (10 M NaOH 60 C, 24 h) and 6 (K2S2O8/NaOH 65 C, 24 h). For each protocol the picture of a single sample is presented before and after application of the protocol. White bars correspond to 1 mm.

3.2.3. Plastic identification

For all protocols a large majority of plastic were correctly identified by Pyr-GC/MS after application of digestion procedures with pyrogram similarities higher than 80%. This is the case for 14 families with protocol 1b, 13 with protocol 5, and 14 families with protocol 6 (**Table 1**). CA identification was problematic after application of protocols 1b and 5. Inaccurate identification and similarity to the pyrogram for "wood powder" were probably due to the digestion of CA. Indeed, wood powder is rich in cellulose that is also a major compound of CA. However, despite being clearly degraded by protocol 6, CA was well identified by Pyr-GC/MS suggesting that the mass decrease had no incidence on the molecule structure. Similarly, despite a clear degradation of PET by protocol 5, identification by Pyr-GC/MS was not affected. Finally, PC and PUR respectively treated with protocol 5 and 6 were not accurately identified. These results could be explained respectively by the fact that PC was completely dissolved by 10M NaOH, and by an adverse impact of peroxodisulfate on PUR identification.

Results of the Raman micro-spectroscopy analysis showed modifications of spectra intensities for all treatments compared with untreated reference materials (**Fig. 4**). These variations of intensity are mainly due to the location of the impact point of the laser on the surface of the analysed polymer despite a focus adjustment before each acquisition. The heterogeneity of the particle in terms of morphology, roughness or orientation and the move of particles before and after chemical treatments conduct to intensity fluctuations (Lenz *et al.,* 2015). It is however not excluded that these modifications of intensity could also be due to polymer molecular alteration after the chemical treatments (Collard *et al.,* 2015). But, in this case, band shifts would also have been expected. On contrary, chemical treatments did not affect polymer successful identification (**Table 1**), except for CA where the spectral fingerprints changed after treatment by NaOH and KOH, suggesting a modification of the molecular structure. Moreover, the spectrum quality of CA was impacted by a strong fluorescence with the KOH treatment, affecting its identification. No effect was observed on the spectra of any polymer families after digestion with peroxodisulfate.

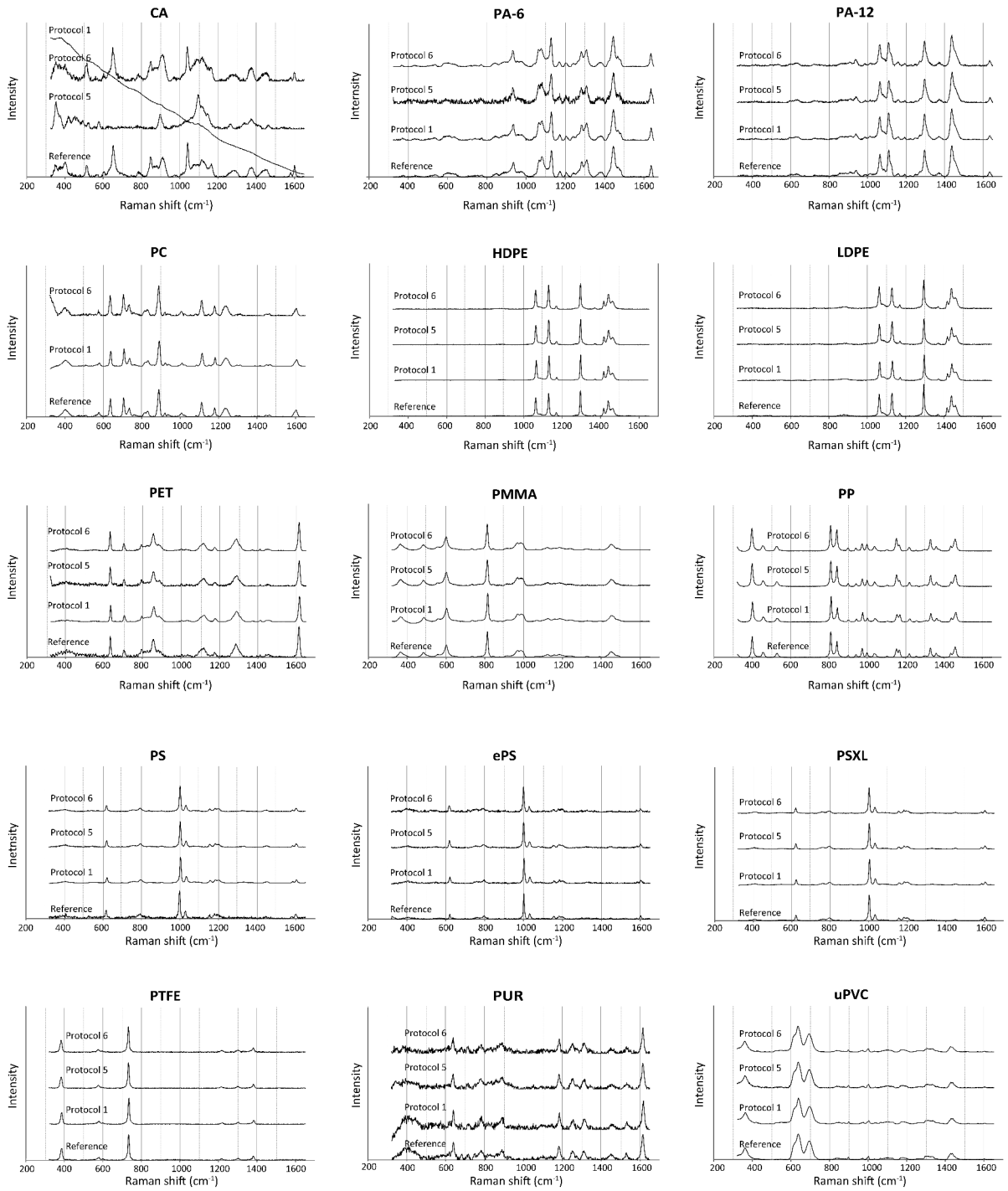


Fig. 4. Raman spectra of the 15 polymers prior and after treatment by protocol 1b (10% KOH, 24 h, 60 C), 5 (10 M NaOH 60 C, 24 h) and 6 ($K_2S_2O_8$/NaOH 65 C, 24 h). All spectra were normed excepted for CA spectrum treated with protocol 5, for which a simple decrease in intensity was applied. A normed spectrum is obtained by dividing peak areas by that of the major peak. (CA: cellulose acetate; ePS: expanded polystyrene; HDPE: high density polyethylene; LDPE: low density polyethylene; PA-12: polylauryllactam; PA-6: poly- caprolactam; PC: polycarbonate; PET: polyethylene terephthalate; PMMA: poly(methyl-methacrylate); PP: polypropylene; PS: polystyrene; PTFE: polytetrafluoroethylene; PUR: polyurethane; PSXL: crosslinked polystyrene; uPVC: unplasticized polyvinyl chloride).

Protocol 1b (10% KOH, 24h, 60°C) appeared to be the most promising protocol in our experiments in terms of absence of substantial degradation of the plastic polymers tested here. It is noteworthy that the impacts of this protocol on the 15 plastic polymer families were further assessed under agitation (300 rpm), to match the optimal conditions for biological tissue digestion (see below), and similar results were obtained, *i.e.* no detrimental effect on plastics (except for CA). While resistance of plastic particles subjected to KOH 10% was mentioned as "unpublished data" in Foekema *et al.* (2013), no detailed information was available in the literature to confirm the absence of detrimental effects on a wide range of plastic polymers and on their identification. Only CA was degraded by protocol 1b, yet in a lesser extent than by protocol 5 and 6, without this being detrimental. Indeed, if CA is the main macroplastic found on coastlines (Andrady, 2015), it is a polymer derived from cellulose, a natural polymer. This property confers a good potential for environmental degradation (Puls *et al.,* 2011) which would explain the fact that it is not recovered in marine organisms or environmental studies. The use of cellulose acetate filter should be proscribed with this method, to avoid contamination as already reported with other methods (Collard *et al.,* 2015).

Protocol 5 (10M NaOH 60°C, 24h) appears to be less promising than protocol 1b, since three plastics were degraded by the use of 10M NaOH. Contrary to previous observations (Cole *et al.,* 2014) neither degradation of nylon (PA-6 and PA-12), even when the protocol was tested directly on nylon fibres (Supplemental Fig. 4), nor uPVC yellowing was reported in the present study. Yet worryingly, protocol 5 degraded PET, which is one of the main components of plastic beverage bottles often recovered in the marine environment (Andrady, 2015), and which ranks among the "big six", with a production estimated at more than 3 million tons in 2014 (PlasticsEurope, 2015). A decrease in peak intensity in Raman microscopy was also observed, leading to poor identification compared with protocol 1b. As a consequence, protocol 5 was dismissed due to the degradation of three types of polymers.

Protocol 6 ($K_2S_2O_8$/ NaOH 65 °C, 24h) seems less promising than protocol 1b, due to CA intense degradation, along with some technical concerns related to the difficulty to prevent crystallisation of the peroxodisulfate in solution, and its relative cost. However, in order to evaluate its efficiency in successfully digesting the flesh of seafood, this protocol was retained for experiment 3.

3.3. Experiment 3: application of selected digestion protocols on seafood products

Protocol 1b using KOH led to a good digestion of mussel tissues, *i.e.* no remaining particles were visible in the digestate, which consequently allowed a good filtration on the GF/A 1.6 µm fibreglass filters (**Table 2**; Supplemental Fig. 5). A close observation using a binocular microscope revealed a negligible amount of debris, allowing good observation and detection of microplastics (Supplemental

Fig. 5). Conversely, following protocol 6, rough fragments were still observed to be present; mussel hepatopancreas remained completely undamaged (**Table 2**; Supplemental Fig. 5). These observations on filters were confirmed by evaluations of digestion efficiencies (**Fig. 5**). Efficiency was higher for protocol 1b with *%De* ranging from 99.6 – 99.8 % compared to *%De* with protocol 6 ranging between 98.2 and 99.7 %. Consequently, filtration of the digestate subjected to protocol 6 on GF/A 1.6 µm glass fibre filters was difficult and led to a rapid clogging of the filters that inevitably ended up heavily loaded. The presence of rough organic or inorganic debris, tissues and even organs (hepatopancreas) recovered after digestion prevents the accurate detection of plastic debris in bivalves. As a consequence, protocol 6 was considered unsuitable for microplastic extraction from biological matrices, and was thus excluded from further analyses with crustacean and fish. It should also be noted that further experiments demonstrated that *%De* was not affected after reduction of both volume of digestion solution (100 mL) and stirring speed (200 rpm) when using the protocol 1b (Supplemental Fig. 6).

For crab tissues, fish fillets and whole alimentary tract, the only tested method was protocol 1b. It led to a very efficient digestion of crab tissues; and easy filtration and detailed observations of the filters for microplastic detection (**Table 2**; Supplemental Fig. 7). The presence of pieces of cartilage was not problematic as a careful rinse was performed. Fish filet were efficiently digested and the filtration on one to two GF/A 1.6 µm glass fibre filters was successful. However, the fish bones must be carefully removed prior to digestion to prevent their partial dissolution leading to a high quantity of bone fragments ending up on the filters (Supplemental Fig. 8). Several filters may be needed due to the higher mass of tissues digested and the presence of a thin layer of grease observed on the edges of the Petri dish that may lead to some difficulties in accurately detecting microplastics if they are located below this layer (Supplemental Fig. 8). Direct filtration of the whole alimentary tract digestate was impossible because of the presence of inorganic debris present in black bream alimentary tracts collected in the Bay of Brest (France) that remained intact after digestion (data not shown). These debris consisted mainly of mærl and sand, present in large quantities in the Bay of Brest (Potin *et al.,* 1990); therefore a slightly modified protocol using a sodium tungstate solution (1.5 g/cm^3) was tested. This allows the recovery of all plastic particles, including the densest of the "big six": PVC (1.38 g/cm^3) or PET (1.37 g/cm^3) (Andrady, 2015); without filtration of the high load of inorganic particles. It is noteworthy to mention that this density-based separation step should be suitable for sediment dwelling molluscs and crustaceans that may exhibit high coarse sediment contents in their digestive tracts. Due to this additional step, the filtration and the filter observation were much easier (Supplemental Fig. 8), allowing a good detection of microplastic-like particles.

Finally an integrated approach was performed using protocol 1b, the digestion of the different spiked samples of seafood tissues led to good recovery and no impact of protocol 1b was observed on the integrity of particles. Recovery percentages were of 100% for cod fillets, saithe whole alimentary

tracts and mussels. It should be mentioned that digestion process did not affect identification of the nylon particles spiked in fillets, whose pyrograms displayed 93% of similarity with the one of PA-6.

Table 2 : Quality of the digestion, filtration and filter observations after digestion of mussels, crabs and fish tissues following protocols 1b (KOH 10%, 24 h, 60 C) and 6 ($K_2S_2O_8$/NaOH 65 C, 24 h). (NA: not analysed).

Tissues	Steps	Protocol 1b	Protocol 6
Mussels	*Digestion*	**Good** No particle visible to the naked eye in the digestate.	**Bad** Presence of small organic/inorganic fragments. Hepatopancreas not diges-ted
	Filtration	**Good** Use of a single GF/A 1.6 µm filter.	**Poor** One to two filters used depending on the individuals. Rapid clogging.
	Filter	**Good** Negligible amount of debris. Filter lightly loaded.	**Bad** High quantity of debris leading to inability to accurately detect micro-plastics.
Crabs	*Digestion*	**Good** No particle visible to the naked eye in the digestate. Pieces of cartilage rinsed with distilled water.	**NA**
	Filtration	**Good** Use of a single GF/A 1.6 µm filter.	**NA**
	Filter	**Good** Negligible amount of debris. Filter lightly loaded.	**NA**
Fish (fillet)	*Digestion*	**Good** No particle visible to the naked eye in the digestate. Pieces of fish bones rinsed with distilled water.	**NA**
	Filtration	**Good** Use of a single GF/A 1.6 µm filter.	**NA**
	Filter	**Good** Negligible amount of debris. Filter lightly loaded	**NA**
Fish (whole alimentary tract)	*Digestion*	**Poor** Particle visible to the naked eye in the digestate. Dense digestate (mærl, sand, etc.).	**NA**
	Filtration	**Bad** Impossible to filter due to clogging.	**NA**
	Filtration (after separation step)	**Good** The use to sodium tungstate facilitated the filtration step. Use of a single GF/A 1.6 µm filter.	**NA**
	Filter	**Good** Absence or negligible amount of debris. Filter lightly loaded.	**NA**

4. Conclusion

In conclusion, the protocol using KOH 10% solution with incubation at 60 °C for 24 h overcame current methodological barriers and was proposed as a good compromise for extraction and characterization of microplastics from seafood tissues. This protocol appears to be the best compromise and should be implemented for further studies to assure the relevance and comparison of environmental studies, notably following OSPAR and Marine Strategy Framework Directive recommendation, as well as for seafood product quality. Mollusc, crustacean, and fish were tested, suggesting the broad usefulness of this protocol on aquatic species.

Based on the present work, the use of nitric acid is not recommended for the study of microplastics because of its degrading action on polyamide and its tendency to yellow plastics. An approach using enzymatic digestion was discarded because of the difficulty in its implementation and digestion efficacy issues. The use of oxidizing solution was promising, with almost no deleterious consequence on plastics, but application to seafood products led to incomplete digestion of mussel tissues. The

NaOH solution resulted in adverse destructive effects on integrity of three plastics (CA, PC and PET), thus its use is not recommended here.

5. Acknowledgments

Authors warmly thank Mélanie Gay and Régine Quenu for their valued help with metrology issues, Marie-Ange Huchin and Mr. Bourdin for their kind technical assistance. This work was funded by ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) through a "C*onvention de Recherche et Développement*". Laura Frère was supported by a Université de Bretagne Occidentale and a Brest Métropole PhD grant. Ludovic Hermabessiere is thankful to Région Nord-Pas-de-Calais and ANSES for the financial support of his PhD. Authors also thank Dr. E. Harney for his helpful revision of the English and his comments on the manuscript.

Supplementary information

Supplemental Table 1: Plastics and their common brand names.

Polymers	Abbreviations	Common brand names
Cellulose acetate	CA	Clarifoil, Dexel, Tenite Acetate
High density polyethylene	HDPE	Hostalen HD, Lacqtene HD, Lupolen, Rigidex
Low density polyethylene	LDPE	Alkathene, Carlona, Lacqtene, Lupolen, Stamylan LD
Polylauryllactam	PA-12	Rilsan A, Vestamid
Polycaprolactam	PA-6	Akulon K and F, Capron, Maranyl B, Nylacast, Orgamid, Ultramid B
Polycarbonate	PC	Lexan, Makrofol, Makrolon
Polyethylene terephthalate	PET	Arnite, Dacron, Hostaphan, Impet, Melinar, Melinex, Mylar, Rynite, Terylene, Trevira
Poly(methyl-methacrylate)	PMMA	Diakon, Lucite, Oroglas, Perspex, Plexiglas
Polypropylene	PP	Appryl, Hostalen PP, Lacqtene, Novolen, Propathene
Polystyrene	PS	-
Crosslinked polystyrene	PSXL	Q.200.5, Rexolite
Polytetrafluoroethylene	PTFE	Fluon, Hostaflon TF
Polyurethane	PUR	-
unplasticized Polyvinyl chloride	uPVC	Corvic, Evipol, Geon, Hostalit, Lacovyl, Lucorex

Supplemental Table 2: Plastic weights before and after application of the protocols of the preliminary study.

		HDPE		PP		LDPE		PS		PA-12	
		Before	**After**	**Before**	**After**	**Before**	**After**	**Before**	**After**	**Before**	**After**
P1	**S1**	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,0	25,6 ± 0,1	25,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,0	15,5 ± 0,1	15,5 ± 0,0	15,5 ± 0,0	15,5 ± 0,0
	S2	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	22,1 ± 0,0	22,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1	20,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	15,8 ± 0,1	15,8 ± 0,1
	S3	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1	21,9 ± 0,1	21,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	14,3 ± 0,1	14,3 ± 0,1	16,1 ± 0,1	16,2 ± 0,1
P2	**S1**	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	19,1 ± 0,0	19,2 ± 0,1	2,5 ± 0,0	2,6 ± 0,1	16,3 ± 0,0	16,3 ± 0,1	16,7 ± 0,1	16,7 ± 0,1
	S2	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	19,4 ± 0,1	19,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1	3,0 ± 0,0	3,1 ± 0,1	16,2 ± 0,1	16,2 ± 0,1
	S3	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,0	23,8 ± 0,1	23,9 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	16,2 ± 0,0	16,2 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1
P3	**S1**	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	21,0 ± 0,0	21,0 ± 0,1	4,9 ± 0,0	4,9 ± 0,1	14,5 ± 0,0	14,5 ± 0,1	9,8 ± 0,1	9,5 ± 0,1 *
	S2	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,0	19,8 ± 0,1	19,7 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	16,6 ± 0,1	16,7 ± 0,1	13,1 ± 0,1	12,2 ± 0,1 *
	S3	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,1	20,9 ± 0,1	20,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	17,4 ± 0,1	17,5 ± 0,1	15,9 ± 0	15,5 ± 0,1 *
P4	**S1**	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	24,6 ± 0,1	24,6 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	18,3 ± 0,1	18,3 ± 0,1	19 ± 0,1	11,8 ± 0,1 *
	S2	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	22,3 ± 0,1	22,3 ± 0,1	4,3 ± 0,0	4,3 ± 0,0	16,1 ± 0,1	16,2 ± 0	15,2 ± 0,1	6 ± 0,1 *
	S3	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	22,7 ± 0,1	22,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	16,9 ± 0,1	17 ± 0	9,7 ± 0	4,3 ± 0,1 *
P5	**S1**	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	2,3 ± 0	2,3 ± 0,1	14,1 ± 0,2	14,1 ± 0,1	11,3 ± 0,1	11,2 ± 0,1
	S2	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,7 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	18,5 ± 0,1	18,5 ± 0,1	15,7 ± 0,1	15,7 ± 0,1
	S3	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	11,7 ± 0,1	11,6 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,1
P6	**S1**	22,0 ± 0,1	22,1 ± 0,1	25,0 ± 0,0	25,1 ± 0,1	25,0 ± 0,1	24,9 ± 0,1	16,3 ± 0,0	16,2 ± 0,1	15,9 ± 0	15,7 ± 0,1
	S2	19,4 ± 0,1	19,3 ± 0,1	18,3 ± 0,1	18,2 ± 0,1	22,1 ± 0,0	22,0 ± 0,1	17,0 ± 0,1	17 ± 0,1	19,5 ± 0,1	19,5 ± 0
	S3	16,5 ± 0,1	16,5 ± 0,0	21,9 ± 0,1	21,9 ± 0,1	24,5 ± 0,1	24,5 ± 0,0	15,3 ± 0,1	15,1 ± 0,1	14,8 ± 0	14,8 ± 0,1

(HDPE: high density polyethylene; LDPE: low density polyethylene; PA-12: polylauryllactam ; PP: polypropylene; PS: polystyrene)

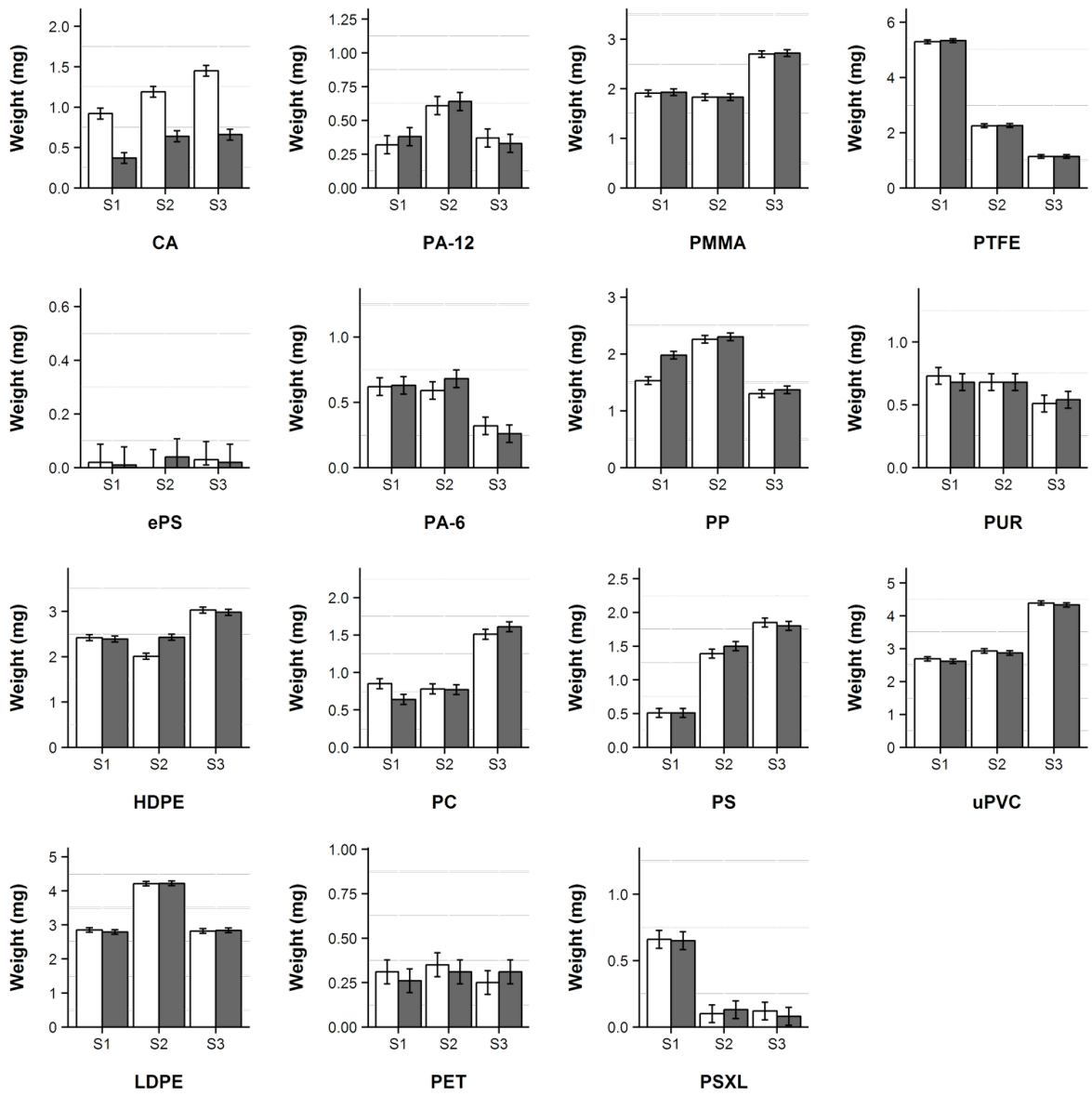
P1: Protocol 1 (10% KOH, 3 weeks, Room temperature); P2: Protocol 2 (0.5%Pepsin, 2h, 37 °C); P3: Protocol 3 (65% HNO_3 at room temperature overnight, then 60 °C for 2 h); P4: Protocol 4 (4:1 (v/v) mix of 65% HNO_3 and 65% $HClO_4$ at room temperature overnight, then boiled for 10 min); P5: Protocol 5 (10M NaOH, 60°C, 24h); P6: Protocol 6 ($K_2S_2O_8$/ NaOH, 65 °C, 24h)

S1, S2, S3 correspond to the three sample of the triplicate analysis

Weighing (mg) are expressed as *mean ± s.d*

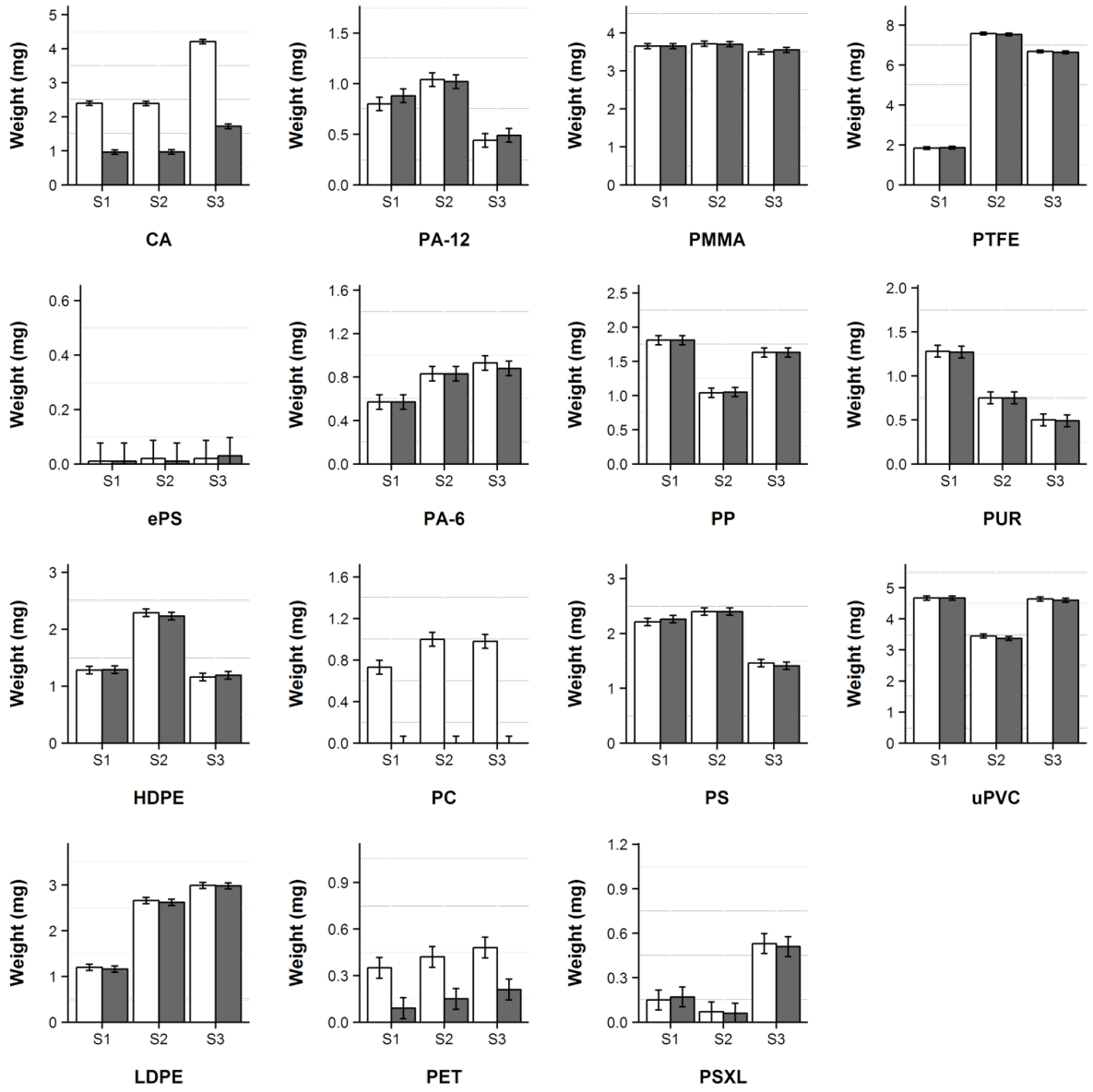
'*' Samples that melted during the application of digestion protocol

Supplemental Figure 1: Plastic weights before and after application of protocol 1b.



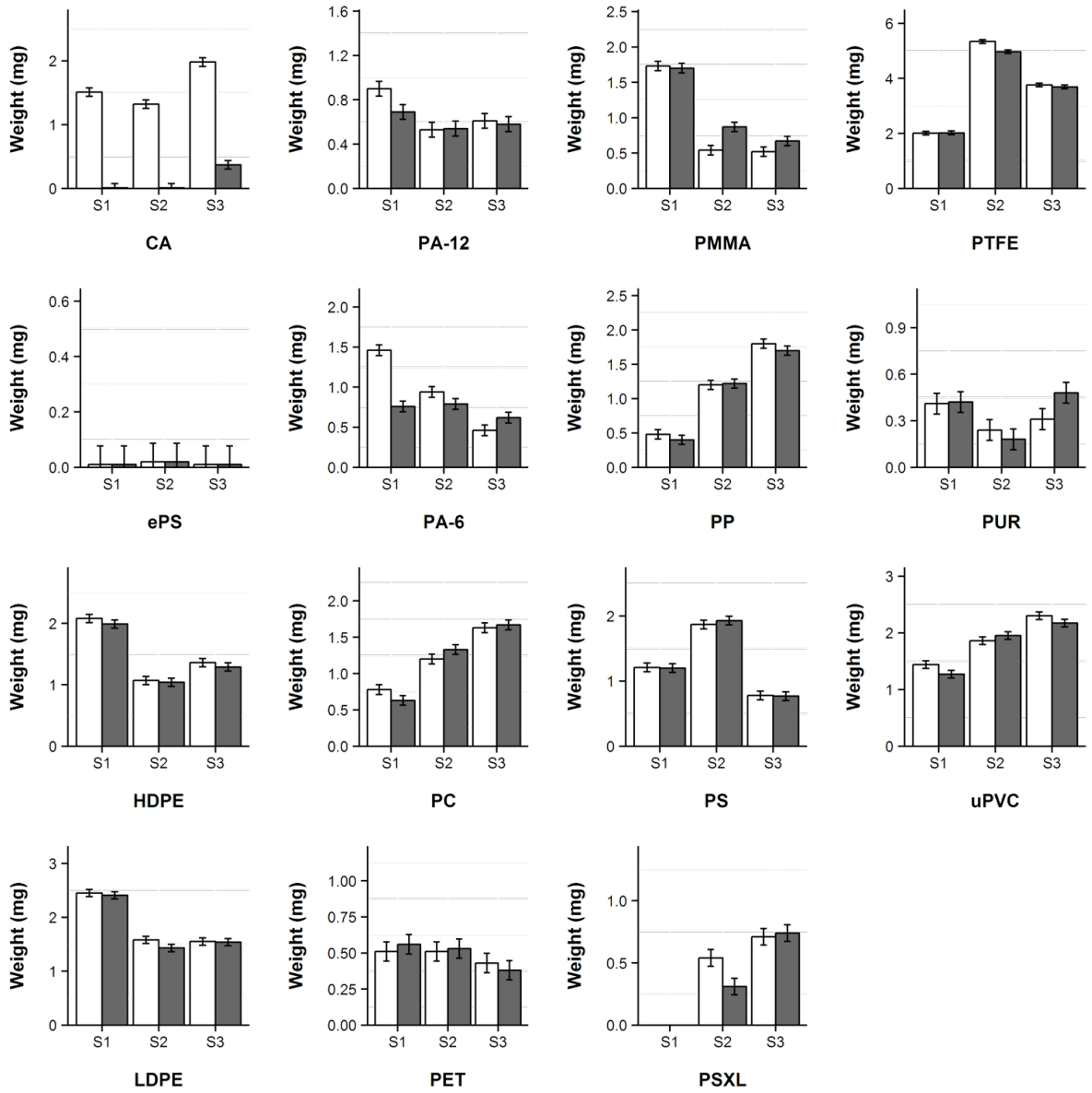
Bar chart representing change in weight (mg) for cellulose acetate (CA); expanded polystyrene (ePS); high density polyethylene (HDPE); low density polyethylene (LDPE); polylauryllactam (PA-12); polycaprolactam (PA-6); polycarbonate (PC); polyethylene terephthalate (PET); poly(methyl-methacrylate) (PMMA); polypropylene (PP); polystyrene (PS); polytetrafluoroethylene (PTFE); polyurethane (PUR); cross-linked polystyrene (PSXL); unplasticized polyvinyl chloride (uPVC); before and after application of protocol 1b, 10% KOH, 24h, 60°C. White and dark grey bars represent the mean of 5 repeated weight measures of three plastic samples (S1, S2 & S3) respectively before and after application of protocols. Error bars on charts represent the expanded weighing uncertainty of the results *Ueb* (see 2.4).

Supplemental Figure 2: Plastic weights before and after application of protocol 5.



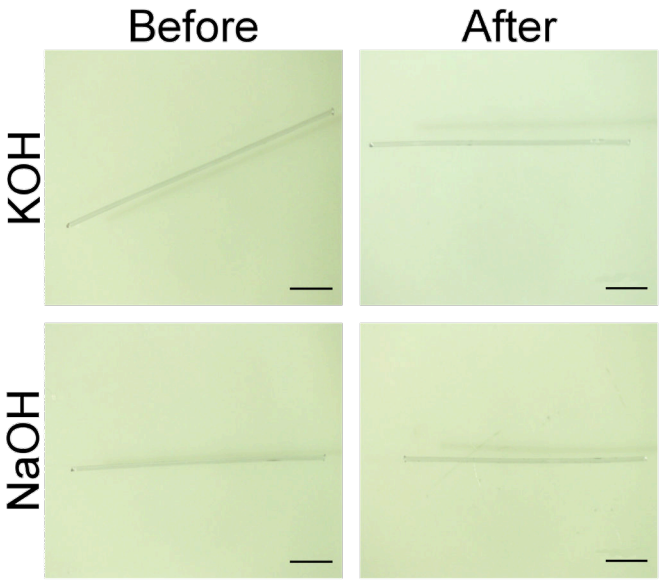
Bar chart representing change in weight (mg) for cellulose acetate (CA); expanded polystyrene (ePS); high density polyethylene (HDPE); low density polyethylene (LDPE); polylauryllactam (PA-12); polycaprolactam (PA-6); polycarbonate (PC); polyethylene terephthalate (PET); poly(methyl-methacrylate) (PMMA); polypropylene (PP); polystyrene (PS); polytetrafluoroethylene (PTFE); polyurethane (PUR); cross-linked polystyrene (PSXL); unplasticized polyvinyl chloride (uPVC); before and after application of protocol 5, 10M NaOH 60°C, 24h. White and dark grey bars represent the mean of 5 repeated weight measures of three plastic samples (S1, S2 & S3) respectively before and after application of protocols. Error bars on charts represent the expanded weighing uncertainty of the results Ueb (see 2.4).

Supplemental Figure 3: Plastic weights before and after application of protocol 6.



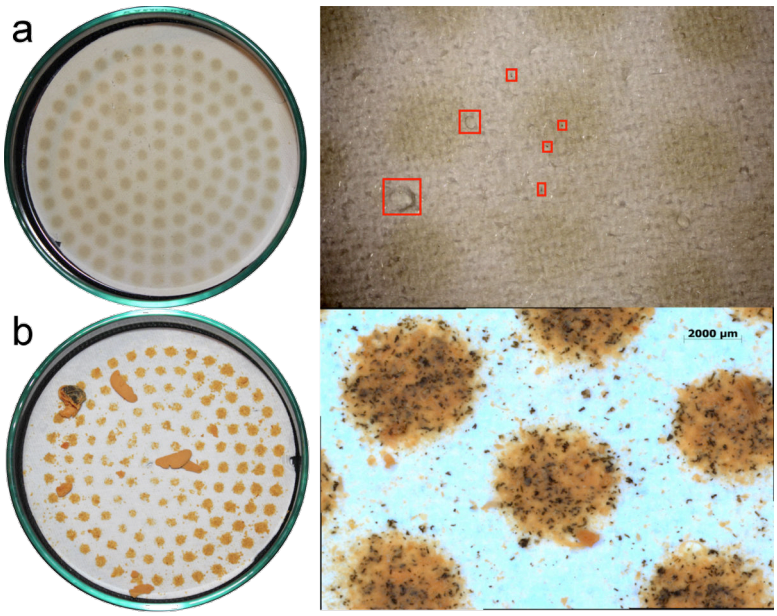
Bar chart representing change in weight (mg) for cellulose acetate (CA); expanded polystyrene (ePS); high density polyethylene (HDPE); low density polyethylene (LDPE); polylauryllactam (PA-12); polycaprolactam (PA-6); polycarbonate (PC); polyethylene terephthalate (PET); poly(methyl-methacrylate) (PMMA); polypropylene (PP); polystyrene (PS); polytetrafluoroethylene (PTFE); polyurethane (PUR); cross-linked polystyrene (PSXL); unplasticized polyvinyl chloride (uPVC); before and after application of protocol 6, $K_2S_2O_8$/ NaOH 65 °C, 24h. One sample of PSXL was lost during the second weighing. White and dark grey bars represent the mean of 5 repeated weight measures of three plastic samples (S1, S2 & S3) respectively before and after application of protocols. Error bars on charts represent the expanded weighing uncertainty of the results *Ueb* (see 2.4).

Supplemental Figure 4: Test of Protocols 5 and 6 on PA-6 fibres.



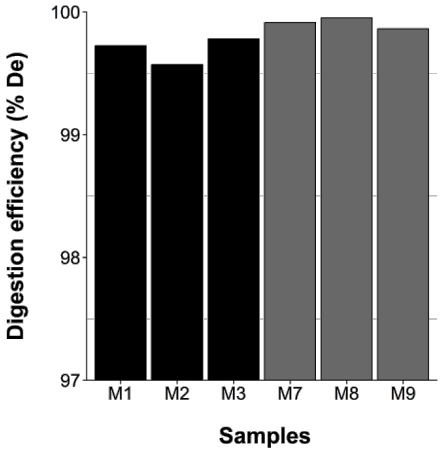
Visual inspection of nylon fibres (PA-6) before and after application of protocol 5 (10M NaOH 60°C, 24h) and 6 ($K_2S_2O_8$/ NaOH 65 °C, 24h). No significant change was observed and identification by Pyr-GC/MS led to good identification with respective similarities of 96 and 99%.

Supplemental Figure 5: Filters corresponding to digestion of mussel tissues with protocols 1b and 6.



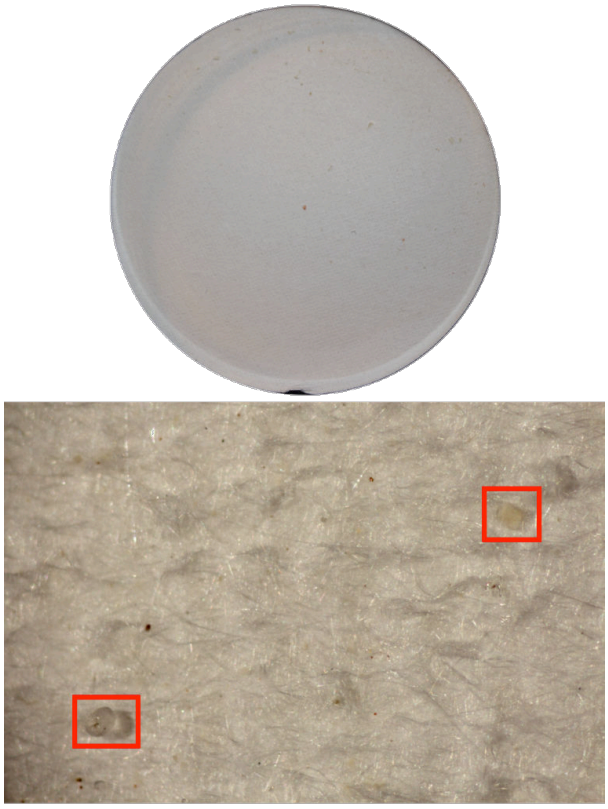
Filters corresponding to digestion of mussel tissues with protocols 1b (10% KOH, 24h, 60 °C) (a) and 6 ($K_2S_2O_8$/ NaOH 65 °C, 24h) (b). Areas highlighted by red squares correspond to fragments suspected to be microplastics.

Supplemental Figure 6: Comparison of *%De* for mussels treated by protocol 1b with different conditions (200 mL at 300 rpm *vs*. 100 mL at 200 rpm).



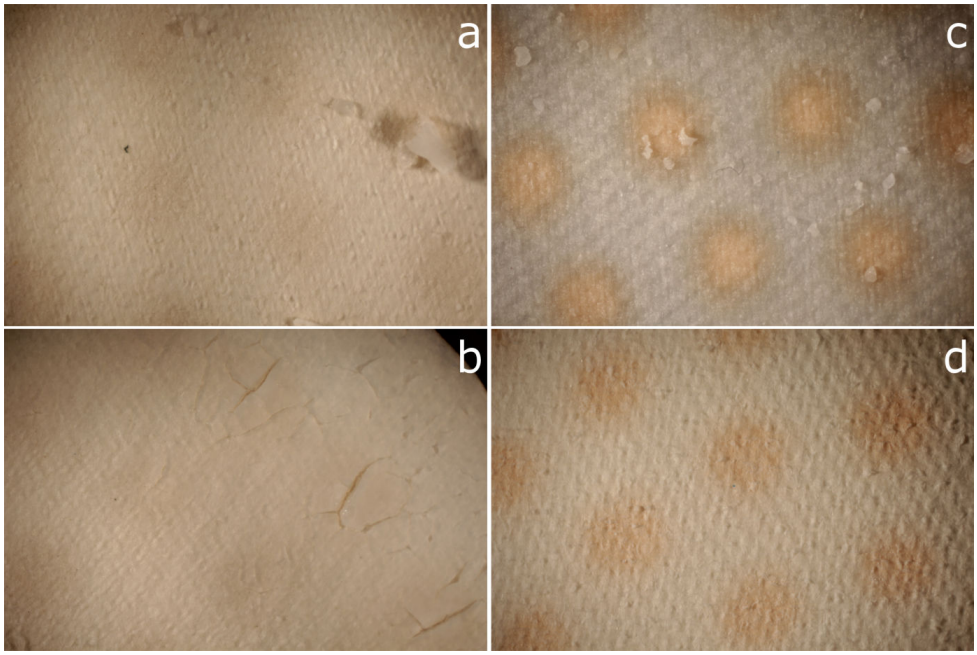
Bar chart representing individual digestion efficiencies (*% De*) on three mussels, M1 to M3 for protocol 1b (200 mL of 10% KOH, 300 rpm, 24h, 60°C) in black, and M7 to M9 for protocol 1b (100 mL of 10% KOH, 200 rpm, 24h, 60°C) in grey. The very low standard deviations (< 0.01%) do not appear on bar diagrams as they could not be distinctively traced.

Supplemental Figure 7: Filters corresponding to digestion of crab tissues with protocol 1b.



Filter corresponding to digestion of crab tissues with protocol 1b (10% KOH, 24h, 60 °C). Areas highlighted by red squares correspond to suspected microplastic fragments.

Supplemental Figure 8: Filters corresponding to digestion of fish tissues with protocol 1b.



Filters corresponding to digestion of fish tissues (fillets and whole alimentary tract) with protocol 1b (10% KOH, 24h, 60 °C). Concerning fillet (a & b), filters contain some fragments of bones partially digested (a). A fatty layer was noticed on the edge of filter (b). For whole alimentary tract (c & d), a few fragments from the stomach content, such as cartilage or starfish remainings, were reported (c). Generally, filters were clear, lightly loaded and easily observable (d).

- CHAPITRE IV -

Approche écosystémique de la contamination de la rade de Brest

Préambule **159**

A. Influence des facteurs environnementaux et anthropiques sur la distribution des microplastiques **161**

1. Introduction 165
2. Material and methods 166
   2.1. Study area: hydrological characteristics 166
   2.2. Sampling method 166
   2.3. Visual particle sorting and Raman spectroscopic analysis 168
   2.4. Background contamination 169
   2.5. Surface dispersal modelling 169
   2.6. Statistical analysis 171
3. Results 171
   3.1. Marine litter and airborne contamination 171
   3.2. Surface water contaminated by microplastics 171
   3.3. Sediment contamination by microplastics 173
   3.4. Hydrodynamic modelling of the Bay of Brest 175
4. Discussion 176
   4.1. Microplastics in the Bay of Brest: dominance of polyethylene fragments 177
   4.2. Spatial and temporal variability in the distribution of floating microplastics 178
   4.3. Sediments have a relatively low microplastic content 180
5. Conclusion 181
6. Acknowledgements 181

Supplementary information 182

B. Evaluation de la contamination de la macrofaune : résultats préliminaires **191**

Préambule

L'augmentation des populations côtières, ainsi que la non gestion d'une partie des déchets générés contribuent à accroître la contamination de l'environnement marin par les déchets plastiques et notamment les microplastiques (Eriksen *et al.,* 2014; Jambeck *et al.,* 2015). Les zones côtières, telle que la rade de Brest, sont directement influencées par les voies et flux d'introduction multiples de microplastiques dans leurs eaux, notamment via les rivières, le lessivage des sols, les activités domestiques et industrielles, les rejets des stations d'épuration et les rejets accidentels (Figure 2 de l'Avant-propos du manuscrit). Il est donc nécessaire d'établir et de suivre l'évolution de la contamination des zones côtières par les microplastiques.

Les travaux présentés dans ce chapitre s'intègrent dans le contexte de l'obtention du Bon Etat Ecologique de la DCSMM déterminée ici sur la base du descripteur 10 « Propriétés et quantités de déchets marins ne provoquant pas de dommages au milieu côtier et marin » qui concerne notamment les microplastiques dont la taille est inférieure à 5 mm (Arthur *et al.,* 2009; Galgani, 2012). Les seules données disponibles en France sur la contamination des eaux côtières par les microplastiques se concentrent en mer Méditerranée avec les travaux de Collignon *et al.* (2012, 2014) et Pedrotti *et al.* (2016), dont deux d'entre eux ont été réalisés via les expéditions menées par l'ONG Expéditions MED. La densité de microplastiques en Méditerranée est estimée entre 10 000 à 892 000 particules.km^{-2}. Enfin, une évaluation initiale de la contamination des plages du littoral français (Manche-Mer du Nord, mer Celtique, Golfe de Gascogne et mer Méditerranée) par les GPI a été réalisée par l'ONG SOS mal de Seine dans la cadre du BEE de la DCSMM, et les résultats montrent des contaminations ponctuelles parfois supérieures à 100 g GPI.l^{-1} de sédiment.

Les travaux présentés dans ce chapitre consistent à fournir une :

Evaluation de la contamination par les microplastiques des matrices environnementales abiotiques (eau de surface et sédiment) et biotiques (macrofaune marine) de la rade de Brest.

Les résultats acquis ont donné lieu à l'écriture d'un article scientifique publié dans la revue *Environmental Pollution* et d'un sous-chapitre du manuscrit de thèse :

Environmental Pollution 225 (2017) 211–222

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

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)☆

L. Frère [a], I. Paul-Pont [a, *], E. Rinnert [b], S. Petton [c], J. Jaffré [a], I. Bihannic [a], P. Soudant [a], C. Lambert [a, 1], A. Huvet [c, 1]

[a] LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, IUEM, rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France
[b] Ifremer, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures, Centre de Bretagne, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France
[c] Ifremer, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Centre de Bretagne, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, 29280 Plouzané, France

Pour l'évaluation du niveau de contamination du biote, un sous-chapitre présente les résultats préliminaires de la contamination par les microplastiques de la macrofaune de la rade de Brest.

A. Influence des facteurs environnementaux et anthropiques sur la distribution des microplastiques

Dans cet article, une évaluation de la contamination des matrices abiotiques (eau de surface et sédiment) de la rade de Brest a été réalisée. L'extraction des microparticules dans les échantillons de sédiment a été réalisée par J. Jaffré lors de son stage dans le cadre d'un Diplôme Universitaire (UBO), les analyses par spectroscopie Raman ont été réalisées au LDCM sous la responsabilité scientifique et technique d'E. Rinnert, et les travaux de modélisation au LEMAR par S. Petton (Ifremer).

Les objectifs de ce papier sont : (1) évaluer le niveau de contamination de la surface de l'eau et du sédiment de la rade de Brest, (2) identifier le rôle des facteurs anthropiques et hydrodynamiques dans la distribution spatiale des microplastiques et (3) analyser la variabilité temporelle des quantités de microplastiques. Pour répondre à ces questions, les matrices abiotiques de neuf stations ont été échantillonnées au cours de deux campagnes de prélèvement : la première entre février et avril 2014, et la deuxième entre septembre et octobre 2014. Les critères de sélection des neuf stations sont les suivants :

- **zones à activités anthropiques intenses :** les stations **A1 à A3** sont localisées à l'intérieur ou à proximité de la zone portuaire de Brest où les activités anthropiques sont intenses (transport maritime, plaisance, activités militaires et industrielles, présences de stations d'épuration) ;
- **zones à influence estuarienne :** les stations **E1 à E3** sont situées à l'embouchure des principaux fleuves se jetant dans la rade de Brest : l'Elorn (station E1), la Mignonne (station E2) et l'Aulne (station E3) ;
- **zones de mélange des masses d'eau :** les trois dernières stations, **M1 à M3**, sont positionnées dans des zones de mélange des masses d'eau de la rade de Brest. La station M1, la plus proche de la zone portuaire de Brest, est située au niveau de la zone de convergence entre les eaux marines en provenance de la mer d'Iroise et les eaux de la rade. La station M2 est une zone de mélanges entre les eaux du centre de la rade et celles du sud de la rade provenant de la baie de Daoulas et de l'estuaire de l'Aulne. Enfin la station M3 correspond à une zone de mélange des eaux de la rade Sud (baie de Daoulas et estuaire de l'Aulne).

Dans chacune des matrices étudiées, les niveaux de contamination par les microplastiques ont été évalués selon les étapes suivantes (Figure 22) :

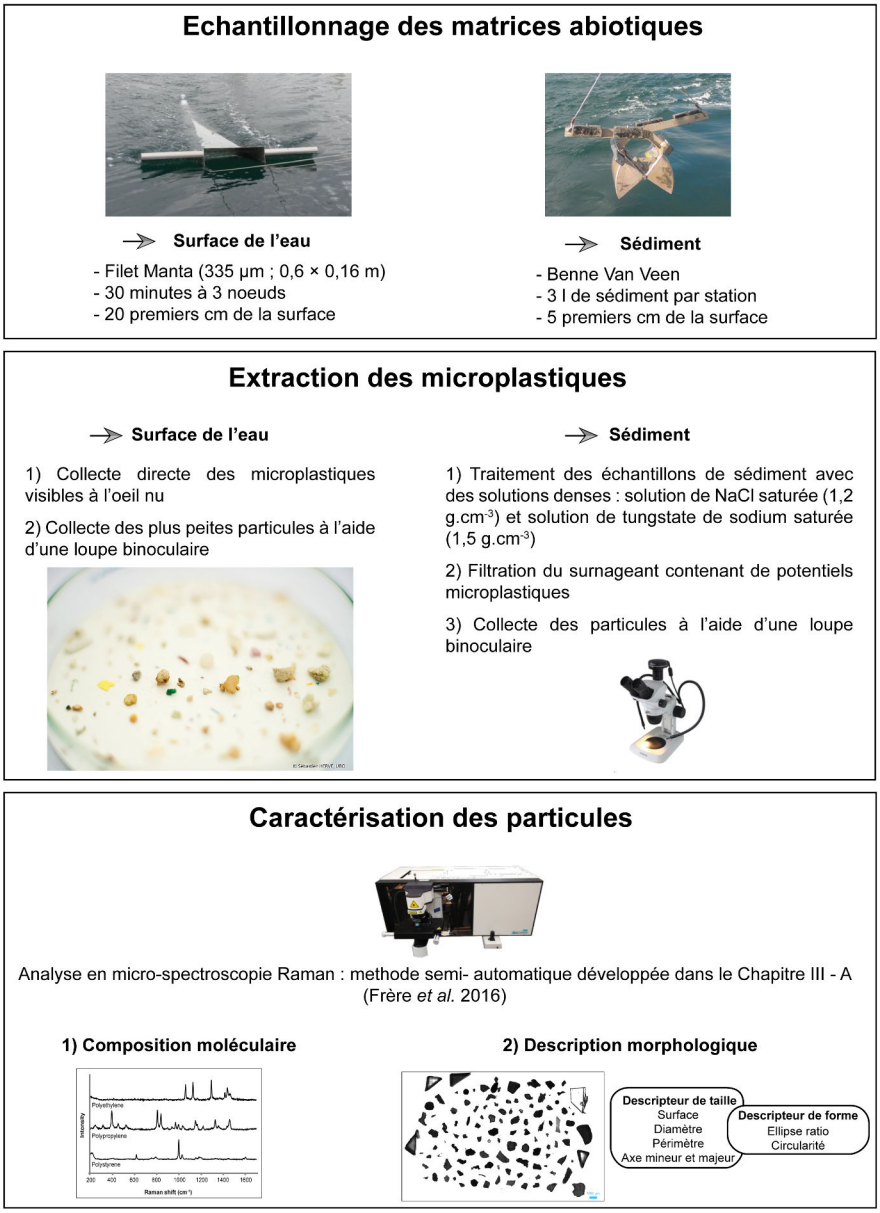


Figure 22 : Les différentes étapes d'analyse appliquées aux matrices environnementales abiotiques pour évaluer leur niveau de contamination par les microplastiques.

Cette étude a confirmé une contamination de l'eau de surface (0,24 ± 0,35 MP.m^{-3}) et du sédiment (0,97 ± 2,08 MP.kg^{-1} sediment sec) de la rade de Brest par les microplastiques, et notamment par le PE (53 - 67 %), le PP (16 - 30 %) et le PS (16 - 17 %). Les hypothèses à l'issu de ces résultats sont les suivantes : la distribution des microplastiques en rade de Brest semble fortement influencée par la proximité avec la zone portuaire et la ville de Brest où l'activité anthropique est intense, mais également par l'hydrodynamique fort généré par les courants de marée.

Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: the case study of the Bay of Brest (Brittany, France)

Laura Frère, Ika Paul-Pont, Emmanuel Rinnert, Sébastien Petton, Jonathan Jaffré, Isabelle Bihannic, Philippe Soudant, Christophe Lambert and Arnaud Huvet.

Environmental Pollution (2017)

Abstract:

The concentration and spatial distribution of microplastics in the Bay of Brest (Brittany, France) was investigated in two surveys. Surface water and sediment were sampled at nine locations in areas characterized by contrasting anthropic pressures, riverine influences or water mixing. Microplastics were categorized by their polymer type and size class. Microplastic contamination in surface water and sediment was dominated by polyethylene fragments (PE, 53 – 67 %) followed by polypropylene (PP, 16 – 30 %) and polystyrene (PS, 16 – 17 %) microparticles. The presence of buoyant microplastics (PE, PP and PS) in sediment suggests the existence of physical and/or biological processes leading to vertical transfer of lightweight microplastics in the bay. In sediment (upper 5 cm), the percentage of particles identified by Raman micro-spectroscopy was lower (41%) than in surface water (79%) and may explain the apparent low concentration observed in this matrix (0.97 ± 2.08 MP kg^{-1} dry sediment). Mean microplastic concentration was 0.24 ± 0.35 MP m^{-3} in surface water. We suggest that the observed spatial MP distribution is related to proximity to urbanized areas and to hydrodynamics in the bay. A particle dispersal model was used to study the influence of hydrodynamics on surface microplastic distribution. The outputs of the model showed the presence of a transitional convergence zone in the centre of the bay during flood tide, where floating debris coming from the northern and southern parts of the bay tends to accumulate before being expelled from the bay. Further modelling work and observations integrating (i) the complex vertical motion of microplastics, and (ii) their point sources is required to better understand the fate of microplastics in such a complex coastal ecosystem.

Keywords: Microplastic, coastal ecosystem, surface water, sediment, Raman spectroscopy, hydrodynamic, dispersal particle modelling

1. Introduction

Plastic pollution of the oceans represents an increasing concern for science and society. Global production of plastics has shown a steady increase since 1950, reaching 311 million tons in 2014 (PlasticsEurope, 2016). A recent study estimated that 99.5 million tons of plastic waste were generated in coastal regions in 2010, and 4.8 to 12.7 million tons entered the oceans (Jambeck *et al.,* 2015). Ironically, as a consequence of their benefits, specifically their durability and resistance to degradation, plastics accumulate in marine environments and are now the primary constituent of marine debris (Barnes *et al.,* 2009). Several trillion pieces of plastic are estimated to currently pollute the surface of the world's oceans, with microplastics (MP) representing 92 % (Eriksen *et al.,* 2014; Sebille *et al.,* 2015). These MP, defined as items <=5 mm diameter (Arthur *et al.,* 2009) are introduced into aquatic environments by many pathways. They can be divided into two categories: primary MP that directly enter the oceans as micro-sized particles (*e.g.* cosmetics, synthetic fibres, pre-production pellets), and secondary MP which result from the breakdown of larger plastic items due to a combination of environmental factors (physical, chemical and biological processes) and the properties of the polymer in question (Browne *et al.,* 2007; Fendall and Sewell, 2009).

Microplastics have been reported in the Pacific (Eriksen *et al.,* 2013b; Moore *et al.,* 2001), Atlantic (Ivar do Sul *et al.,* 2013; Law *et al.,* 2010) and Indian Oceans (Ogata *et al.,* 2009), as well as in the Mediterranean (Collignon *et al.,* 2012; Vianello *et al.,* 2013) and North Seas (Claessens *et al.,* 2011; Dubaish and Liebezeit, 2013) and in Arctic polar waters (Lusher *et al.,* 2015b). They have contaminated all environmental matrices: surface water (Eriksen *et al.,* 2013b; Moore *et al.,* 2001), water column (G. L. Lattin *et al.,* 2004; Ng and Obbard, 2006), sediment (Van Cauwenberghe *et al.,* 2013; Vianello *et al.,* 2013) and biota (Devriese *et al.,* 2015; Fossi *et al.,* 2012; Lusher *et al.,* 2013; Murray and Cowie, 2011). These previous studies demonstrate that the entire marine ecosystem is contaminated by MP (Lusher, 2015; Wright *et al.,* 2013). In addition to their physical impacts on marine biota (reviewed in Wright *et al.,* 2013; Rochman *et al.,* 2016) MP may represent a threat for marine life as they can leach toxic chemicals from plastic additives and adsorbed pollutants such as metals, pesticides or Persistent Organic Pollutants (POP) (Ashton *et al.,* 2010; Fossi *et al.,* 2014; Ogata *et al.,* 2009; Teuten *et al.,* 2009) when incorporated in the marine food chain (Avio *et al.,* 2015a; Fossi *et al.,* 2012). Whether the transfer and impact of POP adsorbed on MP are of any importance is, however, a subject of debate (Koelmans *et al.,* 2016; Paul-Pont *et al.,* 2016). Furthermore, MP subjected to biofouling and colonization by prokaryotic and eukaryotic organisms (Zettler *et al.,* 2013) can potentially serve as vehicles that disperse harmful and/or exotic species (Goldstein *et al.,* 2014), or serve as reservoirs for pathogen transmission, thereby threatening marine life.

At the European level, the Marine Strategy Framework Directive (MSFD) has defined marine litter as a full descriptor of the quality of the marine environment with a focus on MP and their degradation products as a main issue (Galgani *et al.,* 2014). In this context, studies aiming to determine the extent and impact of this pollution should be interpreted in a local geographical, physical and socio-economic context. The aim of the present study was to evaluate MP contamination in the Bay of Brest (Brittany, France), which is a rich and diverse ecosystem in terms of habitats, flora and fauna, and is also at the centre of many human activities. Additionally, this study investigated the influence of anthropogenic activities and environmental conditions on the spatial and temporal distribution of MP in surface water and sediment across a complex coastal ecosystem. The data are discussed with reference to a particle dispersal model based on realistic hydrodynamic characteristics, simulating particle distribution throughout the Bay of Brest.

2. Material and methods

2.1. Study area: hydrological characteristics

The Bay of Brest (180 km²) is a shallow, semi-enclosed marine ecosystem on the western coast of Europe (France), linked to the Iroise Sea through a narrow strait (the Goulet) which is 1.8 km wide and ~50 m deep (Figure 1). This is a shallow ecosystem, as 53% of the surface of the bay has a depth below 5 m. Only 13% of the total area is deeper than 20 m and the maximum depth is around 50 m at the Goulet (Auffret, 1983). More than 63% of the freshwater supply in the Bay originates from the Aulne river (surface area: 1842 km²), 15% from the Elorn river: (403 km²) and 5% from the Mignonne river (115 km²) (Auffret, 1983). To give a sense of relative scale, the total annual river discharge is equivalent to the volume exchanged with the ocean during a single tidal period (Le Pape *et al.,* 1996). Tidal currents influence the hydrodynamics of the bay while wave action has a limited influence. This macrotidal system, with an average tide amplitude of 4.7 m, exchanges one-third of its water (around a billion cubic metres) twice a day with the Iroise Sea, with renewal of only ~15% of its waters (Auffret, 1983).

2.1. Sampling method

Nine locations were selected to investigate microplastic concentration, based on specific anthropogenic activities and environmental conditions (Figure 1). Three of these sites were located in the most urbanized area of the Bay of Brest (Brest urban density: 2815 people per km²; Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE, 2013)). These places are characterized by intense anthropogenic activity: site A1 was located at the junction of the recreational and military harbours; site A2 was located near the exit of the three harbours (recreational, military and

commercial); and site A3 was close to the outflow of a wastewater treatment plant (WWTP). The next three sites were selected in areas subject to freshwater inputs, at the mouths of the Elorn (site E1), the Mignonne (site E2) and the Aulne (site E3) rivers. The last three stations were located in areas known to have a mix of water from different origins: between the Iroise Sea and the centre of the bay for site M1, between the centre and the southern part of the bay for site M2, and within the southern part of the bay for site M3.

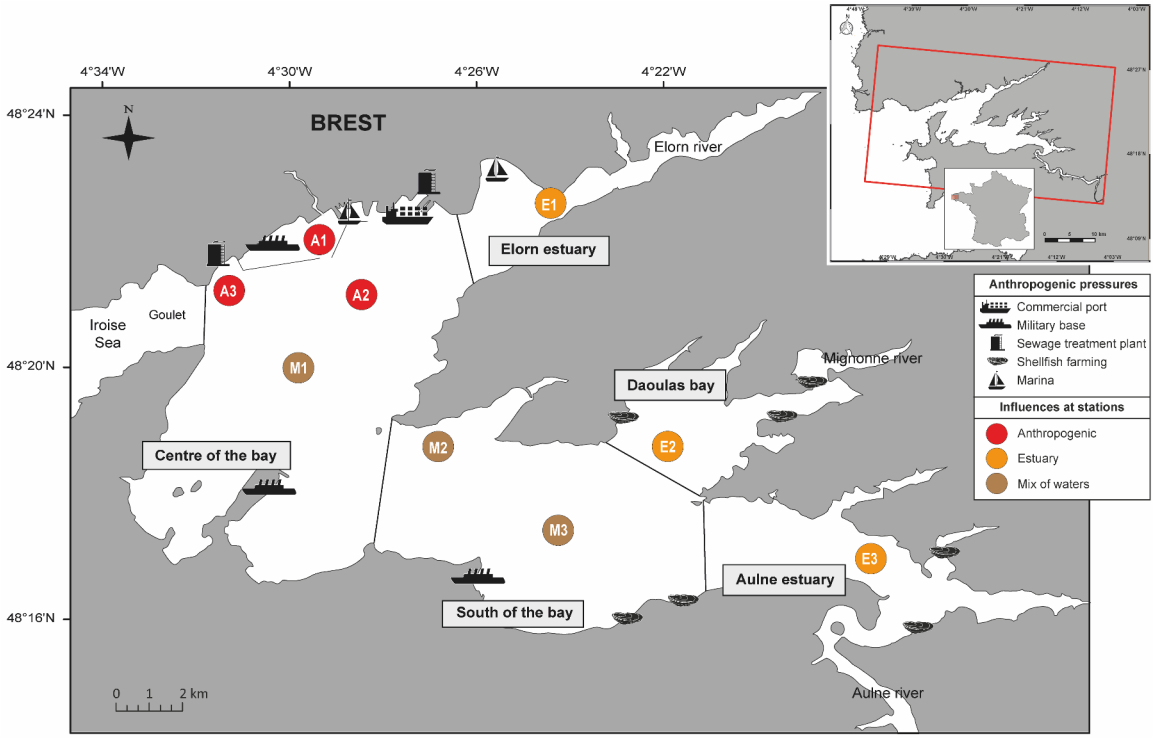


Figure 1: Map of the Bay of Brest indicating sampling locations and the main anthropogenic pressures. The different tracking areas used for the surface dispersal modelling experiment are separated by black lines. The complete hydrodynamic MARS 3D model domain is indicated by the red frame.

The microplastic contamination of the Bay of Brest was assessed in two environmental matrices (surface water and sediment) sampled at the nine stations during two sampling surveys conducted in 2014. Surface water samples were collected in spring (16 – 24 April 2014) and in autumn (26 September to 3 October 2014). Sediment samples were obtained in winter (25 February to 11 March) and in autumn (17 and 20 October 2014). Environmental conditions prior to sampling are detailed in supplementary Table S1.

To study MP occurrence in surface waters, the top 20 cm of the water was sampled using a standard Manta trawl with a 335 µm mesh net and a rectangular net opening of 0.6 × 0.16 m, aboard the research vessel Hesione at an average speed of three knots for 20 min. To avoid the net riding on waves that may lead to variability in the water flow through the net and wind-induced column water mixing, surface water collection was conducted when wind velocity was below 5 m s^{-1}, with a

Beaufort Sea Scale between 0 and 2. Sampling was systematically undertaken against the current flow at ebb tide, as the water flowed out of the bay. Two flow meters (model 23.091, KC Denmark Research Equipment and model 2030, General Oceanics) were used to evaluate the volume of seawater filtered through the net. These machines were carefully inter-calibrated to ensure a reliable comparison of the two sets of measures. The net was thoroughly rinsed with seawater to concentrate debris in the cod end, and samples were transferred into screw capped glass jars. The sediment samples were collected in triplicate at each station using a Van Veen grab deployed from the research vessel Albert Lucas. The sublayer (top 5 cm) of each replicate was collected by opening the upper trap of the Van Veen grab, and the triplicates were then mixed to get approximately 3 L of wet sediment per station. Samples were stored in screw-capped glass jars. All samples were stored at - 20 °C until analysis.

2.2. Visual particle sorting and Raman spectroscopic analysis

For surface water samples, items of marine debris > 5 mm were manually removed and were rinsed with distilled water in order to collect potential MP attached to their surface. Particles < 5 mm, visible to the naked eye, were collected using clean tweezers. The remaining samples were vacuum filtered on fiberglass filters (90 mm diameter; 1.6 µm mesh) and microparticles were sorted and removed under a dissecting stereomicroscope (Leica MZ6 with a 6:3:1 zoom magnification changer). For sediment samples, a density separation was performed to separate MP (density 0.8 to 1.4 g cm^{-3}) from denser natural particles such as sand and coarse sediment grains (~2.65 g cm^{-3}) (Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012). Three density separations were made: the first two used a concentrated saline NaCl solution (1.2 g cm^{-3}) while the last used a sodium tungstate solution (1.56 g cm^{-3}). Supernatants were collected and vacuum filtered (fiberglass filters of 90 mm with 1.6 µm pore size), and particles were sorted using a dissecting binocular microscope. Using this method, the size of the smallest identified particles was 131 × 87 µm for sediment samples and 148 × 108 µm for surface water samples. To validate the sediment MP extraction method that used sodium tungstate, a spiking experiment was performed to verify the full recovery of denser plastics. Ten particles (< 5 mm) of each polymer type, PVC (1.4 g cm^{-3}), PET (1.3 – 1.4 g cm^{-3}) and PA (1.02 – 1.13 g cm^{-3}) (Goodfellow, France), were spiked into sediment collected from the Bay of Brest. A 100 % recovery was observed for all tested plastics without any impairment in the identification of the polymers by Raman spectroscopy (data not shown).

All sorted particles were counted and their shape (fragments, pellets, films, foams and fibres) was described before spectroscopic analysis. Particles were analysed using a HORIBA Scientific LabRam HR800 Raman micro-spectrometer (Villeneuve d'Ascq, France) equipped with an Oxxium laser (Lannion, France) set at 785 nm and a 10X Olympus objective (NA = 0.25). A semi-automated Raman micro-spectroscopy method was used to characterize each particle by its morphology and molecular

composition (Frère *et al.,* 2016). Floating microplastic data were reported in units of microplastic per cubic metre (MP m^{-3}), while sediment MP data were expressed as units of microplastic per dry weight (MP kg^{-1} DW). Microplastic data were also expressed in units of mass per m^3 (water sample) or mass per kg (sediment sample) in the text and in Supplementary Table S2. To facilitate comparison with other studies, the data were also expressed as units per km^2 (water sample) or units per litre (sediment sample) (Supplementary Table S2).

2.3. Background contamination

To reduce contamination from airborne particles, glass material was used and all equipment was rinsed twice with distilled water, followed by a onetime rinse with 70% ethanol before being immediately covered. Operators wore cotton lab coats at all times, but no gloves because these tend to fix airborne particles such as fibres. All surfaces were cleaned with 70% ethanol and operators washed their hands frequently. To assess residual airborne particle contamination not prevented by our operating precautions, empty glass jars were left open during the sampling activities (for both surface water and sediment sampling). Similarly, procedural blanks were run at all steps of the sample analyses with empty glass jars left open during the procedures. Each procedural blank jar was then rinsed with distilled water followed by vacuum filtration on fiberglass filters (90 mm diameter; 1.6 µm mesh) and quantification of particle contamination.

2.4. Surface dispersal modelling

The dynamics of surface microplastics in the Bay of Brest were modelled using the free Java tool Ichthyop v3.2 (Lett *et al.,* 2008), developed to study how physical (*e.g.* ocean currents, temperature) and biological (*e.g.* growth or mortality) factors can affect ichthyoplankton dynamics. Ichthyop uses time series of velocity fields archived from ocean simulations of the "Model for Application at Regional Scale" (MARS 3D) developed by the Ifremer Coastal Oceanography Department (Lazure and Dumas, 2008). The MARS 3D model of the Bay of Brest (limits: 48.20°N - 48.44°N and 4.09°W - 4.72°W) has a horizontal resolution of 50 m, with 20 sigma layers for vertical coordinates (equidistant layers throughout the domain that change with sea surface elevation). The model has already been validated on temperature and salinity datasets (Petton S. *et al.,* unpublished) and previously used for trajectories of toxic algal cells released from estuarine zones (Klouch *et al.,* 2016). The hydrodynamic model is forced by sea elevation at the boundaries obtained from an upper 2D nested model. Initial conditions of temperature and salinity were taken from a regional MARS 3D model that covers the Bay of Biscay and English Channel (PREVIMER project; Caillaud *et al.,* 2016). Temperature and salinity are also forced at a one-hour frequency by this 3D oceanic model. Before modelling the particles in the present study, a spin-up run was done for 45 days. Freshwater inputs for main rivers (Aulne, Elorn and Mignonne) were taken from the HYDRO data bank

(http://www.hydro.eaufrance.fr/). Atmospheric conditions such as atmospheric pressure, wind speed, air temperature, relative humidity and nebulosity were provided by the Arome model from Météo-France and used throughout the domain. Surface velocity fields, interpolated at 1 m below the sea surface elevation from the 3D MARS model, were extracted at 15-minute time steps to launch Ichthyop runs. Ichthyop code was also modified to set 25 particles evenly distributed within each grid mesh of the whole hydrodynamic model inside the bay, which led to a total of 1,437,500 passive particles for each run. Coastline behaviour was set as beaching, as the MARS 3D model is implemented with a wetting-drying numerical method in intertidal areas. To assess the dispersion of particles, the Bay of Brest was divided into five tracking zones: Elorn estuary, Daoulas bay, Aulne estuary, and the centre and south of the bay (Figure 1). To get an overview of the dispersion of floating particles in the Bay of Brest, four release conditions were tested that differed for important hydrodynamic drivers known to be sources of MP (*e.g.* Li *et al.,* 2016), and/or important in the Bay of Brest due to their characteristics: initial tide periods during the first five days of simulation (neap *versus* spring tides) and river inflows during the whole simulation (rise in water level, hereafter called flood water *vs.* low water). Wind direction and intensity effects were not precisely studied in this paper, as they are highly variable in the bay, but were taken into account in the simulations. Four realistic computational periods of 10 days were run, two in February and two in September 2013. Environmental conditions of these computational periods are summarized in supplementary Table S1. For one typical situation, high tide conditions were chosen and 13 simulations made with different release times, from 6 hours before high tide until 6 hours after high tide, with an hourly time step in order to avoid tide bias. A 10-day simulation period was chosen as a compromise between available computer computation time (related to available memory) and reliability of modelling patterns (Caillaud *et al.,* 2016). Horizontal particle dispersion was defined as the standard condition of the Ichthyop model, based on Peliz *et al.* (2007), with a dissipation rate of 1.10^{-9} m^2 s^{-3}. The numerical time steps of both Ichthyop and the hydrodynamic model were set at 6 seconds and trajectory output positions were recorded at hourly intervals. To obtain the tracking results for one typical situation, the ratio of the number of particles inside an area over initial number was estimated at each trajectory output time step and then averaged across the 13 simulations.

The movements of microplastics in the water column are mainly driven by their density, size and shape but can also be modified by wind-induced turbulence (Kukulka *et al.,* 2012) and the presence of biofilms on their surface (Ballent *et al.,* 2013; Enders *et al.,* 2015; Kukulka *et al.,* 2012). As the current state of knowledge does not allow the integration of complex biological processes (for instance the impacts of fouling and grazing) into the modelling of MP behaviour in the water column, the present study focused on microplastics simulated as inert particles and did not take into account their vertical motion. Limitations of the model are acknowledged in the Discussion section.

2.5. Statistical analysis

To test the difference in proportions of identified and non-identified particles, the polymer type distribution and the size range (major axis) between surface water samples and sediment samples, Chi-square tests were used to check for statistical differences. The mean (± standard deviation, SD) MP concentration was calculated at each station. All statistical analyses were conducted using the RStudio 0.99.491 platform (R Core Team, 2016). The significance level was set at 95%. Maps were produced using ArcGIS (version 10.2.2) and modified using Adobe Illustrator (version 16.0.0).

3. Results

3.1. Marine litter and airborne contamination

Marine litter

Items collected in the two surveys were first described by their shape and then analysed by spectroscopy. Their distribution between categories was as follows: in surface water samples, fragments 53%, fibres 25%, foams 11%, thin sheets 8% and pellets 3%; in sediment samples, fragments 71%, fibres 21%, and thin sheets 8% (Supplementary Tables S3 and S4).

Airborne contamination

The fibres collected in the surface water and sediment samples were mostly of the same colour as those collected in procedural blanks. Both samples and almost all field and laboratory procedural blanks contained red, blue and black fibres (19 ± 7 fibres per blank), making firm conclusions difficult to draw. Although fibres were recorded (Supplementary Tables S5 and S6) and counted among the collected items in the present study (Supplementary Tables S3 and S4), they were excluded from the actual MP concentration calculation. This analytical restriction is discussed in the Discussion section.

3.2. Surface water contaminated by microplastics

Microplastic composition

In the two surveys, MP were detected at all stations except station E2 in spring 2014. Across the nine stations sampled in spring and autumn, 965 microparticles were collected (excluding fibres) and 72% (n = 691) were identified as microplastics, with a mean concentration of 0.24 ± 0.35 MP m^{-3} and a mass concentration of 0.33 ± 0.60 mg m^{-3} using Raman micro-spectroscopy. Three polymers were identified among the microplastics collected: the most abundant was polyethylene (PE), at 0.16 ± 0.22 MP m^{-3} (67.4 %); followed by polypropylene (PP), at 0.04 ± 0.05 MP m^{-3} (16.5 %); and polystyrene

(PS), at 0.04 ± 0.08 MP m^{-3} (16.1 %). MP size class distribution was as follows: 5 – 2 mm diameter, 0.09 ± 0.15 MP m^{-3} (37%); 2 – 1 mm, 0.09 ± 0.13 MP m^{-3} (37%); 1 – 0.335 mm, 0.06 ± 0.07 MP m^{-3} (26%) (Supplementary Table S7). Among the remaining 274 non-identified particles (28%), different types of spectra were found: quartz (3%); phthalocyanine blue 15 (PB15), a blue pigment usually used to colour plastics (2%); calcium carbonate (1%); particles whose spectra did not match any in the databases (1%); and particles that could not be identified (no signal or a saturated signal due to fluorescence, 21%) (Supplementary Figure S1).

Variability in microplastic concentration and distribution

Temporal variability in the quantity of microplastics was observed between surveys in spring and autumn. In spring, samples collected from eight of the nine stations contained MP, with a total of 230 MP items collected, corresponding to a mean MP concentration of 0.13 ± 0.13 MP m^{-3} and a mass concentration of 0.28 ± 0.52 mg m^{-3}. In autumn, all samples contained MP, with a total of 480 MP corresponding to a mean MP concentration of 0.35 ± 0.46 MP m^{-3} (0.38 ± 0.70 mg m^{-3}) (Figure 2; Supplementary Table S7). The higher quantities of MP measured in autumn, compared to spring, were mainly observed in the area characterized by intense anthropogenic activity (military, recreational and commercial ports, stations A1-A3) (Figure 2).

The spatial distribution of microplastics in the Bay of Brest was similar between the two surveys. The highest MP concentration was found at site M1, which is a site influenced by a mix of waters coming from the Iroise Sea and the centre of the bay (0.43 MP m^{-3} and 1.43 MP m^{-3} in spring and autumn, respectively) (Figure 2; Supplementary Table S7). The lowest MP concentration was systematically found at site E2, at the mouth of the Mignonne, with no MP collected in spring and a very small concentration of 0.01 MP m^{-3} in autumn (Figure 2; Supplementary Table S7).

Relatively low variability in MP concentration was observed among samples of surface water from stations located close to the urbanized area of Brest (A1, A2 and A3), with mean values ranging from 0.12 ± 0.07 MP m^{-3} in spring to 0.48 ± 0.01 MP m^{-3} in autumn. Higher variability was observed within the areas characterized by mixing waters (M1-M3) and riverine inputs (E1-E3). For instance, surface waters of the most northern sites (E1 and M1, located close to intense anthropogenic activity areas) systematically showed higher MP concentrations than those of the sites located further south (E2, E3 and M2, M3) (Figure 2; Supplementary Table S7).

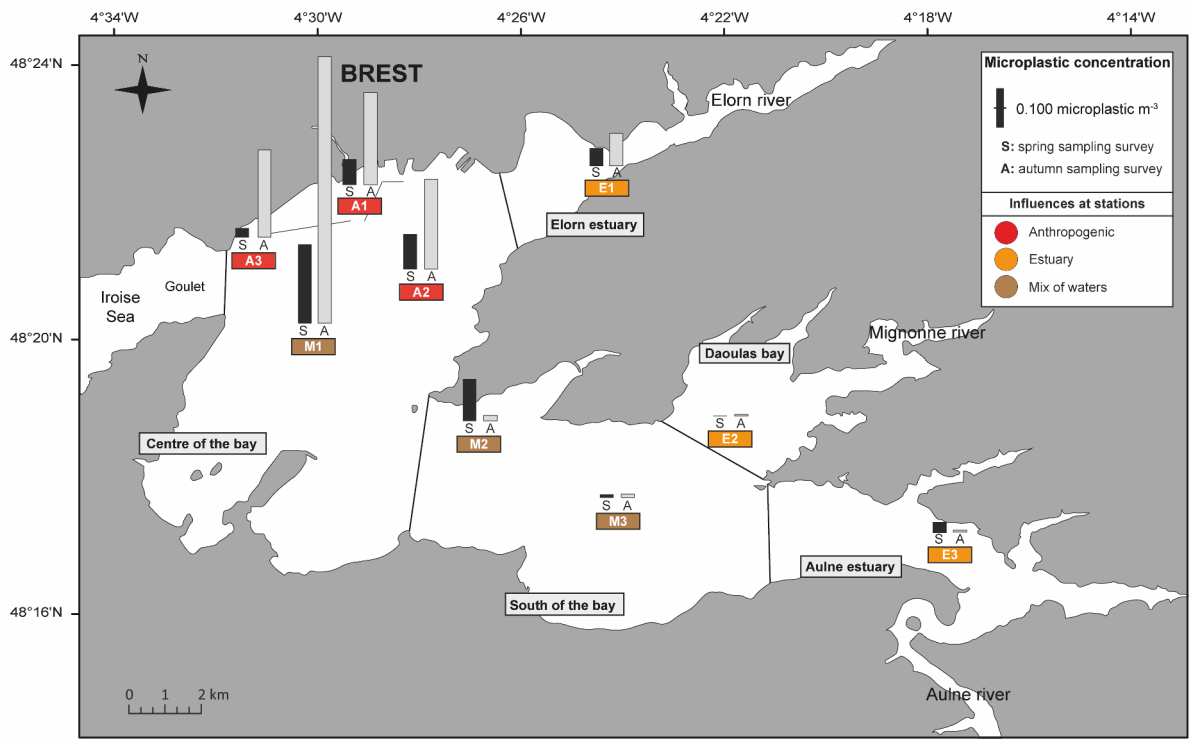


Figure 2: Microplastic concentration (particles m-3) in surface water samples (9 locations; the 5 areas are separated by black lines) in spring and autumn 2014 in the Bay of Brest. Bars on the chart are proportional to microplastic concentration.

3.3. Sediment contamination by microplastics

Microplastic composition

Only half of the sediment samples contained MP across the two surveys. Out of the nine stations sampled during winter and autumn, 229 particles were collected (excluding fibres) and 13% (n = 30) were identified as MP, with a mean concentration of 0.97 ± 2.08 MP kg^{-1} DW (a mass concentration of 0.11 ± 0.16 mg kg^{-1} DW). Three polymers were identified among the analysed microplastics. The most abundant was polyethylene (PE), at 0.51 ± 1.23 MP kg^{-1} DW (53.3 %); followed by polypropylene (PP), at 0.31 ± 0.74 MP.kg^{-1} DW (30%); and polystyrene (PS), at 0.15 ± 0.29 MP kg^{-1} DW (16.7 %). The MP size class distribution was as follows: no particles were found in the 5 – 2 mm size class, particles of 2 – 1 mm were found at 0.26 ± 0.82 MP kg^{-1} DW (27 %); 1 – 0.335 mm at 0.52 ± 1.11 MP kg^{-1} DW (53.5 %); and < 0.335 mm at 0.19 ± 0.30 MP kg^{-1} DW (19.5 %). The smallest MP measured 207 µm in the major axis and 153 µm in the minor axis (Supplementary Table S8). Among the 199 (87%) particles remaining that were not identified as plastic, the following different types were found: calcium carbonate (15%), quartz (10%), PB15 (2%), particles whose spectra did not match any in the databases (1%) and particles that could not be identified (no signal or a saturated signal due to

fluorescence, 59%). It is noteworthy that there were significantly more particles in sediment samples whose spectra showed fluorescence or no signal than in those collected in surface water ($P < 0.05$).

Variability in microplastic concentration and distribution

Spatial and temporal variability was observed in the distribution and concentration of MP in Bay of Brest sediment. In winter, five out of the nine sites contained MP. A total of 27 MP items were collected, corresponding to a mean MP concentration of 1.53 ± 2.84 MP kg^{-1} DW (0.14 ± 0.20 mg kg^{-1} DW). In autumn, MP were only found in samples from four sites out of the nine and a lower number of plastic particles were collected than in winter, with a total of 10 MP corresponding to a mean of 0.40 ± 0.67 MP kg^{-1} DW (0.07 ± 0.09 mg kg^{-1} DW) (Figure 3; supplementary Table S8).

The highest MP concentration was found at station M3, which is influenced by a mix of waters from the southern part of the bay in winter (8.74 MP kg^{-1} DW), and at station A3, which is influenced by a high level of human activity (2.03 MP kg^{-1} DW). No MP were found in samples from stations A1 to A3 (influenced by harbours and WWTP) and E3 (mouth of the Aulne river) during the winter survey, and in stations A1, A2 (harbour influence), E1, E2 (mouth of the Elorn and Mignonne rivers) and M3 (mix of waters in the area located in the southern part of the bay) during the autumn survey.

Spatial variability in the quantity of MP collected was noticed within each area, except for area A in winter where no MP were found regardless of the station. At the same time, the variability among stations sampled in mixed water areas (3.26 ± 4.75 MP kg^{-1} DW) was higher than among stations located in estuary areas (1.32 ± 1.27 MP kg^{-1} DW). In autumn, variability in the quantity of MP collected was observed in all areas of the bay: 0.68 ± 1.17 MP kg^{-1} DW, 0.16 ± 0.28 MP kg^{-1} DW and 0.37 ± 0.39 MP kg^{-1} DW for the human-influenced, estuarine and mixed water areas, respectively (Figure 3; supplementary Table S8).

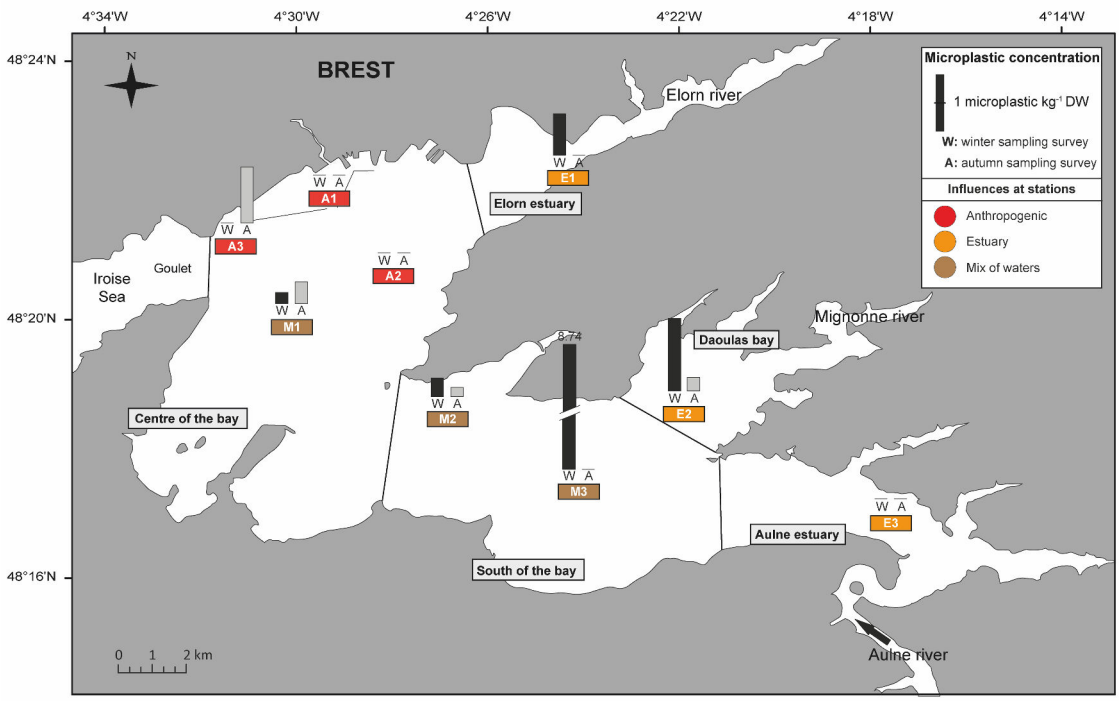


Figure 3: Microplastic concentration (particles kg-1 DW of sediment) in sediment samples (9 locations; the 5 areas are separated by black lines) in winter and autumn 2014 in the Bay of Brest. Bars on the chart are proportional to microplastic concentration.

3.4. Hydrodynamic modelling of the Bay of Brest

The four realistic conditions tested with initial releases (neap and spring tides, flood and low water) were chosen to be representative of the main hydrodynamic drivers in the Bay of Brest. After 10 days of simulations, the mean value of particles remaining in the Bay of Brest for the four conditions tested was 19.7 ± 10.3%, and beached particles represented 14.3 ± 9.5% of the total number of particles set up at T0. The remaining percentage (66 ± 19%) comprised particles considered by the model to be expelled from the bay through the narrow strait (the Goulet, see Figure 1) linking it to the Iroise Sea. The releases of particles in the model showed similar patterns between neap and spring tides, and between flood and low water periods (Figure 4). Even though some variability in particle dispersion occurred within the first four days due to hydrodynamic drivers, these did not notably influence the dispersion of particles for more than 8 days. After 8 days, only a few particles remained in Daoulas bay, and Aulne and Elorn estuaries (Figure 4). Before being flushed out, particles converged in the centre and the south of the bay while decreasing in number in the other areas (Figure 4) during flood tide. At each tidal cycle, one-third of the total water volume is expulsed out of the bay into the Iroise Sea (part of the Atlantic Ocean) (Troadec and Le Goff, 1997) and particles are consequently washed out of the bay. Wind might also be a determining factor for particle dispersion due to its direct impact

on sea surface current. Neither can we exclude drivers like wind-driven oceanic currents that may affect dispersion of the particles in the modelled bay.

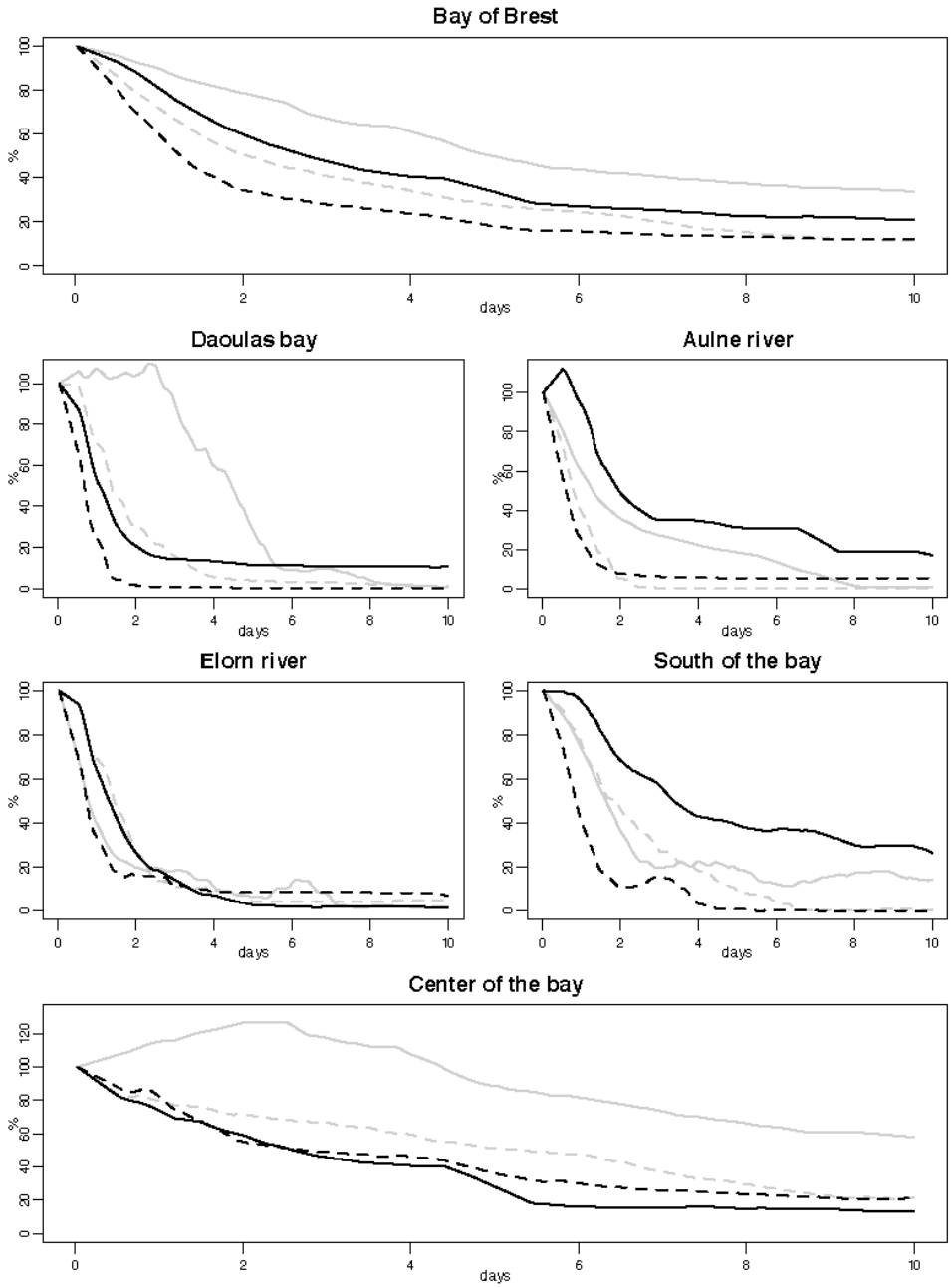


Figure 4: Particle distribution in the Bay of Brest and in each of the 5 tracking zones for 10 days after the release of the particles (25 particles per 50×50 m) based on hydrodynamic characteristics for releases at neap tide (solid black line) and spring tide (dashed black line) periods during a flood period, and for releases at neap tide (solid grey line) and spring tide (dashed grey line) during a low water period (2013).

4. Discussion

4.1. Microplastics in the Bay of Brest: dominance of polyethylene fragments

Microplastics (MP) were detected throughout the Bay of Brest, both in surface water and sediment, in accordance with reports of the ubiquity of this emerging contaminant throughout the marine environment (Browne *et al.,* 2011; Eriksen *et al.,* 2014). The dominance of fragments in surface water and sediment samples over other types of marine debris (film, foam, pellets and fibres) suggests that the source of MP in the bay is more related to the breakdown of larger plastic debris (Andrady, 2011; Cole *et al.,* 2011; Vianello *et al.,* 2013) than to direct primary inputs such as those expected from wastewater treatment plants (WWTP) where textile-derived fibres are dominant (Browne *et al.,* 2011; Murphy *et al.,* 2016; Sutton *et al.,* 2016). However, fragments can also include microplastics derived from personal care products because these are irregular in shape (Carr *et al.,* 2016). Plastic polymers collected in the Bay of Brest were made of polyolefins (PE and PP) and polystyrene (PS). Polyethylene (PE) was the dominant polymer found in the Bay of Brest (53.3 – 67.4 %) in accordance with the scale of its global manufacture and use worldwide (Antunes *et al.,* 2013; GESAMP, 2015; Morét-Ferguson *et al.,* 2010). It represented 29.3% of European demand for plastics in 2014 (PlasticsEurope, 2016). The dominance of PE in the bay is consistent with other environmental surveys conducted in aquatic environments (Enders *et al.,* 2015; Isobe *et al.,* 2014). Together with the two other polymers identified in the bay, PE, PP and PS are members of the "Big Six" (PET, HDPE, uPVC, LDPE, PP, PS), which account for 80 % of plastic production in Europe (PlasticsEurope, 2016). They are commonly used for plastic products with a relatively short usage lifetime (GESAMP, 2015) and are consequently also the most commonly reported polymers in marine environments (Browne *et al.,* 2010; Karapanagioti *et al.,* 2011; Vianello *et al.,* 2013).

The presence of buoyant MP (PE, PP and PS) in the sediment of the bay suggests the existence of sedimentation processes related to ageing processes that modify particle density and shape (Chae *et al.,* 2015; Cole *et al.,* 2011), surface biofilm development (Cózar *et al.,* 2014) that makes MP less hydrophobic (Lobelle and Cunliffe, 2011), or their incorporation into marine aggregates that force them to sink (Long *et al.,* 2015). Considering that none of these complex phenomena are sufficiently well understood for inclusion in modelling, the vertical behaviour of MP was not taken into account in the present work. In addition to inferences recently made with particle sizes dependent on the Reynolds number (Enders *et al.,* 2015; Kukulka *et al.,* 2012), future challenges include modelling the z dimension and, hence, inferring complex MP sedimentation.

It is noteworthy that dense MP such as PVC, PA or alkyd (Vianello *et al.,* 2013) were not detected, despite the fact that a very dense solution (1.56 g cm^{-3}) was used for their extraction and that this procedure was confirmed to be effective in a spiking experiment. However, as 59% of the particles collected remained unidentified, it is possible that some dense MP could have been hidden in this

fraction, especially if the polymers were mixed with dyes (*e.g.* PB 15), as this may prevent their identification (Frère *et al.,* 2016).

4.2. Spatial and temporal variability in the distribution of floating microplastics

The mean MP concentration found in surface water of the Bay of Brest (0.24 ± 0.35 MP m^{-3}) was similar to that found in other coastal ecosystems such as the Goiania estuary in Brazil (0.26 MP m^{-3}) (Lima *et al.,* 2014), the Tamar estuary in the Western English Channel (0.27 MP m^{-3}) (Matthew Cole *et al.,* 2014) and the semi-enclosed Northwestern Mediterranean sea (values ranging from 0.15 MP.m^{-3} to 0.27 MP.m^{-3} depending on the distance from pollution point sources) (de Lucia *et al.,* 2014). Proximity of urban areas and river runoff have been linked to high microplastic concentration in surface waters (Frias *et al.,* 2014). MP spatial variability may be primarily explained by the nature and location of the pathways and their distance from anthropogenic activities (Faure *et al.,* 2015; Sá *et al.,* 2016; Tubau *et al.,* 2015). Sites A1, A2 and A3 exhibited high MP concentration probably as a result of high urbanization in this area, there being two marinas (Château and Moulin Blanc), military and commercial harbours and significant effluent from the main water treatment plant of the bay (treating sewage from more than 134,377 people, and generating 25,300 m^3 day^{-1} of effluent). This area is also the most densely urbanized area in the bay (2815 people km^{-2} for a surface area of 49 km²; INSEE, 2013, compared with 210 people km^{-2} for a surface area of 370 km² over the rest of the bay area; INSEE, 2013) leading to higher loads of urban runoff and direct discharges. Concerning locations at the mouths of the main rivers, higher MP loads were detected at the mouth of the most densely populated river (Site E1, Elorn river: 253 people km^{-2}) compared with the other rivers (E2 Aulne river and E3 Mignonne river < 38 people km^{-2}).

Hydrodynamic factors influence MP distribution in coastal areas (Rocha-Santos and Duarte, 2014), especially as a result of upper sea surface circulation. For instance, the highest MP concentrations in the Bay of Brest were found in its centre, which is likely related to the formation of a transitional convergence zone, as suggested by the outputs of the particle dispersal model, regardless of the hydrodynamic conditions tested (*i.e.* river outflows and tide coefficient) and under wind variability (direction, intensity). This was noticed in prior hydrodynamic studies, which showed the formation of an anticyclonic gyre in the centre of the bay at flood tide, while at ebb tide the entire tidal current left the bay through the Goulet (Beudin *et al.,* 2013; Guérin, 2004; Monbet and Bassoulet, 1989; Salomon and Breton, 1991). Indeed, the particle dispersal model also showed that more than 60% of the particles were expelled from the bay after 10 days. All these findings suggest that passive particle trajectories converge towards the centre of the bay, transitory under the effect of the tide, before mostly being expelled from the bay. This is in agreement with our observations: the highest MP concentration was found at site M1, which is influenced by a mix of waters coming from the Iroise Sea and the centre of the bay. These results suggest that the Bay of Brest is probably a dispersive

coastal system with no permanent sea surface accumulation structures able to concentrate plastic particles, as observed in modelling studies conducted in the Adriatic and Mediterranean seas (Liubartseva *et al.,* 2016; Mansui *et al.,* 2015). It is therefore interesting to observe and model average MP residence time in the Bay of Brest, although such results must be considered with caution due to the limits of the model. Such limitations include i) the open boundary avoiding the possible entry of oceanic particles or re-entry of MP expelled from the bay, although the frontier of the model includes an oceanic zone (part of the Iroise sea) corresponding to the tidal prism of the bay (Salomon and Breton, 1991), which allows trajectories of the particles that exited *via* the Goulet to re-enter. Such re-entry appeared very low compared with particle outflow over the modelled timescale. Other points about the model that should be borne in mind are: ii) the beaching behaviour; iii) the vertical behaviour of MP, which is very complex and for which input data are required before being realistically modelled; and iv) the sources that need observations/quantification for further runs. Indeed, it would be of great interest to further refine details on outputs and sources. Klouch *et al.* (2016) studied the trajectories of *Alexandrium minutum* cells in the surface water of the Bay of Brest, considering only the mouth of the main rivers where the blooms of *A. minutum* occur. Considering estuaries as starting points for *A. minutum* cell release, the retention of the particles appeared higher, from 56 to 81%, compared to our study. In future work, fine spatial and temporal sampling of MP sources plus 3D dimensional modelling (of river mouths, beaches, wastewater treatment plants, etc.) would allow a better understanding of MP behaviour in a shallow, semi-enclosed, and urbanized marine ecosystem such as the Bay of Brest.

The variability of MP distribution observed between spring and autumn may be due to small scale water movements, which are known to be highly time dependent due to quickly changing wind and sea conditions (GESAMP, 2015). While wind-induced mixing is also known to affect the vertical distribution of MP in the water column (Reisser *et al.,* 2015), this may not have played a major role in the differences in MP concentrations observed between the two surveys, as the wind conditions during the manta sampling were below the wind speed threshold known to induce this phenomenon (< 5 m s^{-1}) (G. L. Lattin *et al.,* 2004; Reisser *et al.,* 2015). Wind forcing conditions should be further tested using time series observations and modelling, keeping in mind that no significant oceanic circulation related to the prevailing winds is expected in the bay because there is only a very small distance over which the wind can blow in the same direction before reaching the shore (*i.e.* a very small fetch).

To further explore the spatial and temporal variability in MP concentrations at the sea surface, more data are required and vertical motion must be taken into account in modelling work. Although the MARS 3D hydrodynamic model and Ichthyop dispersal model combined are able to integrate the vertical dimension for particles, taking into account extrinsic processes such as wind-induced turbulence, further studies are needed to integrate complex biological processes (*e.g.* fouling and

grazing, with their associated rising and falling velocities) that may impact the vertical distribution of MP (Besseling *et al.,* 2017).

4.3. Sediments have a relatively low microplastic content

Overall, the mean MP concentration found in the sediment of the Bay of Brest (0.97 ± 2.08 MP kg^{-1} DW) was below that reported in other areas, such as the United Kingdom (up to 31 particles kg^{-1} estuarine sediment) (Thompson *et al.,* 2004), along the Belgium coast (97.2 ± 18.6 particles kg^{-1} DW) (Claessens *et al.,* 2011) and in the Venice Lagoon in Italy (672 – 2,175 particles kg^{-1} DW) (Vianello *et al.,* 2013). However, it is worth mentioning that the high proportion of unidentified particles (59%) and the fact that fibres were not included in the present study may lead to lower concentration values than those reported in prior studies, notably some that have shown a large amount of fibres in sediment samples (*e.g*. Claessens *et al.,* 2011). However, it should be mentioned that other studies have shown a limited proportion of fibres in the MP found in sediment: for example, fibres represented only 10% of polymers in the sediments of Venice Lagoon) (Vianello *et al.,* 2013). In our study, the exclusion of non-identified fibres was considered to be a more rigorous approach, which would avoid overestimating the MP concentration in the Bay of Brest. It was justified by i) the non-negligible quantities of fibres found in all of our procedural blanks, ii) the impossibility of discriminating fibres optically or to identify their molecular composition with the Raman micro-spectroscopy method used here (data not shown; Dris, 2016), and iii) the high proportion of non-plastic natural fibres (cellulose, natural cellulose-based polymers like cellophane or protein-based polymers) reported in environmental samples when spectroscopic methods are employed to verify the nature of the collected fibres (Collard *et al.,* 2015; Remy *et al.,* 2015; Wesch *et al.,* 2016).

If this low amount of MP in the sediment is confirmed, it could be explained by a reduced time for sedimentation and the intense flush out of the bay compared with other estuaries (Deloffre *et al.,* 2007; Gouleau *et al.,* 2000). Indeed, Ehrhold *et al.* (2016) showed that the rate of sedimentation is negligible in the centre of the bay and increases slightly close to river mouths (up to 0.5 cm yr^{-1}). The shallowness of the Bay of Brest enhances vertical water mixing and sediment resuspension (Pommepuy, 1977) which may have further prevented sedimentation and accumulation of MP in the sediment; all sampled stations have a depth below 20 m (mean depth: 12 ± 5 m). Finally, even though the highest MP concentrations were found in sediment close to WWTP (site A3) and to active aquaculture areas (mainly oyster and mussel farming activities) in estuarine areas (sites M3 and E2), both known to be important sources of MP in the marine environment (Murphy *et al.,* 2016; Sá *et al.,* 2016; Unger and Harrison, 2016), no consistent pattern was revealed in sediment between sampling periods, and no permanent MP accumulation zone was found in the sediment of the Bay of Brest.

One limitation of this study is the high proportion of unidentified particles. Pre-treatment of sediment samples, for example to remove organic matter, could reduce the proportion of unidentified particles, as suggested by Imhof *et al.* (2016). If developed successfully, such new improved methods should then be systematically applied in further studies to assess spatial and temporal variability of MP in the sediment of coastal environments.

5. Conclusion

The present work demonstrated the dominance of polyethylene, polypropylene and polystyrene fragments in both the surface water and sediment of the Bay of Brest. The presence of relatively buoyant MP in the sediment suggests the existence of physical and/or biological processes forcing buoyant MP to sink to the bottom of the bay. Temporal and spatial heterogeneities were observed in the abundance and distribution of microplastics, emphasizing the need for fine-scale temporal sampling to encompass the whole extent of MP contamination in such an active coastal ecosystem. Finally, data collection in freshwater inputs (rivers and water treatment plants) is needed to better inform the modelling of the MP source path and fate in coastal ecosystems.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Unique Inter-ministerial Fund (FUI) and the local communities (CR Bretagne, CR PACA, CD29, CATPM and Brest Métropole) as part of the MICROPLASTIC2 project and by the ANR CESA (ANR-15-CE34-0006-02, NANOPLASTICS project). We acknowledge O. Gauthier, M. Cachera, G. Schaal, G. Grégoire, P. Le Hir and A.L. Cassone for helpful discussions and technical assistance. We thank A. Volety, R. Whittington and Helen McCombie for their help in editing the English. L. Frère was funded by a french doctoral research grant (DDP150097 ARED-FRERE) from Brest Métropole (50%) and University of Brest (50%).

Supplementary information

Table S1: Environmental conditions i) prior to sampling activities in winter, spring and autumn in the Bay of Brest. Data are expressed as mean values calculated from daily measures recorded during the 10 days before the day of each collection; and ii) during computational periods (4 runs of 10 days at 2 different periods). Mean river flow was calculated from the Elorn, Aulne and Mignonne rivers.

Environmental matrix	Sampling time	Wind velocity ± SD ($m\ s^{-1}$)	Mean rainfall ± SD ($mm\ j^{-1}$)	Mean river flow ± SD ($m^3\ s^{-1}$) (E: Elorn; M: Mignonne; A: Aulne)
Surface water	Spring (April)	0.77 ± 5.24	0.827 ± 1.408	E: 5.54 ± 0.99 M: 1.17 ± 0.27 A: 19.81 ± 3.73
	Autumn (September)	2.32 ± 2.96	0.173 ± 0.399	E: 1.24 ± 0.10 M: 0.27 ± 0.19 A: 2.87 ± 1.20
Sediment	Winter (February)	4.82 ± 7.20	4.761 ± 4.859	E: 20.90 ± 6.13 M: 4.82 ± 1.60 A: 120.06 ± 38.10
	Autumn (October)	2.66 ± 5.82	4.707 ± 4.148	E: 2.31 ± 0.88 M: 0.48 ± 0.21 A: 7.38 ± 1.48

Computational periods	Initial dates of modelling	Wind velocity ± SD ($m\ s^{-1}$)	Initial tidal coefficient	Mean river flow ± SD ($m^3\ s^{-1}$) (E: Elorn; M: Mignonne; A: Aulne)
February 2013	5 Feb	7.14 ± 3.78	Neap tide (49)	E: 15.5 ± 2.0 M: 3.7 ± 0.8 A: 84.0 ± 7.9
	11 Feb	4.40 ± 2.15	Spring tide (107)	E: 12.4 ± 2.3 M: 2.7 ± 0.8 A: 63.4 ± 17.5
September 2013	20 Sept	2.51 ± 1.29	Spring tide (105)	E: 1.2 ± 0.2 M: 0.2 ± 0.0 A: 2.2 ± 0.5
	25 Sept	4.00 ± 2.54	Neap tide (54)	E: 1.3 ± 0.1 M: 0.2 ± 0.0 A: 2.8 ± 0.5

Table S2: Microplastic concentrations in surface water and sediment samples from the Bay of Brest (- : no MP detected).

Sampling time	Area	Station	Surface water				Sediment			
			Concentration per m^3		Concentration per km^2		Concentration per kg		Concentration per l	
			MP m^{-3}	Mass (mg m^{-3})	MP km^{-2}	Mass (g km^{-2})	MP kg^{-1} DW	Mass (mg kg^{-1} DW)	MP l^{-1}	Mass (mg l^{-1})
Winter / Spring (n=9)	Anthropogenic	A1	0.14	0.05	30,329	12	-	-	-	-
		A2	0.19	0.12	41,994	26	-	-	-	-
		A3	0.05	0.77	10,498	173	-	-	-	-
	Estuary	E1	0.09	0.05	20,997	11	1.44	0.33	1.68	0.39
		E2	-	-	-	-	2.53	0.02	2.16	0.02
		E3	0.05	0.01	12,214	2	-	-	-	-
	Mix waters	M1	0.43	1.49	95,274	334	0.39	0.16	0.54	0.22
		M2	0.22	0.04	50,08	10	0.65	0.04	1.22	0.07
		M3	0.02	0.01	3,664	2	8.74	0.59	6.67	0.45
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	0.49	0.45	78,963	72	-	-	-	-
		A2	0.48	0.24	76,829	39	-	-	-	-
		A3	0.47	0.54	74,694	87	2.03	0.23	2.61	0.29
	Estuary	E1	0.17	0.02	27,744	4	-	-	-	-
		E2	0.01	<0.01	1,525	0.1	0.49	no data	0.45	no data
		E3	0.01	<0.01	1,535	0.1	-	-	-	-
	Mix waters	M1	1.43	2.17	228,352	347	0.78	0.17	0.83	0.18
		M2	0.03	0.01	4,605	1	0.33	0.14	0.42	0.17
		M3	0.02	<0.01	3,049	1	-	-	-	-

Table S3: Proportion in percentage of collected items by location, depending on their shape after visual observation in samples of surface water collected from the Bay of Brest.

Survey	Influence	Station	Fragments (%)	Pellets (%)	Films (%)	Foams (%)	Fibres (%)
Spring (n=9)	Anthropogenic	A1	54	3	25	12	6
		A2	82	2	9	7	0
		A3	52	6	15	6	22
	Estuary	E1	50	0	31	6	13
		E2	4	0	0	1	95
		E3	18	0	38	26	18
	Mix	M1	69	7	10	10	4
		M2	21	0	1	0	78
		M3	14	0	5	0	82
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	62	5	5	22	5
		A2	75	3	6	13	3
		A3	65	2	7	15	12
	Estuary	E1	84	2	2	8	4
		E2	50	0	0	33	17
		E3	50	0	0	0	50
	Mix	M1	69	4	5	16	6
		M2	58	0	8	8	25
		M3	26	0	13	0	61

Table S4: Proportion in percentage of collected items by location, depending on their shape after visual observation in sediment samples collected from the Bay of Brest.

Survey	Influence	Station	Fragments (%)	Pellets (%)	Films (%)	Foams (%)	Fibres (%)
Winter (n=9)	Anthropogenic	A1	88	0	6	0	6
		A2	86	0	5	0	10
		A3	86	0	4	0	10
	Estuary	E1	31	0	25	0	44
		E2	39	0	0	0	61
		E3	65	0	12	0	23
	Mix	M1	83	0	9	1	7
		M2	82	0	11	0	8
		M3	53	0	3	0	43
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	47	0	16	0	37
		A2	53	0	35	0	12
		A3	90	0	3	0	6
	Estuary	E1	22	0	0	0	78
		E2	29	0	7	0	64
		E3	29	0	14	0	57
	Mix	M1	83	0	0	0	17
		M2	56	0	13	0	31
		M3	11	0	0	0	89

Table S5: Quantity of fibres in samples of surface water collected from the Bay of Brest according to their colors. Data are expressed in terms of the total number of fibres collected per sample.

Sampling survey	Influence	Station	Blue	Black	Red	White	Green	Violet	Total
Spring (n=9)	Anthropogenic	A1	4	0	0	0	0	0	4
		A2	0	0	0	0	0	0	0
		A3	1	15	3	1	0	0	20
	Estuary	E1	5	1	1	0	0	0	7
		E2	127	0	9	0	9	21	166
		E3	3	3	0	0	0	0	6
	Mix	M1	7	0	0	0	0	0	7
		M2	60	3	5	0	4	3	75
		M3	59	9	2	1	0	0	71
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	8	0	1	0	0	0	9
		A2	1	2	0	0	0	0	3
		A3	12	0	2	0	0	0	14
	Estuary	E1	0	0	2	0	0	0	2
		E2	0	0	1	0	0	0	1
		E3	3	0	0	0	0	0	3
	Mix	M1	13	0	6	0	0	0	19
		M2	3	0	0	0	0	0	3
		M3	10	3	1	0	0	0	14

Table S6: Quantity of fibres found in sediment samples collected from nine locations in the Bay of Brest according to their colors. Data are expressed in terms of the total number of fibres collected per sample.

Sampling survey	Influence	Station	Blue	Black	Red	Total
Winter (n=9)	Anthropogenic	A1	0	0	0	0
		A2	2	0	0	2
		A3	5	5	0	10
	Estuary	E1	1	4	0	5
		E2	7	8	1	16
		E3	3	2	0	5
	Mix	M1	4	0	0	4
		M2	1	1	1	3
		M3	4	1	0	5
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	1	5	1	7
		A2	0	2	0	2
		A3	1	1	0	2
	Estuary	E1	5	2	0	7
		E2	2	5	1	8
		E3	2	1	0	3
	Mix	M1	2	3	0	5
		M2	1	50	1	52
		M3	0	5	1	6

Table S7: Microplastic (fibres excluded) concentrations in surface water samples in the Bay of Brest as a function of polymer type and size class. Data are expressed in terms of number of microplastics (MP) per m^3.

Survey	Influence	Station	Microplastic concentration (MP m^{-3})						
			Total MP	**PE**	**PP**	**PS**	**5-2 mm**	**2-1 mm**	**1-0.335 mm**
Spring (n=9)	Anthropogenic	A1	0.14	0.10	0.03	<0.01	0.06	0.05	0.03
		A2	0.19	0.11	0.07	<0.01	0.06	0.04	0.09
		A3	0.05	0.03	0.02	-	0.03	0.02	-
		Mean (± SD)	**0.12 ± 0.07**	**0.08 ± 0.04**	**0.04 ± 0.03**	**<0.01**	**0.05 ± 0.02**	**0.04 ± 0.02**	**0.04 ± 0.04**
	Estuary	E1	0.09	0.08	0.01	-	<0.01	0.04	0.05
		E2	-	-	-	-	-	-	-
		E3	0.05	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03
		Mean (± SD)	**0.05 ± 0.05**	**0.04 ± 0.04**	**0.01 ± 0.01**	**<0.01**	**0.01 ± 0.01**	**0.02 ± 0.02**	**0.03 ± 0.03**
	Mix waters	M1	0.43	0.33	0.09	<0.01	0.16	0.18	0.08
		M2	0.22	0.15	0.05	0.02	0.07	0.08	0.08
		M3	0.02	0.02	-	-	0.01	<0.01	-
		Mean (± SD)	**0.22 ± 0.20**	**0.17 ± 0.16**	**0.05 ± 0.04**	**0.01 ± 0.01**	**0.08 ± 0.08**	**0.09 ± 0.09**	**0.05 ± 0.05**
	Bay of Brest	***Mean (+/- SD)***	**0.13 ± 0.13**	**0.10 ± 0.10**	**0.03 ± 0.03**	**0.01 ± 0.01**	**0.05 ± 0.05**	**0.05 ± 0.06**	**0.04 ± 0.04**
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	0.49	0.31	0.03	0.15	0.25	0.17	0.07
		A2	0.48	0.32	0.08	0.08	0.13	0.20	0.15
		A3	0.47	0.32	0.05	0.09	0.17	0.14	0.16
		Mean (± SD)	**0.48 ± 0.01**	**0.32 ± 0.00**	**0.06 ± 0.02**	**0.11 ± 0.04**	**0.18 ± 0.06**	**0.17 ± 0.03**	**0.13 ± 0.05**
	Estuary	E1	0.17	0.12	0.03	0.03	0.03	0.08	0.07
		E2	0.01	<0.01	-	<0.01	<0.01	<0.01	-
		E3	0.01	<0.01	<0.01	-	-	<0.01	<0.01
		Mean (± SD)	**0.06 ± 0.09**	**0.04 ± 0.07**	**0.01 ± 0.01**	**0.01 ± 0.01**	**0.01 ± 0.01**	**0.03 ± 0.04**	**0.02 ± 0.04**
	Mix waters	M1	1.43	0.90	0.21	0.32	0.61	0.55	0.27
		M2	0.03	0.02	<0.01	-	0.01	0.01	<0.01
		M3	0.02	0.01	-	<0.01	-	0.03	-
		Mean (± SD)	**0.49 ± 0.81**	**0.31 ± 0.51**	**0.07 ± 0.12**	**0.11 ± 0.18**	**0.21 ± 0.35**	**0.19 ± 0.31**	**0.09 ± 0.15**
	Bay of Brest	***Mean (± SD)***	**0.35 ± 0.46**	**0.22 ± 0.29**	**0.05 ± 0.07**	**0.08 ± 0.11**	**0.13 ± 0.20**	**0.13 ± 0.18**	**0.08 ± 0.09**

Table S8: Microplastic (fibres excluded) concentrations in sediment samples for each location during the two surveys. Data are expressed in terms of the number of microplastics (MP) per kg DW of sediment.

Survey	Influence	Station	Microplastic concentration (MP kg^{-1} DW)							
			Total MP	**PE**	**PP**	**PS**	**5-2 mm**	**2-1 mm**	**1-0.335 mm**	**<0.335 mm**
Winter (n=9)	Anthropogenic	A1	-	-	-	-	-	-	-	-
		A2	-	-	-	-	-	-	-	-
		A3	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mean (± SD)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Estuary	E1	1.44	0.96	-	0.48	-	0.48	0.96	-
		E2	2.53	-	1.90	0.63	-	-	1.27	1.27
		E3	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mean (± SD)	**1.33 ± 1.27**	**0.32 ± 0.56**	**0.63 ± 1.10**	**0.37 ± 0.33**	-	**0.16 ± 0.28**	**0.74 ± 0.66**	**0.42 ± 0.73**
	Mix	M1	0.39	-	0.39	-	-	0.39	-	-
		M2	0.65	0.65	-	-	-	0.33	0.33	-
		M3	8.74	5.25	2.62	0.87	-	3.50	4.37	0.87
		Mean (± SD)	**3.26 ± 4.75**	**1.97 ± 2.86**	**1.00 ± 1.42**	**0.29 ± 0.50**	-	**1.40 ± 1.81**	**1.57 ± 2.44**	**0.29 ± 0.50**
	Bay of Brest	***Mean (± SD)***	**1.53 ± 2.84**	**0.76 ± 1.72**	**0.55 ± 1.00**	**0.22 ± 0.35**	-	**0.52 ± 1.13**	**0.77 ± 1.43**	**0.24 ± 0.48**
Autumn (n=9)	Anthropogenic	A1	-	-	-	-	-	-	-	-
		A2	-	-	-	-	-	-	-	-
		A3	2.03	0.68	0.68	0.68	-	-	1.35	0.68
		Mean (± SD)	**0.68 ± 1.17**	**0.23 ± 0.39**	**0.23 ± 0.39**	**0.23 ± 0.39**	-	-	**0.45 ± 0.78**	**0.23 ± 0.39**
	Estuary	E1	-	-	-	-	-	-	-	-
		E2	0.49	0.49	-	-	-	-	-	0.49
		E3	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mean (± SD)	**0.16 ± 0.28**	**0.16 ± 0.28**	**-**	-	-	-	-	**0.16 ± 0.28**
	Mix	M1	0.78	0.78	-	-	-	-	0.39	0.39
		M2	0.33	0.33	-	-	-	-	-	0.34
		M3	-	-	-	-	-	-	-	-
		Mean (± SD)	**0.37 ± 0.39**	**0.37 ± 0.39**	**-**	-	-	-	**0.13 ± 0.22**	**0.24 ± 0.21**
	Bay of Brest	***Mean (± SD)***	**0.40 ± 0.67**	**0.25 ± 0.32**	**0.08 ± 0.23**	**0.08 ± 0.23**	-	-	**0.19 ± 0.45**	**0.21 ± 0.27**

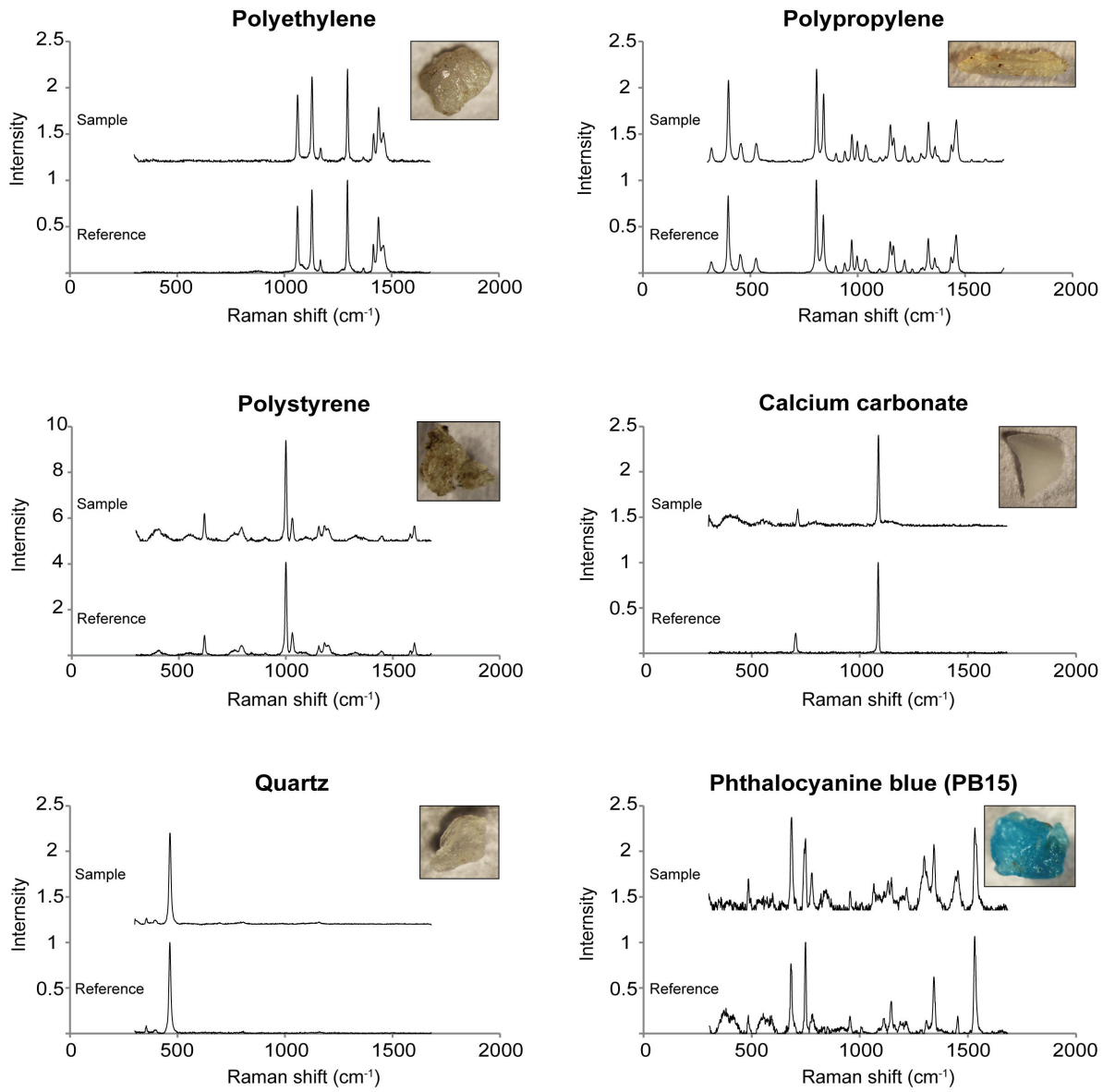


Figure S1: Spectra of polymers collected in the Bay of Brest and spectra of polymer references (each intensity was normalised by the highest intensity peak) obtained by Raman analysis (PE: polyethylene, PP: polypropylene, PS: polystyrene, $CaCO_3$: calcium carbonate, PB15: phthalocyanine 15). Sample picture in insert.

B. Evaluation du niveau de contamination de la macrofaune : résultats préliminaires

Pour évaluer le niveau de contamination du biote, des organismes marins caractérisés par différents habitats et niveaux trophiques ont été sélectionnés : la moule *Mytilus* spp. (bivalve filtreur dans la colonne d'eau), la coque *Cerastoderma edule* (bivalve filtreur à l'interface eau-sédiment), l'arénicole *Arenicola marina* (annélides fouisseuses dans le sédiment), l'étrille *Necora puber* (crustacés carnivores vivant sur l'estran), la crevette *Palaemon elegans* (omnivore opportuniste épibenthique) et la dorade grise *Spondyliosoma cantharu* (téléostéen pélagique carnivore). Ces travaux ont été réalisés au LEMAR par A.L. Cassone (CNRS) et M. Thibault (UBO). Les analyses par spectroscopie Raman ont été réalisées au LDCM sous la responsabilité scientifique et technique d'E. Rinnert. C'est un travail conjoint avec l'ANSES (Laboratoire de Sécurité des Aliments de Boulogne-sur-Mer et Direction de l'Evaluation des risques) permis par projet financé CRD-ANSES.

Les différentes espèces ont été collectées (n = 50 individus pour les invertébrés ; n = 100 pour les dorades) en septembre et octobre 2015 sur trois sites de la rade de Brest : la plage et les pontons du Moulin Blanc pour les organismes filtreurs (moules et coques) et fouisseurs (arénicoles), l'estran rocheux de la pointe de Marlou (Plougastel-Daoulas) pour les étrilles et les crevettes, et enfin le bassin sud de la rade (proche de l'Anse de Poulmic) pour les dorades (Figure 23).

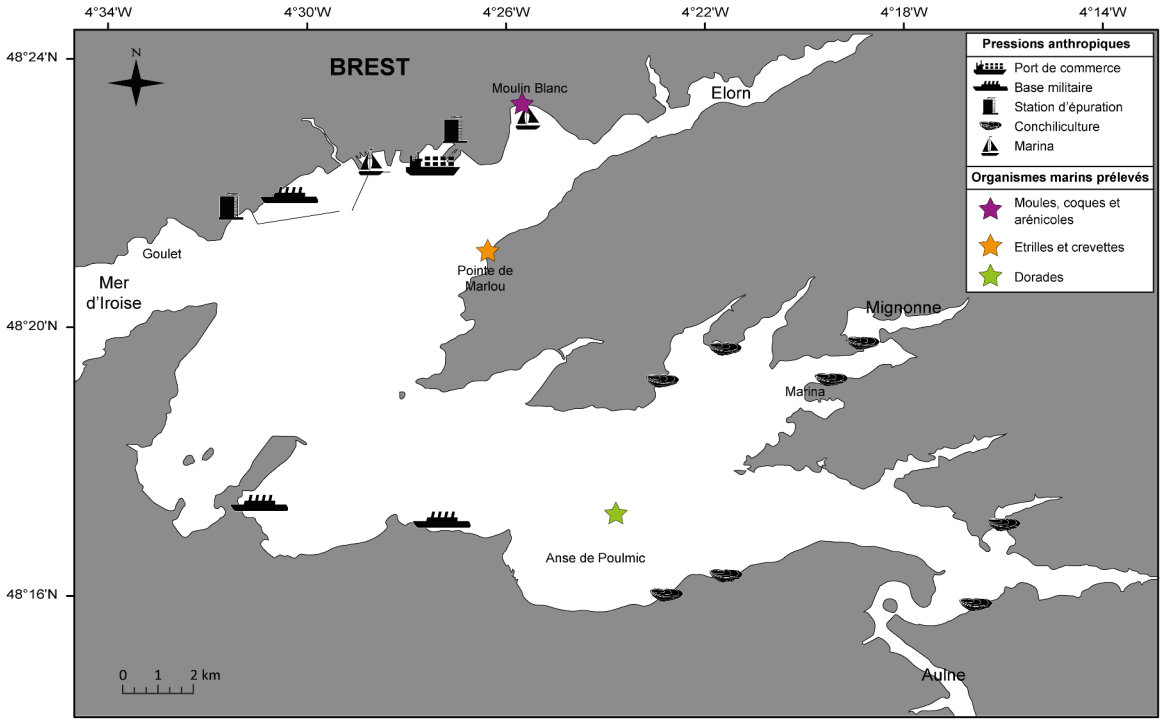


Figure 23 : Localisation des sites de prélèvement des organismes marins en rade de Brest.

Afin d'extraire les particules des différentes espèces échantillonnées, le protocole validé dans l'article de Dehaut *et al.* (2016) (présenté dans le Chapitre III) a été utilisé. Brièvement, les tissus ont été digérés avec une solution de KOH 10 % pendant 24 h à 60 °C à 300 rpm. Une filtration sous vide des digestats a permis de concentrer les particules sur des filtres en fibre de verre de type GF/A (90 mm, porosité 1,6 µm) qui ont ensuite été conservés dans des boîtes de pétri en verre à 4 °C jusqu'à extraction des particules via une loupe binoculaire. La composition des particules ainsi extraites des tissus a été identifiée via une analyse en micro-spectroscopie Raman semi-automatique, dont la méthode est développée dans l'article (Frère *et al.,* 2016) (Chapitre III - A). Bien que l'échantillonnage et le traitement des échantillons aient été entièrement réalisés, l'analyse des données étant encore incomplète, seuls les résultats préliminaires des moules et des coques ont été inclus dans ce manuscrit, l'ensemble des données fera l'objet d'une publication ultérieure.

Les résultats préliminaires montrent que l'identification des particules collectées (n = 310) chez les moules et les coques reste faible (37 - 41 %) par rapport aux particules non identifiées (59 - 63 %). Parmi celles identifiées, la majorité des particules sont du carbonate de calcium (55 - 61 %) et du quartz (11 - 24 %). Une quantité importante de particules bleues montrant un signal correspondant à un pigment bleu appelé phthalocyanine 15 (ou PB15) a été collectée chez les moules (26 %) et bien que ce pigment suggère une origine anthropique, la forte intensité du pigment lors de l'analyse en micro-spectroscopie Raman a empêché l'identification de la composition de ces particules. Van Cauwenberghe et Janssen (2014) ont également montré la présence de particules contenant ce pigment dans les moules, et bien que ce pigment soit largement utilisé en plasturgie, elles n'ont pas pu être comptabilisées avec les microplastiques faute de réussir à identifier leur famille de polymère.

Un faible niveau de contamination des moules et coques de la rade de Brest a été observé avec uniquement un total de 3 microplastiques (PE, PS et PTFE) collectés dans trois individus des moules (ce qui correspond 2 % des 128 particules identifiées) et 9 microplastiques (3 PS, 5 PP et 1 PTFE) collectés dans les coques (ce qui correspond à 8 % des 85 particules identifiées) (Figure 24 ; Figure 25). En termes de nombre de microplastique par gramme de chair humide, la contamination est légèrement plus importante chez les coques avec 0,08 ± 0,34 $MP.g^{-1}$ que chez les moules avec 0,01 ± 0,04 $MP.g^{-1}$. Dans une étude effectuée sur les côtes de la mer du Nord, un niveau plus élevé (1,2 $MP.g^{-1}$) a été retrouvé dans des vers de sable *Arenicola marina* en comparaison des moules *M. edulis* (0,2 ± 0,3 $MP.g^{-1}$) (Van Cauwenberghe *et al.,* 2015). Bien que les coques et les arénicoles ne puissent pas être comparées directement, ces deux espèces possèdent un mode de vie fouisseur dépendant de l'exondation, et leur contamination par les microplastiques peut s'effectuer à la fois via l'eau et les sédiments ce qui pourrait influencer leurs niveaux d'exposition.

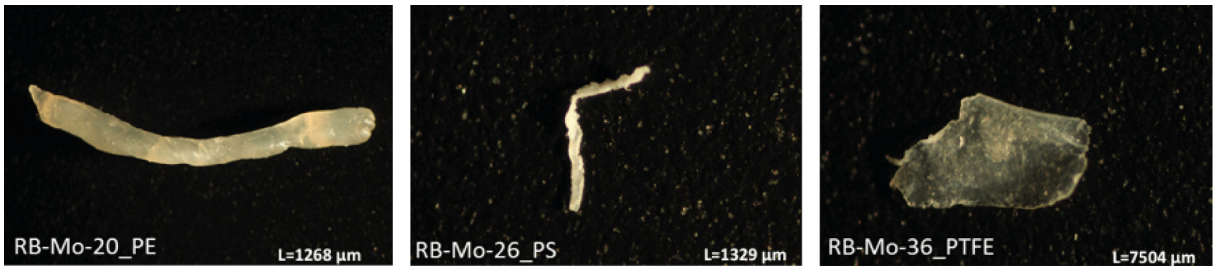


Figure 24 : Microplastiques collectés dans les moules. La longueur (L) des fragments est exprimée en µm.

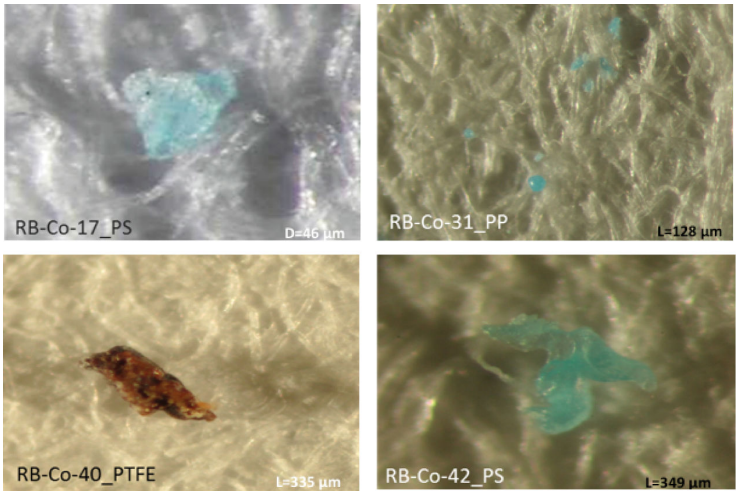


Figure 25 : Exemples de microplastiques collectés dans les coques. La longueur (L) des fragments et le diamètre (D) des billes sont exprimés en µm.

Les moules font partie des organismes les plus étudiés dans la problématique d'exposition des organismes marins aux microplastiques (Lusher, 2015), et plusieurs études se sont intéressées à la contamination des moules européennes : en Mer du Nord (France, Belgique et Pays-Bas) Van Cauwenberghe *et al.* (2015) ont mesuré 0,2 ± 0,3 MP.g^{-1} de *M. edulis* (taille MP : 15 à 90 µm) ; en Allemagne Van Cauwenberghe et Janssen (2014) ont observé 0,36 ± 0,07 MP.g^{-1} dans des moules d'élevage (*M. edulis*) (taille MP : 5 à > 25 µm) ; en Belgique (De Witte *et al.,* 2014) ont détecté 0,26 à 0,51 fibre.g^{-1} de *M. edulis* (taille MP : 200 à 1 500 µm) ; et enfin, en France (Pays de la Loire) (Phuong *et al.,* 2017) ont trouvé 0,23 ± 0,09 MP.g^{-1} de *M. edulis* (taille MP : 30 à 200 µm ; 85,5 % de fragments et 14,3 % de fibres). Ces valeurs sont supérieures d'un facteur 10 à celles retrouvées dans les moules et coques de la rade de Brest.

Différentes hypothèses sont à envisager afin d'expliquer cette différence : (i) l'exclusion des fibres et des particules présentant un signal correspondant au PB15 dans cette présente étude peut expliquer des valeurs plus faibles que celles mentionnées dans les références ci-dessus ; et (ii) la méthode utilisée ici (extraction des microplastiques à la loupe binoculaire) n'a pas permis de descendre en dessous d'une

taille limite de 100 µm ce qui a pu entrainer un biais dans la quantification des microplastiques de petite taille comme suggéré par les résultats de Phuong *et al.* (2017) qui montrent que 83 % des fragments identifiés dans les moules présentent des tailles < 100 µm et ouvrent donc des perspectives d'amélioration des protocoles pour des mesures plus exhaustives et proches de la réalité environnementale.

L'analyse des données concernant les arénicoles, les crevettes, les étrilles, les crabes et les dorades est encore en cours et permettra d'apporter des éléments d'information complémentaires quant à la contamination des organismes marins présents en rade de Brest pour la fraction des microplastiques > 100 µm. En parallèle, des dosages d'additifs (7 phtalates et 8 PBDE) dans les tissus de ces individus seront réalisés au Cedre afin d'essayer de tracer indirectement l'exposition des organismes aux débris plastiques et leurs dérivés comme cela a été démontré chez des mammifères marins avec le dosage des phtalates (DEHP et MEHP) (Fossi *et al.,* 2012).

- CHAPITRE V -

Un vecteur émergent

Préambule **201**

A. Identification des communautés bactériennes associées aux microplastiques **202**

1. Introduction 205
2. Material and methods 206
   2.1. Samples collection 206
   2.2. Samples description 206
   2.3. DNA extraction and 16S amplicons sequencing 208
   2.4. Processing sequences 208
   2.5. Data analysis and statistics 209
3. Results and discussion 209
   3.1. Samples description 209
   3.2. Alpha diversity 211
   3.3. Bacterial communities colonizing microplastics 212
4. Conclusion 219

Supplementary information 220

B. Identification des contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques **222**

1. Introduction 224
2. Matériel et méthodes 227
   2.1. Collection des échantillons 227
   2.2. Description des échantillons 228
   2.3. Dosage des contaminants 229
3. Résultats 231
   3.1. Contamination des matrices environnementales 231
   3.2. Contamination chimique des microplastiques 233
4. Discussion 234
   4.1. La rade de Brest: un milieu contaminé par les HAP, PCB et pesticides 234
   4.2. Contamination chimique des microplastiques de la rade de Brest 239
5. Conclusion 242

Préambule

Les données présentées dans le précédent chapitre confirment la contamination des matrices environnementales (abiotiques et biotiques) de la rade de Brest par les microplastiques. Cependant, seule la confirmation de leur présence dans l'environnement marin ne suffit pas à établir la vulnérabilité de la rade de Brest face à ce contaminant émergent. En effet, les impacts écologiques liés aux microplastiques ne se limitent pas à leur unique présence dans l'environnement marin mais également à leur capacité à fournir un substrat pour les contaminants chimiques et un habitat pour les communautés microbiennes, et de les transporter sur de longue distance (Kiessling *et al.,* 2015; Koelmans *et al.,* 2016).

Ce cinquième chapitre a donc pour objectif d'évaluer les :

Interaction des microplastiques avec les communautés de microorganismes marins et les contaminants chimiques au sein de l'écosystème rade de Brest

Ces travaux ont permis la préparation d'un article scientifique présenté en première partie de ce chapitre qui sera soumis dans le journal *Environmental Science and Technology* courant 2017, suivi en deuxième partie d'une étude complémentaire visant à identifier les contaminants chimiques associés aux microplastiques :

- **Microplastic-associated bacterial communities in the coastal waters of the bay of Brest (Brittany, France).** Laura Frère, Lois Maignien, Morgane Chalopin, Emmanuel Rinnert, Hilary Morrison, Christophe Lambert, Arnaud Huvet, Ika Paul-Pont and Julie Reveillaud (Article in preparation).

- Inventaire à large spectre des contaminants chimiques (HAP, PCB et pesticides) associés aux microplastiques prélevés en rade de Brest.

A. Identification des communautés bactériennes associées aux microplastiques

Cet article s'attache à déterminer les assemblages bactériens de microplastiques collectés à la surface de l'eau en rade de Brest via une approche de métabarcoding. La méthode de séquençage traditionnel, qui permet uniquement le séquençage individuel d'espèces (Sanger *et al.,* 1977), n'est pas appropriée à l'étude de la complexité de l'assemblage des communautés bactériennes environnementales (Shokralla *et al.,* 2012). Dans cette étude, la méthode de métabarcoding, basée sur une méthode de séquençage nouvelle génération, à savoir le séquençage à haut-débit de courts fragment d'ADN (environ 250 pb) et permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, a été utilisée pour identifier les communautés bactériennes colonisant les microplastiques. Ces travaux ont été réalisés conjointement entre le LEMAR et le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E, Plouzané) grâce à l'appui technique et l'expertise scientifique de J. Reveillaud (maintenant INRA Montpellier) et L. Maignien (UBO). Les travaux concernant la biologie moléculaire ont été réalisés par M. Chalopin (Ifremer, LEMAR), et les analyses par spectroscopie Raman au LDCM sous la responsabilité scientifique et technique d'E. Rinnert (Ifremer, Plouzané).

Les objectifs de cet article sont : (1) identifier les taxa associés aux microplastiques flottants et présents dans la couche d'eau de surface de la rade de Brest, ainsi que (2) leur potentielle variation spatio-temporelle, et (3) tester s'il existe des différences entre les communautés bactériennes selon la famille de plastique (PE, PP et PS) et en fonction de leur classe de taille (5 - 2 mm, 2 - 1 mm and 1 - 0,3 mm). Pour cela, deux stations (la Marina et le centre de la rade) ont été échantillonnées à deux temps de prélèvement (octobre et décembre 2015). Les critères de sélection des deux stations sont les suivants : la Marina (A1-bis) est localisée dans la zone portuaire de Brest où les activités anthropiques sont intenses ; et la station localisée au centre de la rade (M1) est une zone caractérisée par la convergence (au cours du flot) des masses d'eau de surface de la rade et de la mer d'Iroise, et donc des débris flottants. Cette dernière a été identifiée comme étant la station la plus contaminée en microplastiques flottants de la rade de Brest dans les conditions de l'étude présentée dans le Chapitre IV - A (Frère *et al.,* 2017). La démarche méthodologique utilisée dans l'étude des communautés bactériennes associées aux microplastiques est présentée dans la Figure 27.

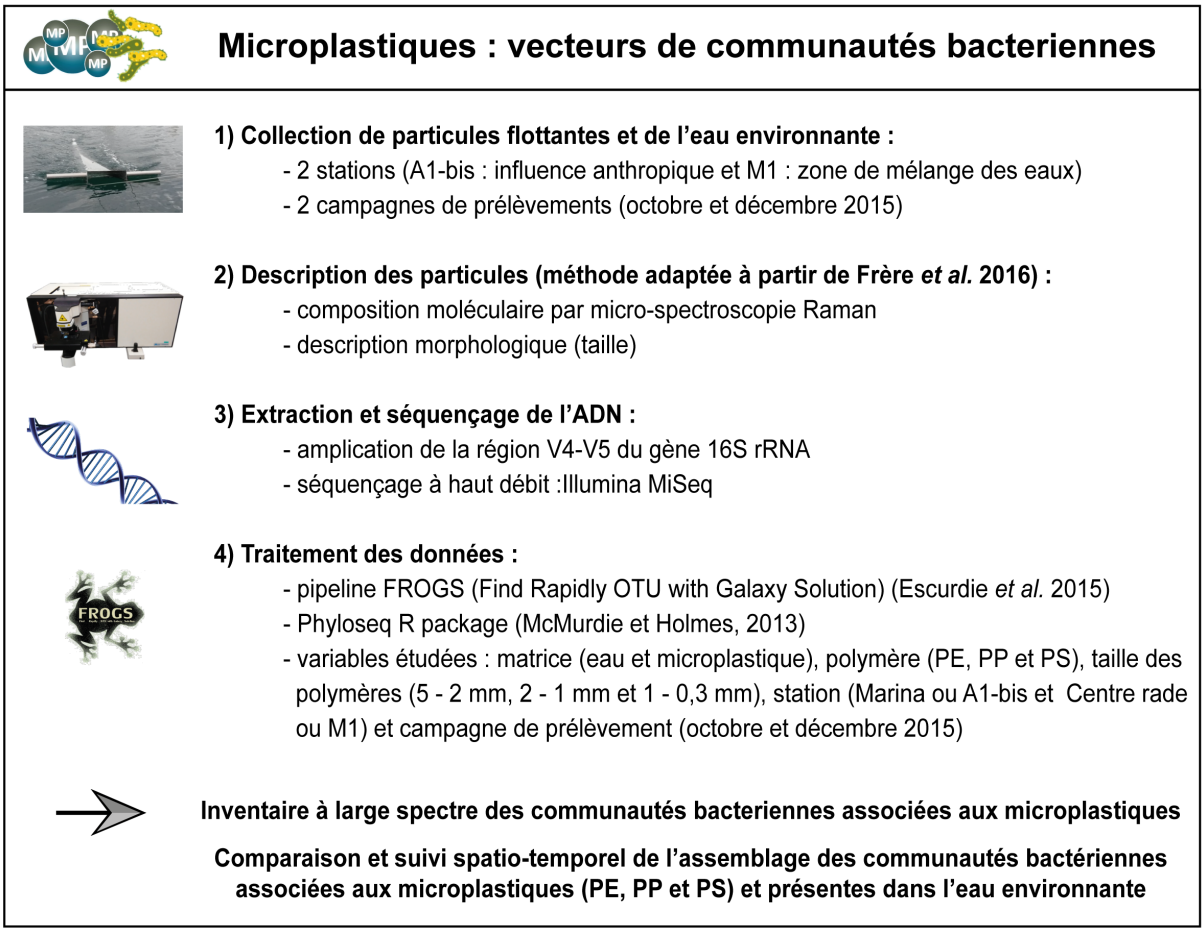


Figure 26 : Méthodologie utilisée pour identifier les communautés bactériennes associées aux microplastiques collectés dans l'environnement marin.

Les résultats ont montré que les communautés bactériennes associées aux microplastiques diffèrent de celles de l'eau de surface en termes d'abondance relative, mais également en termes de présence/absence. Les microplastiques flottants en rade de Brest représentent donc un habitat spécifique abritant des communautés distinctes de la matrice environnante. Alors qu'aucun effet de la taille des particules n'a été observé, des communautés distinctes ont été révélées sur le PS en comparaison avec le PE et le PP suggérant un effet de la nature du polymère. Une variabilité spatio-temporelle a de plus été mise en évidence pour les communautés bactériennes associées aux microplastiques, ce qui n'était pas le cas des communautés présentes dans l'eau. Ceci renforce l'idée de mécanisme d'enrichissement spécifique et le fait que les communautés colonisant les microplastiques ne soient pas simplement le reflet des communautés présentes dans l'eau environnante. Enfin, un résultat marquant de ces travaux est l'identification du genre *Vibrio* comme marqueur significatif de la matrice microplastique, ce qui soulève des questions quant au rôle de ces particules dans le transfert d'organismes nuisibles et/ou pathogènes.

Identification of bacterial communities associated with microplastics sampled in the bay of Brest.

Laura Frère, Lois Maignien, Morgane Chalopin, Emmanuel Rinnert, Hilary Morrison, Christophe Lambert, Arnaud Huvet, Ika Paul-Pont* and Julie Reveillaud*

* These authors contributed equally to this work.

Article in preparation for publication in *Environmental Science and Technology*

1. Introduction

Plastic debris, and notably microplastics (defined as plastic particles < 5mm (Arthur *et al.,* 2009) contaminate the worldwide marine habitats and organisms (Eriksen *et al.,* 2014; Lusher, 2015; Sebille *et al.,* 2015) leading to increased concerns about their ecological impacts (Rochman *et al.,* 2016). Indeed, owing to their global distribution and small size, microplastics are efficiently ingested by a wide range of marine organisms, from zooplankton (Cole *et al.,* 2011) to mollusks (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014), fishes (Foekema *et al.,* 2013) and even marine mammals (Fossi *et al.,* 2012) making their way into all marine food chains and posing a critical threat to marine organisms. Besides direct physical impacts upon microplastics ingestion (Rochman *et al.,* 2016; Sussarellu *et al.,* 2016; Wright *et al.,* 2013) and indirect toxicity related to the release of chemicals carried by microplastics (plasticizers, pigments, monomers, adsorbed pollutants) (Besseling *et al.,* 2012; Koelmans *et al.,* 2016; Paul-Pont *et al.,* 2016; Rochman, 2015), concerns are raising regarding the potential for microplastics to provide new substrates for microorganisms, and especially harmful and pathogenic ones (Kirstein *et al.,* 2016; Lusher, 2015; Maso *et al.,* 2003).

The first mention of plastic debris being colonised by microorganisms (for instance diatoms and bacteria) was done by Carpenter and Smith (1972). For the past decade several field studies have demonstrated that plastic debris and microplastics provide a novel substrate for habitat and transport of a wide range of marine organisms. Microplastic-associated rafting communities were observed to be composed of macrobenthic organisms such as arthropods, mollusks, bryozoans and cnidarians (Bryant *et al.,* 2016; Goldstein *et al.,* 2014) and eukaryotic microorganisms such as dinoflagellates, diatoms, invertebrate eggs and fungus (Maso *et al.,* 2003; Oberbeckmann *et al.,* 2014; Reisser *et al.,* 2014); thus raising question about the transfer of potentially invasive rafting taxa to pristine ecosystems (Galgani *et al.,* 2013). For instance Maso *et al.* (2003) identified harmful dinoflagellates (*Ostreopsis* sp. and *Coolia* sp.) attached to drifting plastic debris. Colonization of plastic debris and microplastics by prokaryotes has also been shown in various environments from freshwater to seawater, marine sediments and beaches (reviewed in Oberbeckmann *et al.,* 2015). All these studies demonstrated a high diversity and richness of microorganisms colonizing microplastics, constituting a unique marine environment called the “Plastisphere” (Zettler *et al.,* 2013). In addition, bacterial families harboring well-known human, fish and shellfish pathogenic strains (Vibrionaceae, Campylobacteraceae) have been regularly detected on microplastics (Kirstein *et al.,* 2016; Schmidt *et al.,* 2014; Zettler *et al.,* 2013). As a consequence there is a call for more research to understand the spatiotemporal patterns of plastic colonizing microorganisms and the ecological risks for marine ecosystems, food safety and public health (GESAMP, 2016; Harrison *et al.,* 2011). Experimental studies are a way of understanding the adhesion dynamics and temporality of interaction between couples of microorganisms and microplastics (Foulon *et al.,* 2016) completing *in situ* studies needful

for understanding the complex dynamic processes of surface colonizers in various aquatic environment (Harrison *et al.,* 2014; Oberbeckmann *et al.,* 2015).

In this context, the aim of the present study was to investigate microplastic-associated bacterial communities collected in the coastal ecosystem of the bay of Brest (Brittany, France). The bay of Brest was recently studied for microplastic contamination; the mean concentration was estimated around 0.24 microplastic.m^{-3} dominated by polyethylene, polypropylene and polystyrene micro-particles (Frère *et al.,* 2017). In this study, bacterial communities were analyzed on floating microplastics collected during two sampling surveys and at two stations in the bay of Brest using 16S rRNA gene amplicon sequencing to investigate: (a) taxa associated to microplastics compared to taxa identified in the surrounding seawater in the bay of Brest as well as (b) their potential temporal and spatial variations (c) according to commonly detected polymer families (polyethylene or PE, polypropylene or PP and polystyrene or PS) and as a function of microplastic size ranges (5-2 mm, 2-1 mm and 1-0.3 mm).

2. Material and methods

2.1. Samples collection

Sample collection was conducted in the bay of Brest (Brittany, France) during two sampling surveys conducted on the 21st October 2015 and the 9th December 2015. Two sites were sampled: Site A1 bis was located close to a recreational marina in an area subjected to intense anthropogenic activities (48°22'41.06"N, 4°29'22.60"W) and site M1 was located in the center of the bay (48°20'34.59"N, 4°30'6.29"W) in an area characterized by the occurrence of a transitional vortex created by surface current at flood tide (Frère *et al.,* 2017; Monbet and Bassoulet, 1989). As most floating debris coming from the north and the south of the bay tend to converge in this area at flood tide (Frère *et al.,* 2017), microplastics sampled at this site are representatives of those discharged in the bay. Samples were collected at surface water (top 20 cm) using a Manta trawl (335 µm mesh, rectangular net opening of 0.6 x 0.16 m) aboard the research vessel Hesione, and then stored in glass jar (previously sterilized) on board at room temperature prior to microplastic extraction. Three liters of seawater were also collected close to sampling station and filtered through 0.22 µm Sterivex filters in sterile conditions. Filters were stored at -20 °C prior to DNA extraction.

2.2. Samples description

Treatment of micro-particles, conserved in sterile conditions throughout their manipulation from sampling to DNA extraction, was realized within 10 hours after sample collection. Micro-particles

extraction was performed manually using forceps and a dissecting microscope under sterile conditions. All material (petri dish, filter, forceps) was sterilized, and forceps were systematically rinsed in milliQ water and in 10 % chlorine solution between manipulations of each micro-particles. Visually identified micro-particles particles were individually rinsed with sterile milliQ water before being stored in sterile WillCo-dish glass dishes at -20 °C until spectroscopy analysis. Microplastic molecular composition was identified by Raman micro-spectroscopy using the method developed by (Frère *et al.,* 2016), adapted here due to the need to maintain sterile conditions: extracted particles were kept in closed sterile WillCo-dish glass dishes exhibiting a top thin glass slide (0.17 mm width) and spectroscopy analyses were realized through this glass slide. Preliminary manipulations have ensured that the Raman signal was not affected by the glass slide (data not shown). To investigate the bacterial communities associated to microplastic, collected micro-particles at the two dates (October and December 2015), at the two stations (A1 bis and M1) were first analyzed and isolated based on their polymer family (polyethylene or PE, polypropylene or PP and polystyrene or PS) before being pooled according to size range: 5-2 mm / 2-1 mm / 1-0.3 mm. To do so, higher number of particles were used for the 1 - 0.3 mm range (n=20 particles per pool) as compared to the 2 – 1mm range (n=8 particles per pool) and 5 – 2 mm (n=4 particles per pool). A total of 1 to 5 pools were done according to the available number of particles in each category. Finally, the bacterial communities were investigated on a total of 47 pools of MP as well as 12 samples of seawater filtered (Table 1). Pools were stored in 2 ml tube at -20°C prior to DNA extraction.

Table 1: Description of the sampling design in the bay of Brest (seawater and microplastics) and composition of the microplastics pools (x47) and seawater samples (x12) used for bacterial communities analysis. (PE: polyethylene, PP: polypropylene, PS: polystyrene).

Survey	Station	Sample type	Polymer	Size range (number of pool)	Volume
October 2015 (n=27)	A1 bis (n=22)	Seawater (n=3)			3 x 1 l
		Microplastic (n=19)	PE (n=10)	5 - 2 mm (n=4)	
				2 - 1 mm (n=4)	
				1 - 0.3 mm (n=2)	
			PP (n=5)	5 - 2 mm (n=2)	
				2 - 1 mm (n=2)	
				1 - 0.3 mm (n=1)	
			PS (n=4)	5 - 2 mm (n=1)	
				2 - 1 mm (n=2)	
				1 - 0.3 mm (n=1)	
	M1 (n=5)	Seawater (n=3)			3 x 1 l
		Microplastic (n=2)	PE (n=1)	2 - 1 mm (n=1)	
			PS (n=1)	1 - 0.3 mm (n=1)	

December 2015 (n=32)	A1 bis (n=27)	Seawater (n=3)			3 x 1 l
		Microplastic (n=24)	PE (n=14)	5 - 2 mm (n=5)	
				2 - 1 mm (n=5)	
				1 - 0.3 mm (n=4)	
			PP (n=5)	5 - 2 mm (n=2)	
				2 - 1 mm (n=1)	
				1 - 0.3 mm (n=2)	
			PS (n=5)	5 - 2 mm (n=2)	
				2 - 1 mm (n=1)	
				1 - 0.3 mm (n=2)	
	M1 (n=5)	Seawater (n=3)			3 x 1 l
		Microplastic (n=2)	PE (n=2)	5 - 2 mm (n=1)	
				2 - 1 mm (n=1)	

2.3. DNA extraction and 16S amplicons sequencing

DNA isolation from microplastic and seawater samples was done with a bead-beating approach in combination with a phenol/chloro/alcohol iso extraction. Bacterial community assemblages were determined using next-generation amplicon sequencing of the 16S rRNA gene. PCR amplification was performed using a combination of forward primer 518F and three reverse primer 926R to amplify the V4 - V5 hypervariable region on the 16S rRNA gene, fused to barcodes compatible with Illumina MiSeq (Nelson *et al.,* 2014). The resulting amplicons were sequenced in a paired-end format using the Illumina MiSeq platform of the Marine Biological Laboratory (Woods Hole, Massachusetts, United States).

2.4. Processing sequences

Data were demultiplexed and barcodes were clipped off the reads by the sequencing provider. Sequences were filtered, clustered and assigned with the FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) using the platform Galaxy (Escudie *et al.,* 2015). Briefly, paired-end reads were merged using Flash (1.2.11) with an overlap length of 90 pb and a minimum length of 340 pb. Next, sequences were filtered using Cutadapt (1.7.1) to remove primers and using UCHIME (v7) of USEARCH package (1.1.3) to remove chimeras (Edgar, 2010). Dereplication was used to group strictly identical sequences using a homemade script.

SWARM (1.2.2) was used for clustering reads into operational taxonomic units (OTU) with a first run including an aggregation distance equal to 1 (i.e. high OTU definition linear complexity) and a second run with an aggregation distance equal to 3 on the seeds of the first SWARM quadratic complexity (Mahé *et al.,* 2014). Representative sequences were aligned using NCBI Blast+ (2.2.29) with the database SILVA 123 (Camacho *et al.,* 2009). Singletons were excluded for downstream analyses.

2.5. Data analysis and statistics

Venn diagrams were generated using the R packages Vegan and Venn diagram, respectively (R Core team, 2015). For subsequent analyses, read counts were divided by the total number of reads in each sample to compensate for differential sequencing depth in each sample.

Alpha diversity based on observed numbers of OTU, species richness, and Shannon and Simpson diversity indices were calculated for each sample type (microplastic and seawater). One-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the effect of sample types on microbial diversity (Chambers *et al.,* 1992) and Tukey HSD (honest significant difference) test was used for pairwise comparisons.

Beta-diversity analyses were done using the R packages ggplot2 and phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013). Bacterial assemblages of microplastics (PE, PP and PS) and seawater samples were represented by mean relative (% ± standard deviation) and compared using the Jaccard and Bray-Curtis diversity indices. Results of distance matrix were visualized using nonmetric multidimensional scaling (nMDS). Statistical comparison of bacterial communities between sample types, stations and surveys was done by permutational multivariate analysis (PERMANOVA) of variance using distance matrices using the R package vegan (Anderson, 2001).

The potential presence of taxonomic groups (i.e., biomarkers) that may explain the difference between bacterial communities in different sample was explored with LEfSe (Segata *et al.,* 2011) in Galaxy framework. The linear discriminant analysis (LDA) effect size allows to identify statistically significant groups characterized by their degree of consistency in relative abundance together with their effect relevance, in each sample class (Segata *et al.,* 2011).

3. Results and discussion

3.1. Samples description

After quality filtering and chimera checking of the initial 21,660,493 reads, 8,055,314 reads were retained (mean reads per sample = 136,530), ranging from 34,984 to 324,667 reads in samples MP004 (PE, 5 - 2 mm, station A1 bis, December 2015) and MP023 (PP, 1 - 0.3 mm, station A1 bis, December

2015), respectively. High-quality sequences were clustered into 1,548 operational taxonomic units (OTU) with 1,395 for seawater samples and 1,540 for microplastic samples when both sampling surveys were considered. Microplastic samples presented rarefaction curves with a stationary phase meaning sufficient depth of sequencing to account for most of the taxa amplified in microplastic and seawater matrices (Figure SI-1). Microplastic-associated bacteria were predominantly (around 90 %) composed of rare OTU (abundance < 0.01 %) whereas abundant OTU (abundance > 1 %) were rare in all sample types (around 4 %). Microplastics and seawater shared a high number of OTU as 78 ± 4 % of the OTU recorded on microplastics were shared with seawater, and 98 ± 0.04 % of the OTU identified in seawater were shared with microplastics (Figure 1). The fraction of shared OTU was much higher compared to a previous study which found only 3.5 to 8.6 % of OTU shared between microplastics and surrounding seawater (Zettler *et al.,* 2013). This great difference in proportion of shared OTU might be explained the residence time of microplastics in seawater before being collected depending on distances of sources and hydrodynamic characteristics of the different environments studied here and in Zettler *et al.* (2013). They conducted their survey in the North Atlantic Gyre where the collected microplastics have likely been colonized within a few days upon the entry into the aquatic environments (Oberbeckmann *et al.,* 2015) i.e. months to years (Koelmans *et al.,* 2016) before ending up in the oligotrophic oceanic waters of the Gyre characterized by distinct bacterial assemblages. On contrary our study was conducted in a coastal ecosystem where the local surrounding seawater has likely provided most of the bacterial communities identified on collected microplastics, thus explaining the high proportion of shared OTU. In addition, water from both studies were filtered on 0.2µm sterivex filters, but oligotrophic oceanic waters are characterized by low proportion of suspended matter as compared to eutrophic coastal waters. Therefore, the fraction analysed on filters may be different for the two studies, i.e. mostly free living communities in Zettler *et al.* (2013) vs. free living and particle associated communities in our study. As microplastic bacterial communities may resemble particle associated communities (Oberbeckmann *et al.,* 2016), this could be responsible for the higher number of shared OTU between seawater and microplastics here. Microplastics presented a larger number of unique OTU (n = 335 ± 60 OTU; 10 to 25 % of the total identified OTU) than seawater, exhibiting few unique OTUs (n = 27 ± 1 OTU; 2 % of the total identified OTU) (Figure 1). Presence of unique OTU on microplastics reflects the specificity of this substrate. Among the unique microplastic OTU, 94 ± 4 % were shared between PE, PP and PS, and 0.2 to 1.6 % were specific to each of the three polymer families (PE, PP and PS) (Figure 1). Fraction of shared OTU between polymers was higher compared to the 30 to 40 % found between PE (n=3) and PP (n=3) in the study of Zettler *et al.* (2013), which could be due to the microplastics life history upon their entrance in marine waters: microplastics collected closed to the source as done in the bay of Brest and more recently colonized may exhibit more uniform assemblages. Overall, the high proportion of shared OTU among polymers observed here suggests a “core” of bacteria characterizing the plastic substrate, regardless of the polymer type, asobserved in Zettler *et al.* (2013).

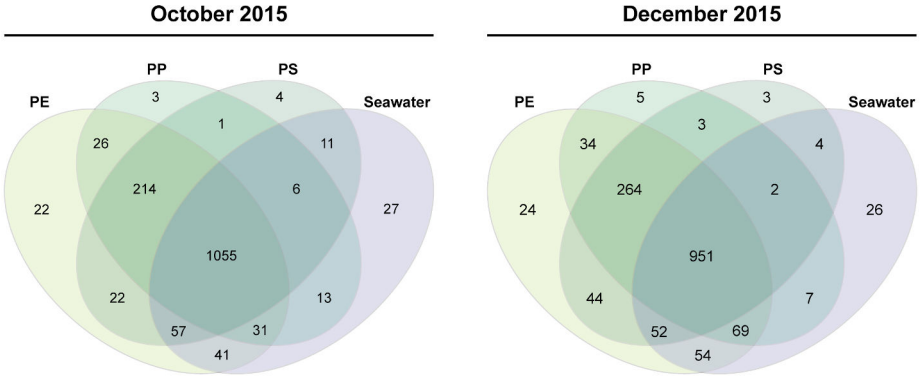


Figure 1: Shared and specific OTU between all sample types (PE, PP, PS and seawater) in October 2015 and December 2015.

3.2. Alpha diversity

For both surveys, microplastic bacterial communities richness were significantly higher than seawater bacterial community (*p-value* = <0.001 and 0.006, respectively), which may reflect the colonization process and the formation of a biofilm, often characterized by complex microbial competition and increased species richness (Datta *et al.,* 2016; Jackson *et al.,* 2001). In October, microplastic bacterial communities showed a significantly higher evenness than seawater (Table 2) which reflects the low proportion of abundant OTU on the plastic matrix. Zettler *et al.* (2013) consistently found also a higher evenness on plastics compared to surrounding seawater. The authors hypothesized that this was due to the oligotrophic characteristics of offshore oceanic water known to support a high degree of rare taxa, partly due to lower grazing and viral pressures, however this was not the case here. On the opposite, no significant difference of evenness was observed between microplastics and seawater in December.

Among polymer families (PE, PP and PS), no significant difference of alpha diversity was observed in October, while PS collected in December showed a significant greater evenness than PE (Tukey HSD test, *p-value* = 0.024) (Table 2).

Table 2: Results of alpha diversity measures among sample types (PE, PP, PS and seawater) (P-values < 0.05 are highlighted in bold and marked with *). The species richness was estimated using the number of observed OTU and the evenness of the species abundance distribution was measured with Shannon and Simpson indices.

Subset	Factor	Indice	Df	Sum of squares	F	p(perm)
October	Matrix (microplastics and seawater)	Observed	1	850,205	15.6	**< 0.001 * (**sw < MP)
		Shannon	1	3.719	9.091	**< 0.001 *** (sw < MP)
		Simpson	1	0.0014	0.887	0.053
	Polymers (PE, PP and PS)	Observed	2	33,029	0.345	0.729
		Shannon	2	0.061	0.059	0.900
		Simpson	2	0.001731	0.52	0.546

December	Matrix (microplastics and seawater)	Observed	3	241,065	6.9	**0.006 *** (sw < MP)
		Shannon	3	1.226	1.232	0.065
		Simpson	3	0.0052	0.418	0.962
	Polymers (PE, PP and PS)	Observed	2	55,769	0.692	0.511
		Shannon	2	9.092	5.048	**0.029 ***
		Simpson	2	0.08234	3.271	0.073

3.3. Bacterial communities colonizing microplastics

3.3.1. Microplastic: distinct bacterial habitat

For both sampling surveys, the bacterial communities structure were different between microplastic and the surrounding seawater as showed by separate clustering in the nMDS plot (Figure 2). This result was confirmed by statistical analyses using Bray-Curtis (PERMANOVA, *p-value* = 0.001 for October and 0.001 for December) (Table 3) as well as for the Jaccard dissimilarity index (PERMANOVA, *p-value* = 0.001 for October and 0.001 for December) (Figure SI-2). Microplastics collected in the bay of Brest thus represented a distinct bacterial habitat in marine environment compared to seawater. This was demonstrated for plastics collected in urban freshwater ecosystems (Hoellein *et al.,* 2014; McCormick *et al.,* 2014), in North Atlantic and North Pacific oceans (Amaral-Zettler *et al.,* 2015; Zettler *et al.,* 2013) and for plastics incubated several days/weeks in coastal waters and sediments (Harrison *et al.,* 2014; Oberbeckmann *et al.,* 2014). However, in the present study caution was taken to not use the term "Plastisphere" as in Zettler *et al.* (2013) because the clear distinction between bacterial assemblages associated with microplastics vs. other type of particles (organic, inorganic) was not determined here. For instance, Oberbeckmann *et al.* (2016) demonstrated that even though PET-attached bacterial communities were distinct from free-living seawater communities, they were similar to other types of particle-associated or glass-attached communities collected in the surrounding seawater (with the exception of some unique OTUs identified on PET). This result raises questions regarding the potential non-specificity of microplastics colonizing bacteria as compared to other types of substrates in marine environments. In the present study, collected seawater was filtered on 0.22 µm filters which concentrated both free-living (3 - 0.22 µm) and particle-associated bacterial communities (> 3 µm), making the discrimination of both fractions not possible. To ascertain whether the main driver for microplastic microbial community structure is the availability of a surface or the specific nature of plastic polymers, more experiments are needed. In the present study, size and therefore surface area did not appear as a main factor in shaping microplastic bacterial communities (no significant difference in terms of OTU specificity and diversity between size ranges). Further *in situ* surveys are thus required (i) focusing on analysis of bacterial communities

in different water fractions and particles (organic, mineral, plastic), and (ii) experimental incubations of different substrates and polymer types over short (days) and long (weeks) terms.

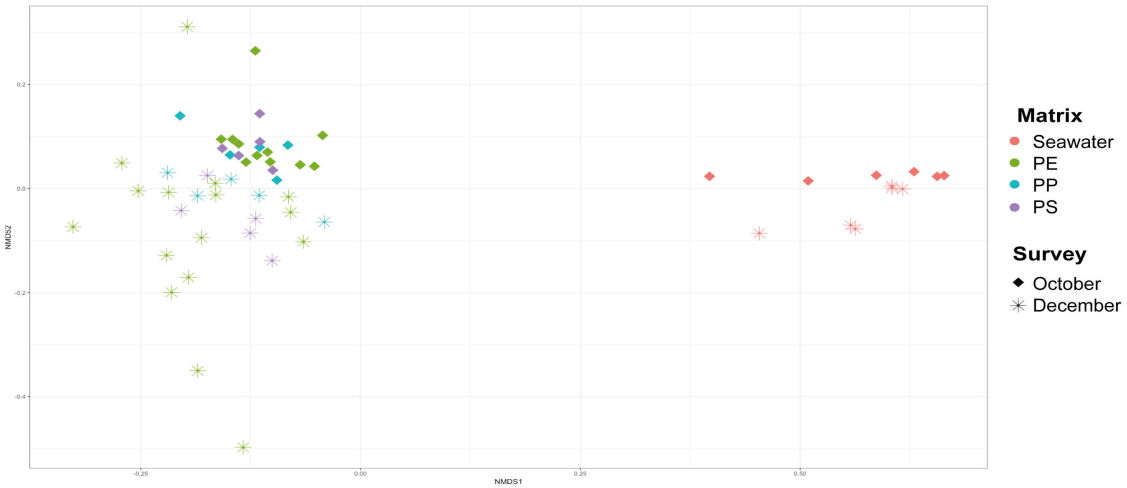


Figure 2: nMDS plot comparing OTUs of bacteria in all sample types (PE, PP, PS and seawater) during October and December 2015 (Bray-Curtis dissimilarity index).

Table 3: PERMANOVA results (Significant results (p<0.05) were written in bold and marked with *).

Subset	Factor	Df	Sum of squares	Pseudo F	R2	p(perm)	Unique perm
All samples	Matrix (microplastic :seawater)	1	5.43	22.16	0.27	**0.001 ***	999
- October	Matrix (microplastic :seawater)	1	3.34	23.17	0.48	**0.001 ***	999
- December	Matrix (microplastic :seawater)	1	2.77	10.46	0.26	**0.001 ***	999
Seawater	Survey (October :December)	1	0.40	5.32	0.35	**0.014 ***	999
- October	Station (A1 bis :M1)	1	0.18	6.91	0.63	0.1	999
- December	Station (A1 bis :M1)	1	0.44	41.33	0.91	0.1	999
Microplastic	Survey (October :December)	1	2.02	8.42	0.16	**0.001 ***	999
	Size (0.3-1 :1-2 :2-5 mm)	2	0.51	0.92	0.04	0.583	999
- October	Polymer (PE, PP, PS)	2	0.43	1.33	0.13	0.122	999
	Station (A1 bis :M1)	1	0.39	2.51	0.12	**0.035 ***	999
- December	Polymer (PE, PP, PS)	2	0.92	1.63	0.12	**0.015 ***	999
	Station (A1 bis :M1)	1	0.73	2.60	0.10	**0.013 ***	999
PE	Survey (October :December)	1	1.29	4.93	0.16	**0.001 ***	999
- October	Station (A1 bis :M1)	1	0.51	3.87	0.30	0.111	999
- December	Station (A1 bis :M1)	1	0.75	2.57	0.15	**0.018 ***	999
PP	Survey (October :December)	1	0.57	3.11	0.28	**0.008 ***	999
PS	Survey (October :December)	1	1.00	5.09	0.22	**0.001 ***	999

At the phylum level, bacterial communities of all sample types (microplastics and seawater) were dominated by Proteobacteria (60.72 ± 5.41 %), Bacteroidetes (20.58 ± 4.64 %) and Cyanobacteria (9.09 ± 7.40 %). Microplastics were mainly colonized by Alpha- and Gammaproteobacteria (Proteobacteria, 17.67 ± 5.28 % and 40.76 ± 8.43 %, respectively) which were shown to act as primary colonizers, and Flavobacteria (Bacteroidetes, 16.83 ± 2.64 %) which appeared to act as secondary colonizers (Lee *et al.,* 2008; Oberbeckmann *et al.,* 2015). It is noteworthy that some authors used the relative abundances of Alpha- and Gammaproteobacteria and Bacteroidetes on microplastics as a proxy of biofilm formation stage (De Tender *et al.,* 2015). No significant pattern of this proxy was revealed here (data not shown) but it could be interesting to implement such analysis when collecting plastics over larger space (distance to the coast) or time scales.

At the family level, Flavobacteriaceae and Rhodobacteraceae were identified in relatively high abundance in all sample types (microplastics and seawater) with 16.06 ± 1.23 % and 13.40 ± 4.03 %, respectively. The families of Vibrionaceae (9.88 ± 8.27 %) and Pseudoalteromonadaceae (8.24 ± 6.95 %) were commonly found in microplastic samples but rarely observed in seawater community (0.05 % and 0.02 % respectively) (Figure 3). Both families were similarly found on marine plastic litter collected along the Belgian coast while rarely observed in surrounding seawater and sediments (De Tender *et al.,* 2015). The Vibrionaceae family was also consistently represented on PET bottles across three different seasons (winter, spring, summer) in a study conducted off the East coast of England in the North Sea (Oberbeckmann *et al.,* 2016). Focusing on the Pseudoalteromonadaceae family it is interesting to see that the genus *Pseudoalteromonas* was previously detected on plastics, whether as a specific OTU found on PP and PE but not in seawater (Zettler *et al.,* 2013) or as a dominant genus on PET bottles (Oberbeckmann *et al.,* 2014, 2016). This genus is known as a hydrocarbon degrader (Lin *et al.,* 2009) and has often been observed associated with marine algae. Regarding seawater bacterial communities, Surface 1 and SAR 11 clade (unclassified family) were commonly found (20 ± 5.55 % and 8.93 ± 6.46 % respectively) in the different samples but were present in much smaller abundance in microplastic samples (0.01 % and 0.02 ± 0.01 % respectively) (Figure 3).

At the genus level, a LEfSe analysis showed that *Litoreibacter* and *Vibrio* were biomarkers of microplastics, while *Candidatus Actinomarina*, *Synechococcus*, Family (unknown genus), *Owenweeksia*, *NS3 marine group* and *NS5 marine group* were biomarkers of seawater. Interestingly, the genus *Vibrio* has been very frequently detected in association with plastic debris for the past few years (Kirstein *et al.,* 2016; Oberbeckmann *et al.,* 2016; Schmidt *et al.,* 2014; Zettler *et al.,* 2013). This genus was also dominant (24%) on a PP collected in the North Atlantic (Zettler *et al.,* 2013). Vibrios are ubiquitous marine bacteria belonging to diverse ecological populations that are ecologically and metabolically different and pursue different lifestyles in the water column (free living, particle and animal-associated) (Le Roux *et al.,* 2016). As the vibrio genus comprises numerous pathogenic species for human, fish and shellfish, and some of which (*V. coralliilyticus, V.*

harveyi, V. splendidus, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus and V. fluvialis) have been detected on microplastics (Kirstein *et al.,* 2016; Schmidt *et al.,* 2014), there is some concerns that the ever-increasing microplastic contamination in marine environment may influence their population dynamics and ultimately pathogen emergence. For instance, rapid growth of vibrios has been observed in association with diatom bloom or algae proliferation (Gilbert *et al.,* 2012; Nealson and Hastings, 2006) suggesting the importance of substrate and habitat occurrence on particle-associated vibrios dynamic in the marine environment. In our study, the genus *Vibrio* was recovered in high abundance in microplastic samples (1.50 to 18.57 %) and was discriminant for this matrix, however it could not be assigned to a specific species because the sequence shared 100 % identity with several *Vibrio* species such as *V. splendidus*, *V. atlanticus*, *V. tasmaniensis* or *V. aestuarianus*. As a consequence, more in-depth analyses such as PCR using specific primers targeting specific species and/or pathogenicity markers are currently in progress to clarify the involvement of potential pathogenic species in the colonization of microplastics in the bay of Brest.

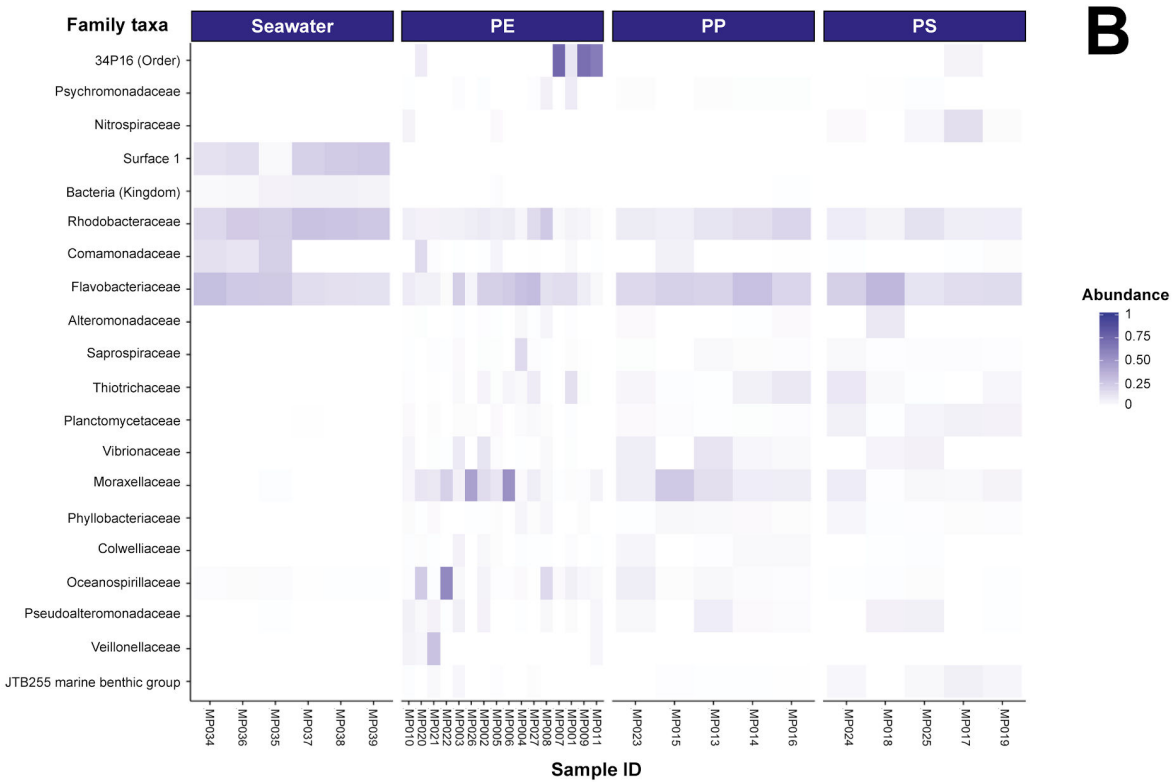


Figure 3 : Heatmap of the 20 dominants bacterial families relative abundance in the different sample types (PE, PP, PS and seawater) during October 2015 (A) and December 2015 (B).

3.3.2. Distinct bacterial habitat according to polymer family

The microplastic bacterial community composition was significantly influenced by the polymer family as demonstrated by the PERMANOVA analysis with PS presenting a distinct bacterial community to those of PE and PP in December 2015 (PERMANOVA, *p-value* = 0.013 and *p-value* = 0.017, respectively) (Table 3).The distinct bacterial communities on PS in December may be explained by different structure and chemical load on PS than PE and PP. Difference of structural and/or chemical (plasticizers, dyes) properties observed among polymer families is indeed likely to influence bacterial communities and dynamics (De Tender *et al.,* 2015) even though studies specifically addressing this point are still lacking (Oberbeckmann *et al.,* 2015). Similarly, PS was also found to be distinct from PE and PP in terms of community, assemblage and structure in earlier studies conducted in the Atlantic and Pacific oceans (Zettler *et al.* 2015 ; Carlson *et al.* 2013, respectively). No difference between PP and PE was demonstrated as also observed in the study conducted by De Tender *et al.* (2015) along the Belgian coast.

Results of the LefSe analysis on polymer family showed that the Bacteria kingdom and the *Litoreibacter* genus were biomarkers of PS and PP, respectively. No biomarker was shared for PE between October and December. The genus *Litoreibacter* (Alphaproteobacteria) was first isolated in 2011 from an internal tissue of a marine snail (Umbonium costatum ; Gastropoda, Trochidae) and from the surrounding shallow sediment in the sea of Japan (Russia) (Romanenko *et al.,* 2011). Although some *Litoreibacter* species have later been isolated from sea sand (Riedel *et al.,* 2013) and gold sea squirt (Kim *et al.,* 2013) very little information is available regarding the ecologic and metabolic features of this genus. Representatives of this taxon are known to be metabolically versatile, mostly found in coastal waters, as free-living bacteria or in symbiosis with marine phytoplankton, invertebrates, and vertebrates, but this is to our knowledge the first report of the genus *Litoreibacter* being strongly associated to the microplastic matrix (especially on PS and PP).

3.3.3. Spatiotemporal variability in bacterial communities composition

- **Temporal variability**

Bacterial assemblages were different across surveys (October and December 2015) for all sample types (microplastics and seawater) (Figure 2, PERMANOVA, *p-value* = 0.004 for seawater, *p-value* = 0.001 for microplastics) (Table 3). Temporal variability in bacterial assemblages associated to microplastics was also found in previous studies conducted in freshwater ecosystems (Hoellein *et al.,* 2014), and coastal ecosystems (Hoellein *et al.,* 2014; Lee *et al.,* 2008; Oberbeckmann *et al.,* 2014). As a consequence, different taxonomic group significantly discriminated the microplastic matrix and the seawater bacterial communities according to sampling date. LefSe analysis showed that the Sphingomonadales order and *Psychoserpens* genus were biomarkers of microplastics in October whereas Bacilli (Firmicutes) and *Tenacibaculum, Leucothrix, Oleibacter* and *Psychomonas genera* were biomarkers in December (Figure 4). The phylum Firmicutes is typically related to sewage-associated bacteria (e.g. *Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Staphylococcus* and *Streptococcus* genera) (Oberbeckmann *et al.,* 2015).

For seawater samples SAR11 clade order, SAR406 clade (unknown genus) and Planctomycetacaea (unknown genus) were biomarkers in October whereas SAR116 family, OM43 clade (unknown genus) and *Roseibacillus* genus were biomarkers in December 2015 (Figure 4).

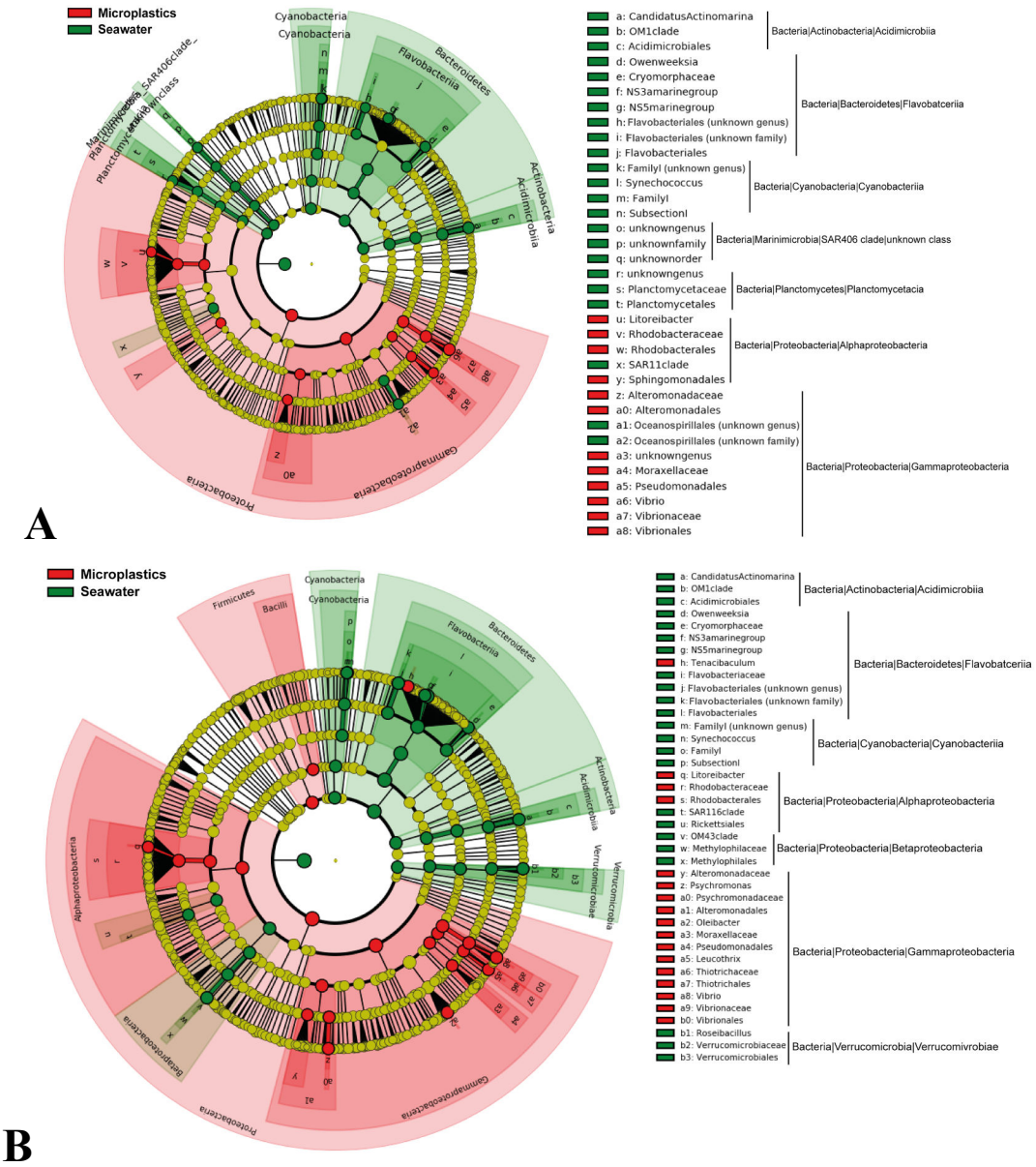


Figure 4 : Cladogram of LefSe results according to sample types (microplastics and seawater) for samples collected in October 2015 (A) and December 2015 (B).

Only PE samples showed a biomarker in October 2015, the Pseudomonadales order. In December 2015, Oceanospirillales order and *Propionispira* genus were biomarkers of PE, the Alphaproteobacteria class was biomarker of PP and the Holophagae order (Acidobacteria), Rhodospirillaceae family and *Roseovarius* and *Nitrosomonas* genera were biomarkers of PS.

- **Spatial variability**

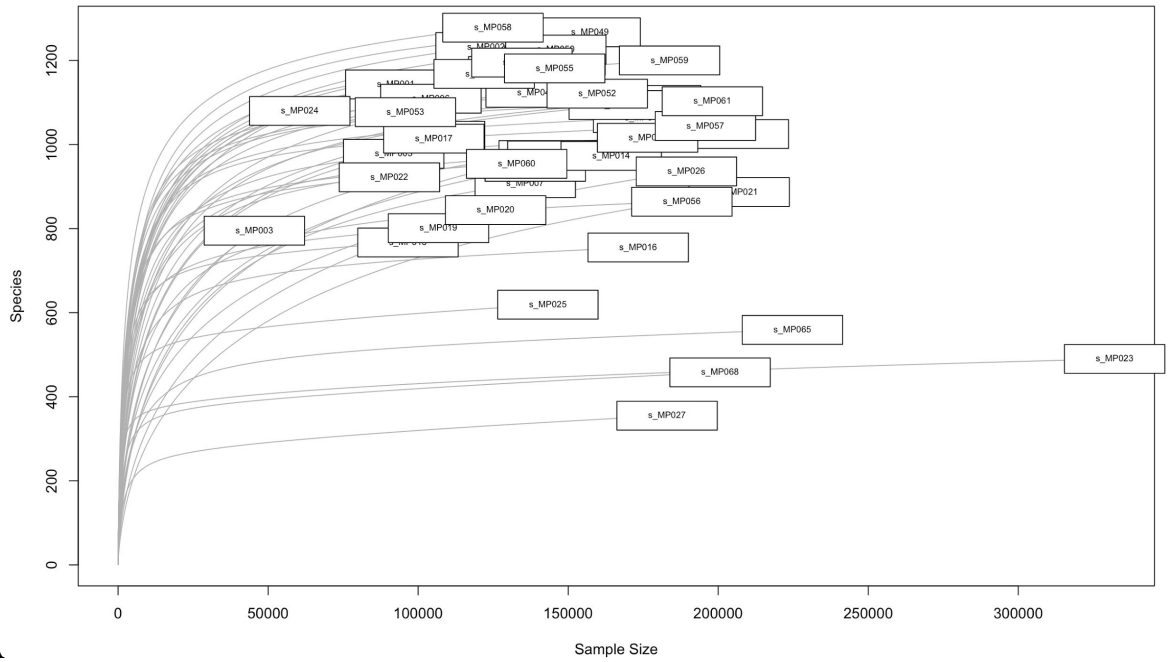
PERMANOVA analyses showed a small but significant difference in bacterial communities composition between A1 bis and M1 in December. The M1 station was dominated by the Moraxellaceae family (42.3 %) and the *Psychrobacter* genus (41.7 %) while station A1 bis was dominated by the 34P16 order (Gammaproteobacteria, unknown family and genus) (16.4 %).

Although caution must be taken to interpret these data due to the low sample size in M1 as compared to A1 bis (Table 1), the spatial variability in plastic-associated communities observed here is in accordance with previous studies conducted in the North Sea (Oberbeckmann *et al.,* 2015) and in the North Pacific and North Atlantic Oceans (Amaral-Zettler *et al.,* 2015). Interestingly, no spatial difference in bacterial community structure were observed for the surrounding seawater even though both sites were selected in contrasted environments (in a recreational marina vs. in the centre of the bay where most of the mixing of fresh and oceanic water occurs). This suggests that the distinct bacterial community structure observed on PE between October and December does not necessarily reflect differences in the surrounding environment and that distinct taxon are selected and enriched from the colonizing pool as a function of the substrate and site. On another hand, De Tender *et al.* (2015) discussed the microplastic-associated bacterial community dynamics in regards to several measured environmental parameters (salinity, temperature, turbidity, oxygen content, oxidation-reduction potential, seawater density and total organic and inorganic carbon content of the underlying sediment) that they found to be correlated with the spatial difference in bacterial community structure associated to marine plastic debris. In our study no environmental parameters were monitored therefore such inference cannot be made.

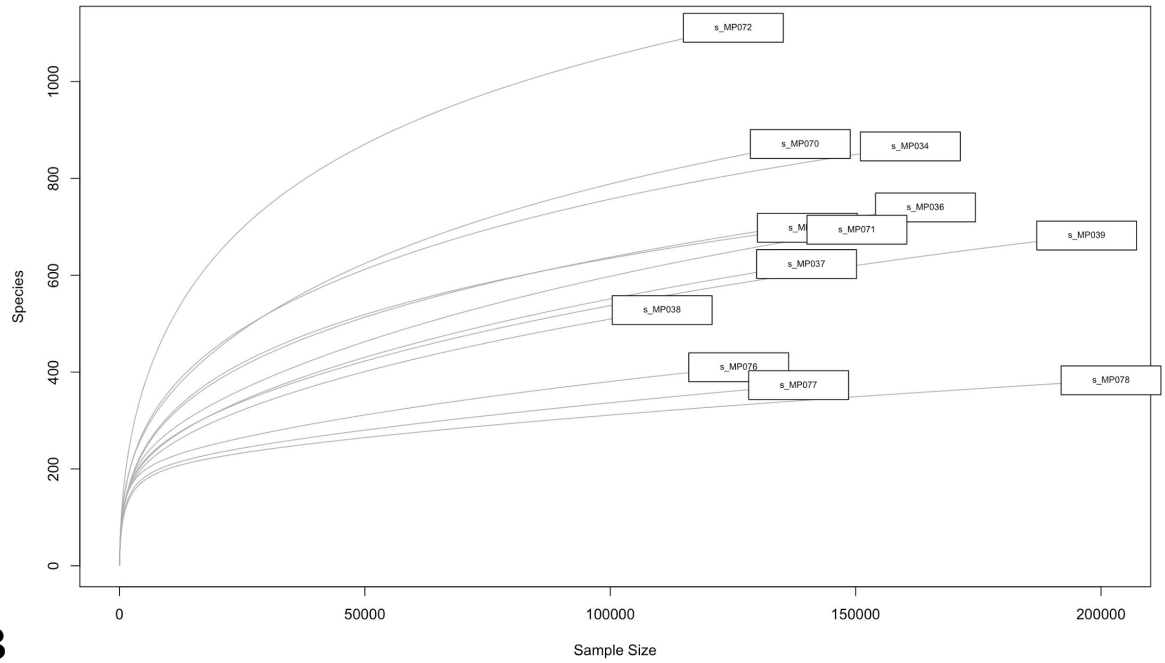
4. Conclusion

Microplastic bacterial biofilm assemblages differed from surrounding seawater in the bay of Brest. The Vibrio genus was enriched in the microplastic matrix raising questions about the role of microplastics on pathogenic species transport and potential emergence. Microplastic-associated bacterial assemblages were also influenced by spatiotemporal factors affecting the colonizing pool and to a lesser extent by polymer family, while no effect of microplastic size was demonstrated here. Further *in situ* and laboratory studies focusing on (i) the substrate specificity (plastic polymer *vs.* other types of organic and mineral suspended particles), (ii) the enrichment for naturally occurring pathogens (bacteria and viruses) and its consequence on pathogen population dynamics, and (iii) the identification of environmental parameters shaping the microplastic bacterial communities over space and time are required to better understand the patterns of microplastic contamination in marine ecosystems and their ecological consequences.

Supplementary information



A



B

Figure SI-1 : Rarefaction curve for 16S rDNA sequences calculated for each microplastic (A) and seawater (B) samples based on the OTU computations.

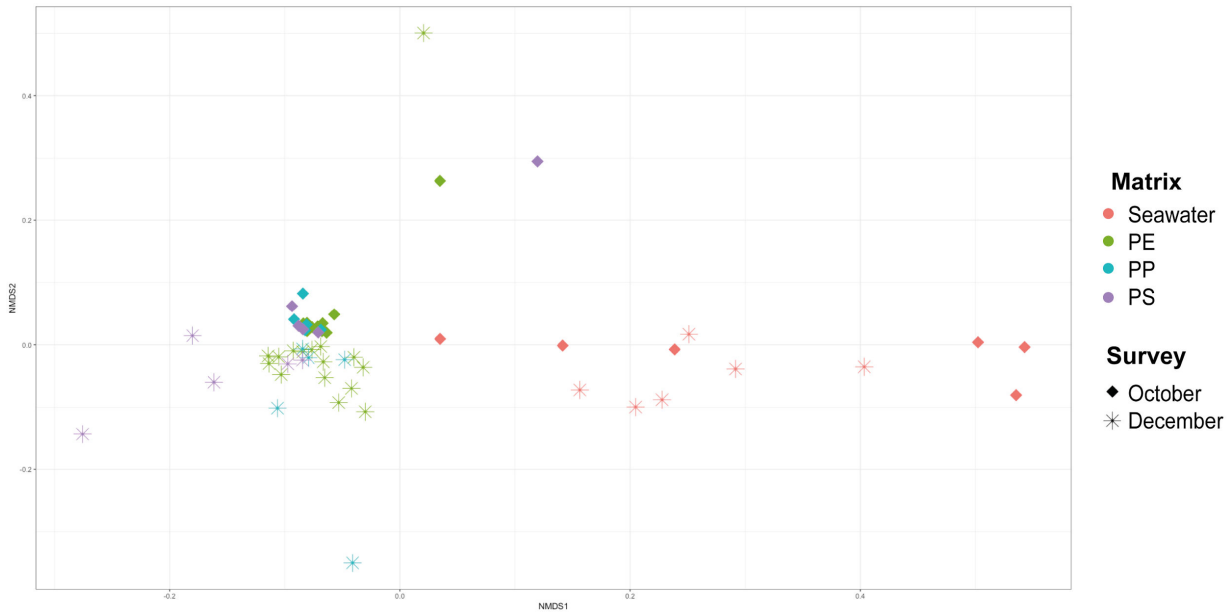


Figure SI-2 : nMDS plot comparing OTUs of bacteria in all sample types (PE, PP, PS and seawater) during October and December 2015 (Jaccard similarity index).

B. Identification des contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques

En plus d'être un potentiel substrat pour les micro-organismes, les microplastiques peuvent également adsorber les contaminants chimiques présents dans l'environnement marin (Rochman, 2015). Dans ce sous-chapitre, une évaluation des niveaux de contamination chimiques des microplastiques, collectés en rade de Brest, par des HAP, PCB et pesticides a été réalisée. Les travaux présentés dans ce sous-chapitre ont été réalisés en collaboration avec le Cedre (Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux) et avec l'appui de l'expertise scientifique de V. Loizeau du Laboratoire Biogéochimie des Contaminants Organiques (Ifremer, Plouzané). L'ensemble des dosages chimiques a été réalisé sur la plateforme technique du Cedre en collaboration avec C. Lacroix et J. Guyomarch, et les analyses par spectroscopie Raman au LDCM sous la responsabilité scientifique et technique d'E. Rinnert (Ifremer, Plouzané).

Les microplastiques utilisés dans cette étude correspondent à ceux collectés lors de l'évaluation de la contamination des matrices abiotiques par les microplastiques présentée dans le Chapitre IV-A (Frère *et al.,* 2017). Le plan d'échantillonnage est donc le même avec trois stations localisées dans une zone à activité anthropique intense (A1 - A3), trois stations situées à l'embouchure des principaux fleuves se jetant dans la rade (E1 - E3) et enfin trois autres stations présentes dans des zones de brassages des masses d'eau de surface (M1 - M3). L'approche méthodologique employée dans cette étude est décrite dans la Figure 27.

Les résultats de cette étude indiquent la présence des contaminants chimiques recherchés (HAP, PCB et pesticides) sur les microplastiques flottants en quantité faible et inférieure aux concentrations retrouvées dans le sédiment et certaines espèces de la rade de Brest. Aucune relation entre la masse en microplastiques flottants et la famille de polymère d'une part, et la nature et les concentrations en contaminants chimiques recherchés d'autre part n'a été identifiée. En ce qui concerne les microplastiques collectés dans le sédiment, la faible masse des échantillons de microplastiques (< 0,7 mg) semble être un facteur limitant dans la quantification des contaminants chimiques, puisqu'aucun de ces contaminants n'a pu être quantifié.

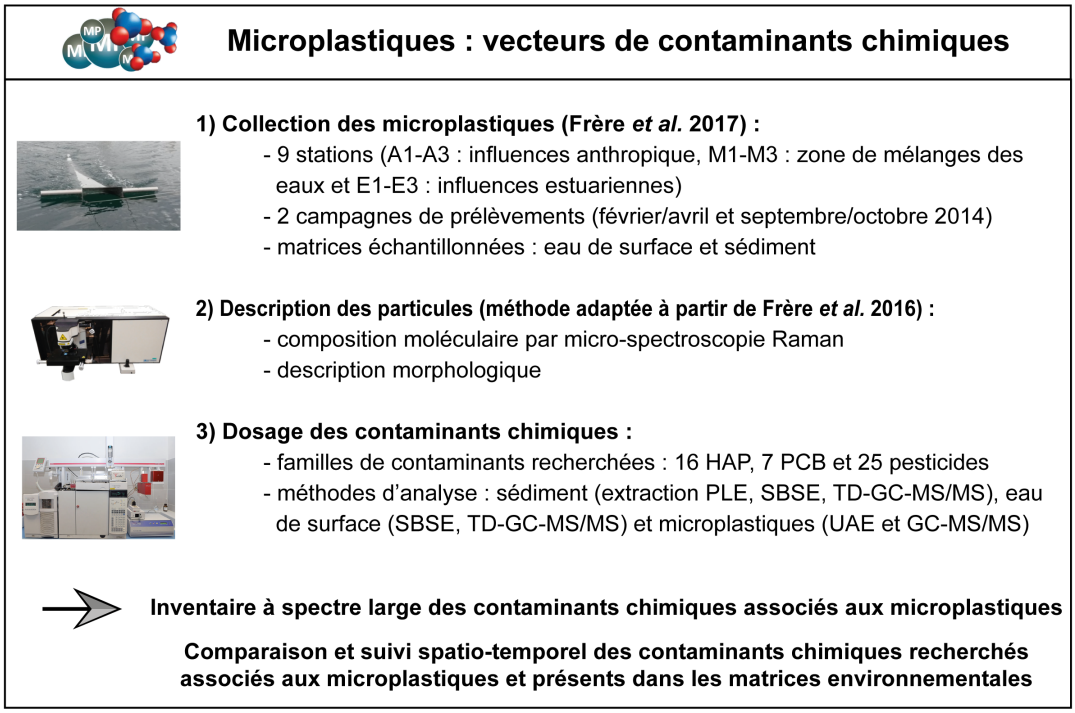


Figure 27 : Méthode d'identification des contaminants chimiques associés aux microplastiques

1. Introduction

Le processus de concentration des populations et des activités anthropiques le long du littoral (littoralisation) est à l'origine d'importants rejets dans les eaux côtières d'une large gamme de contaminants chimiques tels que des polluants comme les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), mais également de nombreux composés chimiques de la famille des pesticides. La nature hydrophobe de la majorité de ces contaminants chimiques leur confère une forte affinité pour les particules en suspension et notamment les microplastiques (Rochman, 2015). Mato *et al.* (2001) sont les premiers à avoir quantifié les contaminants chimiques adsorbés sur des microplastiques (granulés de polypropylène) collectés le long des côtes japonaises. Leur étude a révélé la présence de Σ 23 PCB (4 - 117 $ng.g^{-1}$), ΣDDE (dichlorodiphényldichloroéthylène; 0,16 - 3,1 $ng.g^{-1}$) et de nonylphénol (NP; 0,13 - 16 $\mu g.g^{-1}$) dans des proportions similaires à celles des sédiments et des particules en suspension prélevées sur les mêmes sites. Par la suite, la présence de contaminants chimiques (PCB, HAP, pesticides et métaux) adsorbés sur des microplastiques collectés dans l'environnement marin a été reportée et quantifiée à de multiples reprises (Endo *et al.,* 2005; Fisner *et al.,* 2013; Frias *et al.,* 2010; Heskett *et al.,* 2012; Hirai *et al.,* 2011; Mizukawa *et al.,* 2013; Ogata *et al.,* 2009; Rios *et al.,* 2007, 2010; Teuten *et al.,* 2009; Van *et al.,* 2012). L'interaction entre les microplastiques et les contaminants chimiques a été développée dans le Chapitre I - C "Les microplastiques : un mélange complexe de composés chimiques" qui révèle les nombreux efforts de recherche visant à comprendre les mécanismes de sorption des contaminants chimiques sur les microplastiques, ainsi que le rôle des microplastiques dans le transfert des contaminants chimiques aux organismes marins qui les ingèrent. Cependant, cette menace pour les organismes marins reste assez controversée (Bakir *et al.,* 2016; Koelmans *et al.,* 2016).

La rade de Brest est au cœur de nombreuses activités maritimes (pêche, conchyliculture, tourisme, activités nautiques et portuaires, pêche de plaisance et pêche à pied), industrielles, urbaines et agricoles (bassins versants), ce qui en fait une zone côtière particulièrement exposée aux perturbations anthropiques et notamment aux rejets chimiques (Larzilliere, 2014). Historiquement, les données disponibles indiquent une contamination forte par les HAP, PCB et DDT des sédiments des zones portuaires situées dans la partie nord de la rade, à l'opposé du sud de la rade qui affiche de très faibles teneurs en contaminants organiques (Marchand *et al.,* 1983; Quiniou *et al.,* 1997). La présence saisonnière de nombreux pesticides dans l'eau est également décrite à l'embouchure des fleuves en lien avec les activités agricoles situées sur les bassins versants (Thomas and Durand, 1995). En effet, Thomas et Durand (1995) ont considéré que les valeurs mesurées au cours du mois de mai 1993 peuvent être considérées comme étant le bruit de fond issu de la culture précédente en 1992 (60 - 70 $ng.l^{-1}$ pour l'atrazine), alors que les concentrations mesurées au début du mois de juin 1993 sont très

importantes et parfois supérieures à 13 000 $ng.g^{-1}$ pour les triazines. Avec l'interdiction d'utilisation de nombreuses molécules (notamment PCB depuis 1987 en France) ou restriction d'utilisation (comme le DDT), leurs teneurs dans les matrices environnementales ont progressivement diminuées, et des travaux plus récents entrepris dans le cadre de la rénovation de la zone portuaire ont même montré une contamination par les POP (notamment le tributylétain ou TBT) essentiellement localisée dans le compartiment sédimentaire de la zone portuaire, avec des valeurs dans la colonne d'eau globalement modérées (Rapport IDRA environnement 2016).

Cette étude, qui doit être considérée comme préliminaire, a été mise en place afin d'établir pour la première fois un inventaire des contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques collectés à neuf stations de la rade de Brest, dans l'eau de surface et les sédiments. Le choix des stations d'échantillonnage a été guidé par leur proximité avec des zones à forte influence anthropique ou estuarienne, ou leur localisation dans des zones de mélange entre les eaux marines et estuariennes. Le choix des contaminants chimiques étudiés dans ce projet a été dicté par plusieurs critères qui combinent : i) le caractère hydrophobe de ces composés ; ii) leur présence historique dans la rade de Brest et leur suivi dans des réseaux de surveillance nationaux (Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral, ROCCH) et internationaux (Mussel Watch Program, MWP) ; iii) la diversité de leur sources potentielles, et enfin iv) la faisabilité et de coût de la quantification analytique. Ainsi, trois familles de composés organiques ont été mesurées :

- les HAP avec les 16 composés indicateurs classés prioritaires par l'United States Environmental Protection Agency (US EPA) (Tableau 6) ;
- les PCB avec les 7 congénères indicateurs faisant partie de la liste OSPAR (Oslo or Paris Conventions for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic) en tant que substances devant faire l'objet de mesures prioritaires (INERIS, Institut National de l'Environnement industriel et des RIsques) (Tableau 7) ;
- les pesticides persistants (identifiés comme POP pour plusieurs d'entre eux) dont certains sont interdits d'utilisation ou dont l'utilisation est limitée depuis quelques années mais restent préoccupants du fait de leur caractère très rémanent dans l'environnement (INERIS) (Tableau 8).

Tableau 6: Caractéristiques des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA. (Kow : coefficient de partage octanol-eau).

HAP	Formule brute	Nombre de cycle	Masse Molaire ($g.mol^{-1}$)	Log Kow (INERIS, 2005)
Naphtalène	$C_{10}H_8$	2	128	3,3
Acénaphtylène	$C_{12}H_8$	3	152	4,07
Acénaphtène	$C_{12}H_{10}$	3	154	3,98

Fluorène	$C_{13}H_{10}$	3	166	6,58
Anthracène	$C_{14}H_{10}$	3	178	4,45
Phénanthrène	$C_{14}H_{10}$	3	178	4,45
Fluoranthène	$C_{16}H_{10}$	4	202	4,9
Pyrène	$C_{16}H_{10}$	4	202	4,88
Benzo(a)anthracène	$C_{18}H_{12}$	4	228	5,61
Chrysène	$C_{18}H_12$	4	228	5,16
Benzo(a)pyrène	$C_{20}H_{12}$	5	252	6,06
Benzo(b)fluoranthène	$C_{20}H_{12}$	5	252	6,04
Dibenzo(a,h)anthracène	$C_{22}H_{14}$	5	278	6,84
Benzo(k)fluoranthène	$C_{20}H_{12}$	5	252	6,06
Benzo(ghi)perylène	$C_{22}H_{12}$	6	276	6,5
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	$C_{22}H_{12}$	6	276	6,58

Tableau 7 : Caractéristiques des 7 PCB classés prioritaires par l'OSPAR (Kow : coefficient de partage octanol-eau).

Congénère	**Formule brute**	**Nombre de Chlore**	**Substitution**	**Masse Molaire ($g.mol^{-1}$)**	**Log Kow (IARC, 2016)**
CB-28	$C_{12}H_7Cl_3$	3	2,4,4'	257,54	5,67
CB-52	$C_{12}H_6Cl_4$	4	2,2',5,5'	291,99	5,84
CB-101	$C_{12}H_5Cl_5$	5	2,2',4,5,5'	326,43	6,38
CB-118	$C_{12}H_5Cl_5$	5	2,3',4,4',5	326,43	6,74
CB-138	$C_{12}H_4Cl_6$	6	2,2',3,4,4',5'	360,88	6,83
CB-153	$C_{12}H_4Cl_6$	6	2,2',4,4',5,5'	360,88	6,92
CB-180	$C_{12}H_3Cl_7$	7	2,2',3,4,4',5,5'	395,32	7,36

Tableau 8 : Caractéristiques des pesticides recherchés dans cette étude.

Famille	**Composé**	**Formule**	**Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)**	**Log Kow (INERIS)**	**Usages**
Organochloré	Lindane et co-produits	$C_6H_6Cl_6$	290,84	3,7	insecticide
	Acétochlore	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	269,77	4,14	herbicide
	Isodrine	$C_{12}H_8C_{l6}$	364,91	6,75	insecticide
	Métazachlore	$C_{14}H_{16}ClN_{3O}$	277.8	2,49	herbicide
	DDT et métabolites	$C_{14}H_9Cl_5$	354,49	6,36	insecticide et acaricides
	Hexachlorobenzène	C_6Cl_6	284,78	3,59 - 6,2	fongicide

	Endosulfan	$C_9H_6Cl_6O_3S$	406,92	4,7	insecticide
	Endosulfan sulfate	$C_9H_6Cl_6O_4S$	422,90	3,66	insecticide
	Dieldrine	$C_{12}H_8Cl_6O$	380,91	5,4	insecticide
	Endrine	$C_{12}H_8Cl_6O$	380,9	3,2	insecticide
Organophosphoré	Chlorpyrifos	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,58	5,3	insecticide
	Parathion	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291,27	3,15 - 3,8	insecticide
	Chlorfenvinphos	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	359,57	3,82	insecticide
	Méthylparathion	$C_8H_{10}NO_5PS$	263,2	2,8	insecticide
Amides	Alachlore	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	269,77	2,97	herbicide
	S-métolachlore	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	283,79	2,9	herbicide

La contamination des microplastiques sera discutée au regard de la contamination des matrices environnementales (eau et sédiment) révélée par les analyses conduites dans cette étude ainsi que par l'utilisation des données de contamination du biote (moules et huîtres creuses) de la rade de Brest issues du réseau de suivi ROCCH (Ifremer) et des travaux de thèse de Camille Lacroix (2014).

2. Matériel et méthodes

2.1. Collection des échantillons

L'inventaire des contaminants chimiques a été réalisé sur les échantillons de microplastiques, de sédiments et d'eau de surface collectés en rade de Brest lors de deux campagnes de prélèvement mises en œuvre en février-avril 2014 et septembre-octobre 2014. Neuf stations ont été choisies pour évaluer la contamination des microplastiques par des composés chimiques : stations A1 à A3 (influence anthropique), stations E1 à E3 (influence estuarienne) et stations M1 à M3 (zones de mélange entre les eaux marines et estuariennes) (Figure 28). Les protocoles de prélèvement sont les mêmes que ceux présenté dans le Chapitre IV-A, Frère *et al.* (2017). De manière succincte, un filet Manta a été déployé à la surface de l'eau (20 premiers cm) pour collecter les microplastiques flottants, et une benne Van Veen a été utilisée pour collecter les microplastiques présents dans les 5 premiers cm du sédiment. Afin de comparer la contamination chimique des microplastiques avec celle des matrices environnementales, de l'eau de surface (500 ml) et du sédiment (50 ml) ont été également collectés sur chacune des 9 stations.

2.2. Description des échantillons

Les protocoles de collecte des microplastiques dans les prélèvements d'eau et de sédiment sont développés dans le Chapitre IV-A (Frère *et al.,* 2017). Les microplastiques contenus dans les échantillons d'eau de surface ont été extraits à la pince à l'œil nu puis à l'aide d'une loupe binoculaire pour les plus petites particules. Les microplastiques contenus dans les échantillons de sédiment ont été prélevés à l'aide d'un traitement par des solutions denses (solutions saturées de chlorure de sodium et de tungstate de sodium) avant d'être collectés à l'aide d'une loupe binoculaire. La composition moléculaire des particules collectées a été réalisée via une analyse micro-spectroscopique Raman afin d'en isoler les microplastiques (Frère *et al.,* 2016). Pour chacune des deux campagnes de prélèvement, les microplastiques ont été regroupés (pool de microplastiques) par station indépendamment du type de polymère et de leur classe de taille (Tableau 9), avant d'être stockés à -20 °C en attendant de réaliser le dosage des contaminants chimiques.

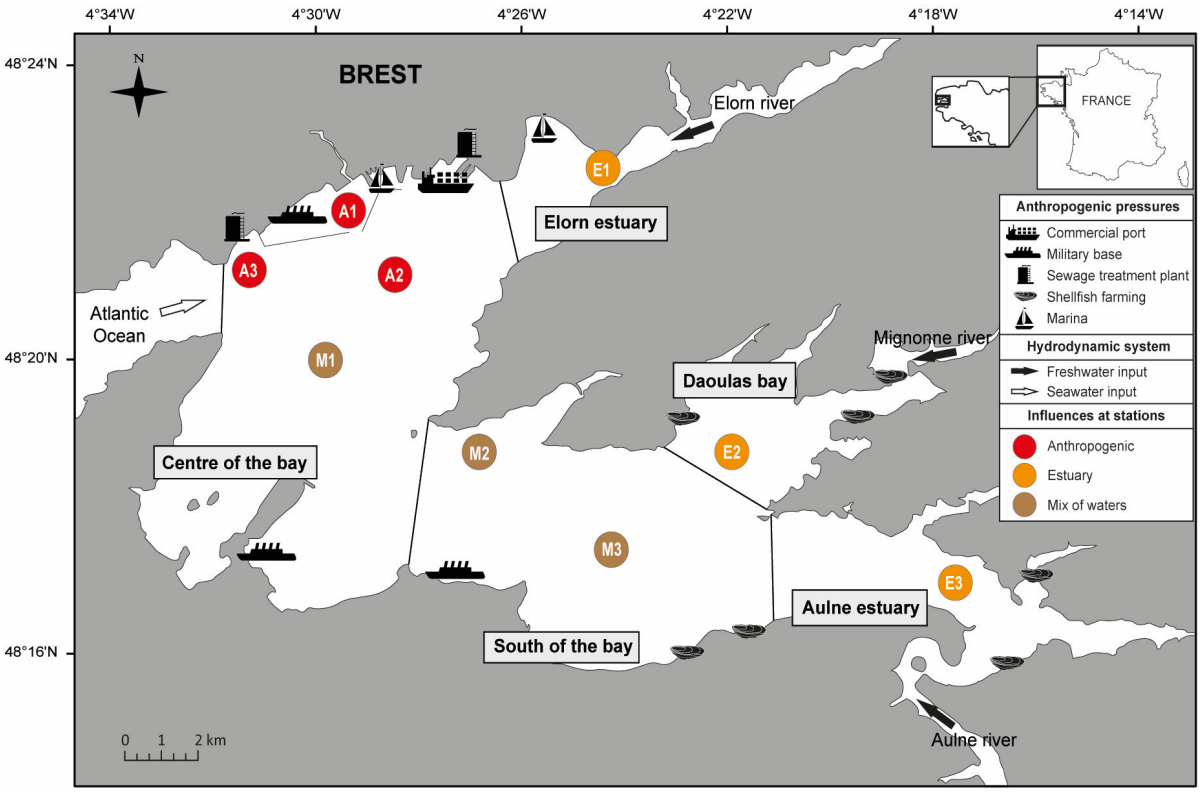


Figure 28 : Localisation des sites de collecte de sédiment, d'eau de surface et de microplastiques (A1-3, M1-3 et E1-3).

Tableau 9 : Caractéristiques des microplastiques collectés en rade de Brest (eau de surface et sédiment) au cours des campagnes de prélèvements de février - avril 2014 et septembre - octobre 2014 (PE : polyéthylène, PP : polypropylène et PS : polystyrène ; la masse (mg) correspond à la masse de microplastiques disponibles pour les dosages de HAP, PCB et pesticides).

Matrice	Station	février - avril 2014			septembre - octobre 2014		
		Concentration (part.m^{-3})	Composition (%) (n= nombre total de particules)	Masse (mg)	Concentration (part.m^{-3})	Composition (%) (n= total number of particles)	Masse (mg)
Eau de surface	A1	0,14	PE (73 %), PP (23 %) et PS (4 %) (n=26)	10,41	0,49	PE (64 %), PP (7 %) et PS (30 %) (n=74)	67,92
	A2	0,19	PE (58 %), PP (39 %) et PS (3 %) (n=36)	22,23	0,48	PE (67 %), PP (17 %) et PS (17 %) (n=72)	36,54
	A3	0,05	PE (67 %), PP (33 %) (n=9)	148,38	0,47	PE (69 %), PP (11 %) et PS (20 %) (n=70)	81,24
	M1	0,09	PE (78 %), PP (21 %) et PS (1 %) (n=78)	273,30	0,17	PE (63 %), PP (14 %) et PS (22 %) (n=214)	325,71
	M2	0,05	PE (68 %), PP (22 %) et PS (10 %) (n=41)	7,86	0,01	PE (83 %), PP (17 %) (n=6)	1,27
	M3	0,43	PE (100 %) (n=3)	1,48	0,01	PE (75 %), PS (25 %) (n=4)	0,93
	E1	0,22	PE (89 %), PP (11 %) (n=18)	9,89	1,43	PE (69 %), PP (15 %) et PS (15 %) (n=26)	3,73
	E2	-	-	-	0,03	PE (50 %), PS (50 %) (n=2)	0,15
	E3	0,02	PE (60 %), PP (20 %) et PS (20 %) (n=10)	1,78	0,02	PE (50 %), PP (50 %) (n=2)	0,15
Sédiment	A1	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-
	A3	-	-	-	2,03	PE (33 %), PP (33 %) et PS (33 %)	0,67
	M1	0,39	PP (100 %)	0,41	0,78	PE (100 %)	0,44
	M2	0,65	PE (100 %)	0,12	0,33	PE (100 %)	0,42
	M3	8,74	PE (60 %), PP (30 %) et PS (10 %)	0,67	-	-	-
	E1	1,44	PE (67 %), PS (33 %)	0,69	-	-	-
	E2	2,53	PP (75 %), PS (25 %)	0,03	0,49	PE (100 %)	-
	E3	-	-	-	-	-	-

2.3. Dosage des contaminants

L'évaluation de la contamination chimique des échantillons de microplastiques, de sédiments et d'eau de surface a été réalisée via l'analyse des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA, les 7 OSPAR-PCB et les 25 pesticides listés respectivement dans les Tableaux 6, 7 et 8. La totalité des analyses des

contaminants chimiques (microplastiques, sédiment et eau de surface) a été réalisée au Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (Cedre, Brest).

Les échantillons de sédiment ont été extraits par sorption sur barreau magnétique (SBSE) suivie d'une analyse par chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (GC-MS/MS) selon la méthode de Camino-Sánchez *et al.* (2011). 3,5 g de sédiment humide par échantillon, contenant 10 ng de 8 étalons internes deutérés (naphathalène d8, biphényle d10, phénanthrène d10, éthylparathion d10, pyrène d10, benzo(a)anthracène d12, benzo(a)pyrène d12, benzo(g,h,i)pérylène d12), ont été extraits par fluide pressurisé (PLE) en utilisant du méthanol (qualité analytique, environ 10 ml) comme solvant. Les échantillons ont été complétés avec le méthanol jusqu'à obtention d'un volume final de 25 ml. Ensuite, 10 ml sur les 25 ml ont été mélangés avec 100 ml d'eau osmosée inverse puis extraits pendant 16 h à 700 rpm en utilisant des barreaux magnétiques de polydiméthylsiloxane (PDMS) (Twister 20 mm x 0,5 mm, Gerstel). Pour les échantillons d'eau de surface, le barreau SBSE a directement été mis dans 100 ml d'échantillon contenant 10 ng de 8 étalons internes deutérés (les mêmes que pour les échantillons de sédiment). Les barreaux magnétiques des échantillons de sédiment et d'eau de surface ont ensuite été analysés par thermodésorption (TD-GC-MS/MS, HP-5MS) à l'aide d'un système de chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890A) couplé à un spectromètre de masse (Agilent 7000 triple quadripôle) équipé d'une unité de thermodésorption (TDU) couplée à un système d'injection à froid (Gerstel) à partir de la méthode mise au point par Lacroix *et al.* (2014). Les analytes ont été quantifiés à partir des composés deutérés en utilisant une courbe de calibration allant de 0,01 à 30 ng et 0,01 à 10 ng par barreau pour le sédiment et l'eau de surface, respectivement. Dû à leur faible quantité, certains composés ont été sommés : benzo(b)fluoranthène et benzo(k)fluoranthène (appelé benzo(b+k)fluoranthène), 4,4 DDD et 2,4 DDT. Pour chaque échantillon de sédiment, le taux d'humidité a été déterminé en séchant 1,5 g de sédiment humide à 50 °C pendant 5 jours. Le taux d'humidité varie de 26 à 54 %. Les résultats sont exprimés en ng analytes.g^{-1} de sédiment sec ou ng analytes.l^{-1} d'eau de surface. La méthode utilisée ici pour les échantillons de sédiment n'a pas été validée pour certains composés. En particulier, les concentrations en: CB180, alachlore et s-métolachlore sont sous-estimées dans les sédiments (comparaison avec l'analyse d'un échantillon de sédiment standard de référence, i.e. certifié). Du fait des fortes concentrations en HAP dans les sédiments souvent supérieures à la gamme de calibration, dans les échantillons les plus contaminés, les valeurs des échantillons de sédiment les plus contaminés ont été extrapolées à partir de la gamme.

L'analyse des contaminants chimiques associés aux microplastiques a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem (GC-MS/MS). Les échantillons de microplastiques ont été mélangés avec une solution d'hexane (qualité analytique, environ 100 µl) contenant 8 étalons internes deutérés (les mêmes que pour les échantillons de

sédiment) et laissés à évaporer à l'air. Ils ont ensuite été resuspendus dans 100 µl d'hexane et extraits par extraction assistée par ultrasons (UAE) pendant 30 min. Les échantillons les plus chargés en microplastiques ont été extraits dans 500 µl d'hexane, laissés évaporés et resuspendus dans 100 µl d'hexane. 2 µl de l'extrait ont ensuite été injectés et analysés par GC-MS/MS à l'aide d'un système de chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890A) couplé à un spectromètre de masse (Agilent 7000 triple quadripôle). Les analytes ont été quantifiés à partir des composés deutérés en utilisant une courbe de calibration allant de 0,005 à 5 $ng.\mu l^{-1}$ (0,01 à 10 ng injectés). Deux composés, le benzo(b)fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène, ont été sommés (benzo(b+k)fluoranthène) dû à leur faible quantité. Les résultats sont exprimés en ng $analytes.g^{-1}$ de microplastiques.

Les limites de quantification (LOQ) ont été calculées via la méthode de courbe de calibration (Shrivastava and Gupta, 2011) et les limites de détection (LOD) ont été estimées en divisant la LOQ par 3. La limite de quantification dans l'eau de surface est comprise entre 0,5 et 50 $ng.l^{-1}$ pour les HAP; 0,1 et 0,5 $ng.l^{-1}$ pour les PCB; et 0,1 et 15 $ng.l^{-1}$ pour les pesticides. La limite de quantification dans le sédiment est comprise entre 0,1 et 5 $ng.g^{-1}$ de sédiment sec pour les HAP; 0,1 $ng.g^{-1}$ de sédiment sec pour les PCB; et 0,1 et 1 $ng.g^{-1}$ de sédiment sec pour les pesticides. La limite de quantification pour les microplastiques est comprise entre 0,05 et 5 ng injectés pour les HAP; 0,05 et 0,5 ng injecté pour les PCB et 0,05 et 1,5 ng injectés pour les pesticides.

3. Résultats

3.1. Contamination des matrices environnementales

Les matrices abiotiques de la rade de Brest, sédiment et eau de surface, sont contaminées par les HAP. Les 16 HAP dosés ont pu être quantifiés dans les sédiments échantillonnés dans des concentrations (Σ16 HAP) qui varient de 89 (station M3) à 2 721 $ng.g^{-1}$ (station A1) et de 273 (station E2) à 3 241,43 $ng.g^{-1}$ (station E1) au cours des campagnes de février et octobre 2014, respectivement. Les stations les plus contaminées par les Σ16 HAP sont situées dans l'estuaire de l'Elorn (station E1) et à l'intérieur de la zone portuaire (station A1) avec des valeurs moyennes de 2 373 ± 1 228 $ng.g^{-1}$ et 2 847 ± 178 $ng.g^{-1}$, respectivement (Tableau 10). L'eau de surface est également contaminée par les Σ16 HAP, à des valeurs moyennes de 30 ± 39 $ng.l^{-1}$ et 45 ± 19 $ng.l^{-1}$ au cours des campagnes d'avril et septembre-octobre 2014, respectivement (Tableau 10).

Les échantillons de sédiment sont également contaminés par les PCB dont les valeurs (Σ7 PCB) varient de 0,06 (station M3) à 12,71 $ng.g^{-1}$ (station A1) et de 0,23 (station M2) à 8,23 $ng.g^{-1}$ (station E1) au cours des campagnes de février et octobre 2014, respectivement. Les stations les plus contaminées en Σ7 PCB sont localisées au niveau de la zone portuaire (stations A1 et A2 en février et

octobre 2014, respectivement) et dans l'estuaire de l'Elorn (station E1) avec des valeurs de 9,08 ± 5,13 $ng.g^{-1}$ et 5,63 ± 3,67 $ng.g^{-1}$, respectivement (Tableau 10). Aucun des 7 congénères de PCB n'a pu être quantifié dans les prélèvements d'eau de surface ; les données sont apparues inférieures à la LOQ.

Quelques composés de la famille des pesticides ont été dosés dans le sédiment (endrine, dieldrine et ΣDDT), les concentrations (Σ pesticides) varient de 0,01 (station A3) à 3,54 $ng.g^{-1}$ (station E1) et de 0,02 (station A3) à 1,55 $ng.g^{-1}$ (station M1) au cours des campagnes de février et octobre 2014, respectivement. Parmi les pesticides détectés, des composés chimiques interdit d'utilisation tels que les composés organochlorés DDT et dieldrine ont montré des valeurs supérieures à la LOQ. Le DDT et ses métabolites sont retrouvés dans le sédiment de la rade de Brest, et les sites les plus contaminés sont les stations M1 avec 1,44 ± 0,16 $ng.g^{-1}$ et E1 avec 2,12 ± 1,37 $ng.g^{-1}$ (Tableau 10). La dieldrine a également pu être quantifiée à la station E1 avec une concentration de 0,31 ± 0,07 $ng.g^{-1}$ et à la station A1 (uniquement en février 2014) à une concentration de 0,17 $ng.g^{-1}$ (Tableau 10). Enfin, le chlorpyrifos a été quantifié à la station E1 (uniquement en février 2014) avec une valeur de 0,09 $ng.g^{-1}$ (Tableau 10). Aucun des 25 pesticides n'a pu être quantifié dans les échantillons d'eau de surface (données inférieures à la LOQ).

Tableau 10 : Niveaux de contamination des matrices abiotiques (sédiments collectés en février et octobre 2014 et eau de surface collectée en avril et septembre - octobre 2014) en rade de Brest aux 9 stations (les valeurs correspondent à la somme des 16 EPA-HAP, des 7 OSPAR-PCB et des 25 pesticides en ng par g de sédiment sec et en ng par l d'eau de surface; - : valeur inférieure à la limite de quantification ou détection).

		Sédiment					Eau de surface		
Campagne prélèvement	**Site de surveillance**	**Σ16 HAP**	**Σ7 PCB**	**Σ25 pesticides**	**Matière sèche (%)**	**Fraction < 63 µm (%)**	**Σ16 HAP**	**Σ7 PCB**	**Σ25 pesticides**
février - avril 2014	A1	2 721,20	12,71	0,78	54,4	62,6	5,86	-	-
	A2	271,33	1,09	0,04	66,4	37,6	58,23	-	-
	A3	779,67	0,49	0,01	64,8	28,8	-	-	-
	M1	1 265,72	1,08	1,42	62,3	52,9	3,02	-	-
	M2	117,56	0,40	0,02	72,3	28,9	27,91	-	-
	M3	88,98	0,06	0,01	74,7	33,0	4,92	-	-
	E1	1 504,95	3,04	3,55	51,4	92,1	6,01	-	-
	E2	352,74	0,60	0,09	48,6	78,7	107,75	-	-
	E3	515,79	0,60	0,06	60,8	68,8	-	-	-
septembre - octobre 2014	A1	2 972,89	3,71	0,91	51,3	57,5	18,13	-	-
	A2	849,58	5,45	0,67	58,4	43,3	-	-	-
	A3	788,97	0,56	0,02	62,8	23,4	-	-	-
	M1	795,64	1,85	1,55	56,1	-	58,96	-	-
	M2	320,02	0,23	0,02	74	-	42,44	-	-
	M3	291,08	0,44	0,17	50,2	-	59,03	-	-
	E1	3 241,43	8,23	1,42	45,9	-	-	-	-
	E2	273,35	0,81	0,07	49,5	-	-	-	-
	E3	384,31	0,39	0,05	55,4	-	-	-	-

3.2. Contamination chimique des microplastiques

La concentration moyenne de microplastiques dans le sédiment de la rade de Brest est de 0,97 ± 2,08 particules.kg^{-1} sédiment sec dont la distribution spatio-temporelle a aussi été discutée dans l'article cité ci-dessus et présenté dans le Chapitre IV-B. Les microplastiques sont composés exclusivement de 53 % de PE, 30 % de PP et 17 % de PS et présentent des masses allant de 0,03 à 0.69 mg par pool (Tableau 9). Sur ces pools de microplastiques extraits du sédiment, aucune des trois familles de contaminants chimiques ciblées dans cette étude (HAP, PCB et pesticides) n'a pu être quantifiée sur les microplastiques extraits du sédiment car les valeurs mesurées étaient systématiquement inférieures à la limite de détection ou quantification.

En ce qui concerne les microplastiques flottants, la concentration moyenne en microplastiques dans l'eau de surface de la rade de Brest est de 0,24 ± 0,35 particule.m^{-3}, et l'ensemble des microplastiques collectés sont composés à 67 % de PE, 17 % de PP et 16 % de PS, et présentent des masses allant de 0,15 à 325,71 mg par pool (Tableau 9). Dans ces pools, les trois familles de contaminants ont pu être quantifiées (valeurs supérieures aux LOQ et/ou LOD) sur 2 des 9 stations en avril 2014 et 5 sur 9 des stations en septembre - octobre 2014.

Les composés de HAP quantifiés sur les microplastiques sont : le naphtalène, l'acénaphtène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène. La contamination moyenne des microplastiques flottants par les Σ HAP varie d'une valeur nd (non détecté) à 42,6 ng.g^{-1} et de nd à 1 586,2 ng.g^{-1} au cours des campagnes de février et octobre 2014, respectivement. Pour les deux temps de prélèvement, les plus fortes concentrations en HAP ont été retrouvées dans la zone à activité anthropique intense avec 42,6 ng.g^{-1} à la station A3 en avril 2014, et 1 586,2 ng.g^{-1} à la station A1 en septembre/octobre 2014 (Tableau 11).

Un seul congénère de PCB (CB-101) a été détecté dans un unique pool de microplastiques flottants provenant de la station M1 (zone de mélange des eaux à proximité des zones fortement urbanisées) au cours de la campagne de prélèvement de septembre-octobre 2014, avec une concentration de 27,6 ng.g^{-1} (Tableau 11).

Enfin, deux pesticides ont été dosés, l'alachlore et le s-métolachlore, dans les pools de microplastiques flottants. L'alachlore a été dosé à la station M1 en avril 2014 à une concentration de 560,6 ng.g^{-1} et le s-métolachlore aux stations A2 et M3 en septembre-octobre 2014 à des concentrations de 3 536,2 et 49 762,9 ng.g^{-1}, respectivement (Tableau 11).

Tableau 11 : Niveaux de contamination des microplastiques flottants collectés en avril et septembre/octobre 2014 (les valeurs correspondent à la somme des 16 EPA-HAP, des 7 OSPAR-PCB et des 25 pesticides en ng par g de microplastiques; - : valeurs inférieures aux seuils de quantification ou détection).

Station	avril 2014			septembre - octobre 2014		
	Σ HAP	Σ PCB	Σ Pesticides	Σ HAP	Σ PCB	Σ Pesticides
A1	-	-	-	1 586,2	-	-
A2	-	-	-	621,0	-	3 536,2
A3	42,6	-	-	165,1	-	-
M1	32,7	-	560,6	292,9	27,6	-
M2	-	-	-	-	-	-
M3	-	-	-	-	-	49 762,9
E1	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-
E3	-	-	-	-	-	-

4. Discussion

4.1. La rade de Brest: un milieu contaminé par les HAP, PCB et pesticides

4.1.1. Matrices abiotiques : sédiment et surface de l'eau

Les trois familles de contaminants chimiques ciblées dans cette étude (HAP, PCB et pesticides) ont été détectées dans les matrices biotiques et abiotiques de la rade de Brest, que ce soit dans l'eau collectée en surface comme dans les sédiments. C'est aussi vrai pour les matrices biotiques suivies dans le cadre du ROCCH et des travaux de C. Lacroix (2014).

Aujourd'hui, la majeure partie des HAP présents dans l'environnement marin provient de l'activité humaine. Les HAP peuvent pénétrer directement dans le milieu aquatique par des effluents industriels et urbains, des déversements accidentels de pétrole brut et de produits pétroliers. Les eaux souterraines et de ruissellement des secteurs urbains et industriels peuvent également présenter une source diffuse de HAP pour l'environnement marin. Enfin, tous les processus de combustion faisant intervenir des carburants organiques peuvent produire des HAP. Les plus importants sont la combustion incomplète de matières fossiles pour le chauffage et pour le transport (gaz d'échappement) et l'incinération des ordures (Colombo *et al.,* 1989; Neff, 1979). Ces activités humaines rejettent dans l'atmosphère des HAP qui auront tendance à se fixer sur des particules en suspension dans l'air et dont une partie sera

introduite dans le milieu marin par les dépôts atmosphériques. A chaque source de contamination par les HAP va correspondre une empreinte caractéristique. Plusieurs auteurs ont proposé de caractériser la distribution des HAP à partir de rapports caractéristiques entre isomères structuraux tels présentés dans le Tableau 12. Les sources de contamination par les HAP peuvent donc être identifiées en utilisant le ratio entre le phénanthrène et l'anthracène (Phe/Ant). Si le ratio Phe/Ant se situe entre 1 - 25, cela indique une origine pyrolytique des HAP et si le ratio est > 25, cela indique une origine pétrogénique (Soclo *et al.,* 1986) (Tableau 12). Un autre ratio peut également être utilisé pour identifier les sources de contamination par les HAP, le ratio entre le fluoranthène et le pyrène (Flu/Pyr). Si le ratio FLU/Py est > 1, cela indique une origine pyrolytique des HAP, si le un ratio < 1 indique une origine pétrogénique (Raoux, 1991; Sicre *et al.,* 1987) (Tableau 12). Les HAP quantifiés dans le sédiment de la rade de Brest sont d'origine pyrolytique (ratios Flu / Pyr = 1,10 ± 0,06, Phe / Ant = 5,15 ± 2,50 et Chrys/BaA = 0,91 ± 0,30) (Raoux, 1991; Sicre *et al.,* 1987; Soclo *et al.,* 1986).

Tableau 12 : Identification de l'origine des HAP (Phe/Ant = phénanthrène/anthracène ; Flu/Pyr = fluoranthène/pyrène ; Chrys/BaA = chrysène/benzo(a)anthracène).

Indice	Phe/Ant	Flu/Pyr	Chrys/BaA
Origine pétrogénique	>25	<1	>1
Origine pyrolytique	1-10	>1	<1
Références	Soclo (1986)	Sicre *et al.* (1987) Raoux (1991)	Parlanti (1990)

L'origine des HAP dosés dans l'eau de surface n'a pas pu être déterminée car les composés nécessaires dans le calcul de ces ratios n'ont pas toujours pu être mesurés dans les échantillons. La forte hydrophobicité des HAP (log Kow > 4) entraîne leur adsorption rapide sur la matière particulaire présente dans l'eau ou dans l'air (Countway *et al.,* 2003) et leur transfert au sein des organismes (Farrington and Takada, 2014). Les faibles teneurs mesurées dans l'eau de surface peuvent donc s'expliquer par la faible solubilité de ces composés dans l'eau en comparaison avec les matrices solides et notamment la matière organique (Accardi-Dey and Gschwend, 2002; El-Shahawi *et al.,* 2010). De plus, les échantillons d'eau de surface présentent une très forte variabilité spatiale et temporelle potentiellement due à des contaminations ponctuelles générées par les activités nautiques environnantes. Une contamination provenant directement d'hydrocarbures relargués par la combustion du moteur du navire utilisé pour les prélèvements ne peut d'ailleurs pas être exclue. Pour ces raisons, le sédiment constitue dans notre travail et de manière générale, une matrice plus intégratrice de la contamination environnementale par les HAP (El-Shahawi *et al.,* 2010). Une amélioration du protocole pourrait être réalisée pour de futures études, incluant un prélèvement d'eau en sub-surface plutôt qu'en surface (afin de minimiser les contaminations nautiques) ainsi qu'une filtration sur filtre

de faible porosité (0,45 µm) afin de discriminer les fractions dissoute et particulaire. L'utilisation de capteurs passifs serait également une alternative intéressante (Adams *et al.,* 2007; Leslie *et al.,* 2013; Lohmann, 2012; Teuten *et al.,* 2007; E. L. Teuten *et al.,* 2009). La contamination du sédiment de la rade de Brest par les HAP peut être considérée comme modérée voir importante à certaines stations comme la zone portuaire. Les concentrations et la variabilité mesurées dans cette étude sont du même ordre de grandeur que celle de la baie de Seine (24 - 2 151 $ng.g^{-1}$) (Cachot *et al.,* 2006) ou encore du bassin d'Arcachon en France (32 - 4 120 $ng.g^{-1}$) (Baumard *et al.,* 1998) mais également du nord de la Mer Adriatique (nd - 1 056 $ng.g^{-1}$) (Acquavita *et al.,* 2014).

Les PCB, contaminants chimiques d'origine industrielle et urbaine essentiellement, sont très peu soluble dans l'eau mais ont une rémanence importante dans le sédiment et le biote ce qui peut expliquer qu'aucun PCB n'ait pu être quantifié dans l'eau de surface alors qu'ils sont présents dans le sédiment et le biote. Les concentrations en PCB mesurées dans le sédiment de la rade de Brest sont proches de celles mesurées en baie de Seine (0,4 - 21,4 $ng.g^{-1}$) (Cachot *et al.,* 2006) mais restent assez faibles en comparaison avec d'autres systèmes côtiers comme l'estuaire de l'Oder en Mer Baltique (230 - 10 600 $ng.g^{-1}$) (Kowalewska *et al.,* 2003) ou encore l'estuaire de Scheldt en Belgique (230 - 10 600 $ng.g^{-1}$) (Danis *et al.,* 2004). La contamination de la rade de Brest par les PCB a fortement diminué depuis les années 80 où les concentrations étaient proches des 180 $ng.g^{-1}$ dans la zone nord en opposition aux 5 $ng.g^{-1}$ rapportées dans la zone sud de la rade (Marchand *et al.,* 1983).

La contamination du sédiment de la rade de Brest par le DDT et ses métabolites (DDD et DDE) correspond à une contamination ancienne car ces composés sont interdits d'usage en France depuis 1975 à l'exception d'un usage dans certains systèmes clos permettant leur récupération (INERIS). De ce fait, la contamination de la rade de Brest par les DDT a diminuée depuis les années 80 où les concentrations étaient proches de 11 $ng.g^{-1}$ dans la zone nord et d'environ 2,4 $ng.g^{-1}$ dans la zone sud de la rade (Marchand *et al.,* 1983). De même, la dieldrine retrouvée dans le sédiment a été longtemps utilisé comme insecticide (agriculture, domestique, construction) et est interdit d'usage en France depuis 1992 (depuis 1996 il n'y a plus de production notable de dieldrine au niveau mondial (PNUE, 1996)). Un dernier composé de la famille des pesticides a été dosé, le chlorpyrifos qui est un organophosphoré utilisé comme insecticide pour traiter les cultures (consommation de 5 000 T/an dans l'U.E. (1996), dont 1200 T/an en France) et donc d'utilisation commune.

4.1.2. Matrices biotiques : moules (*Mytilus* spp.) et huîtres creuses (*Crassostrea gigas*)

Afin d'évaluer le niveau de contamination chimique du milieu dans lequel les microplastiques ont été collectés, les données de contamination chimique (16 EPA-HAP et 7 PCB indicateurs) de la matrice biotique issues du Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral (ROCCH, Ifremer)

et de la thèse de C. Lacroix (2014) ont été extraites et intégrées à cette étude. Le ROCCH met en œuvre la surveillance de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) et des conventions OSPAR (OSlo PARis) et de Barcelone. Trois stations sont suivies en rade de Brest pour la contamination de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) (Figure 29, Tableau 13). Dans le cadre des travaux de thèse de C. Lacroix (2014), les données utilisées concernent la contamination des moules (*Mytilus* spp.). Le dosage des 16 HAP classés prioritaires par l'US EPA a été réalisé dans la glande digestive de moules (*Mytilus* spp.) collectées à 4 stations : les deux premières, Port de commerce et Marina, se situent dans la zone portuaire de Brest et sont influencées par des activités anthropiques intenses, la station à proximité de la pointe de l'Armorique (Ar) correspond à une zone de mélange des eaux océaniques et estuariennes et enfin la dernière station, située au Dellec (Dc) dans le Goulet de la rade de Brest, est influencée par des apports océaniques importants et une hydrodynamique intense (Figure 29, Tableau 13).

Les plus fortes concentrations en HAP ont été reportées dans les zones à fortes activités anthropiques comme la zone portuaire (port de commerce : 639 ± 73 $ng.g^{-1}$ et Marina : 469 ± 44 $ng.g^{-1}$) pour les moules (Lacroix, 2014) mais également dans les zones à influence estuarienne (Elorn (A) : 300 $ng.g^{-1}$ et Aulne (C) 374,4 $ng.g^{-1}$) pour les huîtres creuses (ROCCH, 2014) (Tableau 13, Figure 29). Les données issues de la thèse de C. Lacroix (2014) montrent une décroissance de la contamination en Σ16 HAP selon un transect de la zone portuaire (stations Marina et Port de commerce) vers le centre de la rade (station Ar) jusqu'au Goulet (station Dc) (Tableau 13). Les HAP dosés dans les moules sont d'origine pyrolytique (ratio Flu/Pyr > 1) ce qui est en adéquation avec l'origine des HAP (ratio Flu/Pyr > 1) dosés dans le sédiment (Lacroix, 2014; Raoux, 1991; Sicre *et al.,* 1987; Soclo *et al.,* 1986). La contamination du biote en rade de Brest est modérée en comparaison à d'autres systèmes côtiers comme les villes de Dénia et Barcelone (Espagne) où les concentrations en HAP des moules indigènes sont 2,7 à 4 fois plus élevées (concentrations de 273 $\mu g.kg^{-1}$ masse humide équivalent à 1 365 $\mu g.kg^{-1}$ masse sèche et 405 $\mu g.kg^{-1}$ masse humide équivalent à 2 025 $\mu g.kg^{-1}$ masse sèche, respectivement pour la Σ14 EPA HAP) (Porte *et al.,* 2001).

Les 7 composés indicateurs de la famille des PCB ont également été dosés dans les tissus de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et les plus fortes concentrations ont de nouveau été retrouvées dans les estuaires de l'Elorn (54,2 $ng.g^{-1}$) et de l'Aulne (21,5 $ng.g^{-1}$) (Tableau 13). Les concentrations en CB-153 (PCB) mesurées à l'embouchure des estuaires de l'Elorn (25 $\mu g.kg^{-1}$) et de l'Aulne (9,8 $\mu g.kg^{-1}$) sont beaucoup moins élevées que celle mesurée dans les moules de l'estuaire de la Seine (140 $\mu g.kg^{-1}$; données ROCCH, Ifremer).

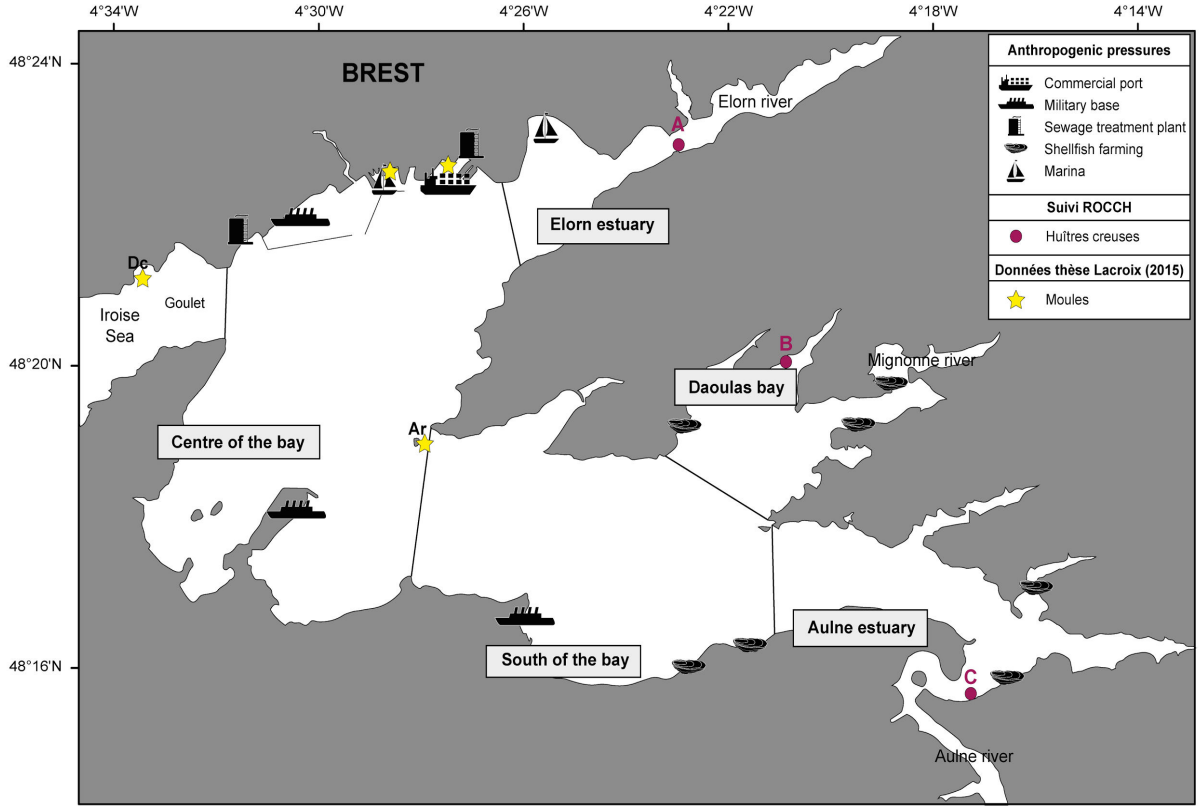


Figure 29 : Localisation des sites du ROCCH pour la collecte des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*; novembre 2014) (A, B et C) et des sites échantillonnés dans la thèse de C. Lacroix (2014) pour la collecte des moules (*Mytilus* spp.; novembre et décembre 2011).

Tableau 13 : Etat de contamination des matrices biotiques (*Crassostrea gigas* collectées en 2014 et *Mytilus* spp. collectées en 2011) (les valeurs correspondent à la somme des 16 HAP classés prioritaires par l'US EPA et des 7 PCB classé prioritaires par l'OSPAR en ng par g de chair sèche de bivalve; - : pas de mesure).

Matrice	Site de surveillance	Σ16 HAP ($ng.g^{-1}$)	Σ7 PCB ($ng.g^{-1}$)	Matière sèche (%)	Référence
Crassostrea gigas	Le Passage (A)	300	54,2	22	ROCCH (2014)
	Rossermeur (B)	95,9	15,2	21	
	Aulne rive droite (C)	374,4	21,5	17	
***Mytilus* spp.**	Marina	469 ± 44	-	-	Lacroix (2014)
	Port de commerce	639 ± 73	-	-	
	Armorique (Ar)	216 ± 41	-	-	
	Dellec (Dc)	94 ± 31	-	-	

4.2. Contamination chimique des microplastiques de la rade de Brest

4.2.1. Caractérisation des contaminants détectés

Les microplastiques flottants collectés en rade de Brest sont contaminés par les trois familles de contaminants chimiques ciblées dans cette étude, les HAP, PCB et pesticides.

La présence des HAP sur les microplastiques peut être due à la contamination en continue de l'environnement marin liée à la forte activité anthropique qui facilite la probabilité de rencontre entre les HAP et les microplastiques. Contrairement aux HAP quantifiés dans le sédiment, les HAP associés aux microplastiques sont uniquement composés de congénères légers (nombre de cycle 2, 3 et 4) dont le fluoranthène et le pyrène retrouvés dans 83 % des pools contaminés, suivis par le naphtalène (67 %), le phénanthrène (33 %), l'acénaphtène (33 %) et le benzo(a)anthracène (17 %). Rios *et al.* (2010) ont également identifié des HAP légers associés aux microplastiques dont la composition est dominée par le naphtalène et le phénanthrène qui sont présents dans plus de 80 % des échantillons. Les HAP légers sont les congénères qui ont le plus faible poids moléculaire et qui sont les plus solubles dans l'eau et les plus volatiles. Ainsi leur quantification sur les microplastiques flottants pourrait être due à leur solubilité plus importante dans l'eau mais également à la localisation des microplastiques à l'interface air-eau qui accentue leur probabilité de rencontre avec les polluants atmosphériques contaminants l'eau de surface. Les HAP associés aux microplastiques des stations A1 et M1 sont d'origine pyrolytique (ratio Flu/Pyr = 1,8 ± 0.7) et d'origine pétrogénique (ratio Flu/Pyr = 0,7) pour les stations A3 et M3 (Raoux, 1991; Sicre *et al.,* 1987). Ces ratios suggèrent l'adsorption d'HAP d'origine différente sur les microplastiques : HAP issus de la combustion incomplète de matière organique (carburant, bois, charbon, incinérateurs) pour les stations A1 et M1, et dérivés de produits pétroliers (activité portuaire, raffinerie, lessivage des infrastructures routières, marée noire) à la station A3 et M3 (Colombo *et al.,* 1989; Neff, 1979). Ce résultat est surprenant au regard de la localisation de ces sites au sein desquels une homogénéité par zone aurait été attendue avec d'un côté les stations A1 et A3 soumises à de fortes influences portuaires et maritimes, et d'un autre côté les stations M1 et M3 caractérisées par un mélange des eaux, et donc une origine *a priori* plus diverse des particules et polluants détectés. Les concentrations en HAP retrouvés sur les microplastiques flottants (nd – 1 586,2 ng g^{-1}) sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans les sédiments (88 - 3 241,43 ng g^{-1}), ce qui suggèrent des coefficients d'adsorption relativement similaire entre microplastiques et autre matrice solide. Des études précédentes ont en effet montré des coefficients de partition similaires (Velzeboer *et al.,* 2014) ou plus forts (Mato *et al.,* 2001) sur de la matière organique particulaire en suspension en comparaison aux microplastiques. En termes de comparaisons avec d'autres écosystèmes, les microplastiques flottants collectés en rade de Brest apparaissent contaminés dans les mêmes proportions que ceux collectés récemment dans le gyre Nord Pacifique (nd à 846 ng.g^{-1} de plastique pour la Σ16 HAP) (Rios Mendoza and Jones, 2015) (Tableau 3 ; Chapitre I - C).

La contamination par les PCB est une contamination ancienne mais rémanente puisqu'ils sont interdits d'usages en France depuis 1987, ce qui explique leur existence quasiment nulle sur les microplastiques. Les concentrations mesurées sur les microplastiques et les sédiments sont du même ordre de grandeur (27,6 ng g^{-1} et 0,06 – 12,71 ng g^{-1}, respectivement) même si la nature des congénères varie (uniquement CB-101 mesuré sur les microplastiques vs. les 7 PCB d'intérêt détectés dans le sédiment). La probabilité de trouver des microplastiques flottants ayant adsorbés des PCB est très faible, mais elle est accrue si ces derniers ont séjourné auparavant dans du sédiment contaminé qui constitue un réservoir à long terme (El-Shahawi *et al.,* 2010). Les concentrations en PCB détectées sur des plastiques flottants récemment collectés dans le gyre Nord Pacifique varient de 1 à 223 $ng.g^{-1}$ de plastique pour la Σ34 PCB alors que dans la présente étude, seul le congénère CB-101 a été détecté à une concentration de 27,6 $ng.g^{-1}$ et à une seule station (M1) (Rios Mendoza and Jones, 2015). Cependant, il semble difficile de faire une comparaison directe de la contamination des microplastiques par les PCB au vu des résultats de la présente étude : détection d'un seul congénère de PCB dans un seul pool de microplastiques.

Les composés de la famille des pesticides détectés diffèrent entre le sédiment et les microplastiques, la présence de DDT et de ses métabolites correspond à une contamination ancienne dans cette région mais rémanente d'où leurs présences dans le sédiment. Cependant comme pour les PCB, la probabilité de rencontre avec les microplastiques flottants est très faible sauf si ces derniers ont séjourné dans le sédiment puis remis en suspension par les conditions hydrodynamiques de la rade de Brest déjà discutées précédemment. L'alachlore et le s-métolachlore, qui sont des pesticides de la famille des amides, ont été mesurés sur les microplastiques collectés dans les zones de mélange des eaux marines et estuariennes et les zones à forte influence anthropique. Ce sont des herbicides organochlorés de la famille chimique des chloroacétamides, utilisés notamment dans le traitement des cultures de maïs et soja contre les graminées et les dicotylédones (INERIS, 2007). La présence de ces pesticides sur les microplastiques alors qu'ils n'ont été détectés ni dans l'eau de surface ni dans le sédiment de la rade suggère qu'ils ont probablement été adsorbés avant que les microplastiques se retrouvent dans le milieu marin, ou alors que l'adsorption dans le milieu marin est ancienne (possible rejet important de ces composés dans la rade à une date antérieure). Ces éléments suggèreraient la capacité des (micro)plastiques à introduire des contaminants d'origine agricole dans le milieu marin et à potentiellement véhiculer ces polluants sur de longues échelles d'espace et de temps. Les valeurs de pesticides mesurées en septembre-octobre 2014 (3 536,2 et 49 762,9 $ng.g^{-1}$) doivent être considérées avec précaution au vu de la très faible masse de l'échantillon (0.93 mg). La comparaison de ce résultats avec ceux d'études antérieures n'est pas possible : les composés détectés ici ne sont pas mentionnés dans les études déjà publiées où seules des valeurs de DDT et HCH apparaissent.

4.2.2. Influence de la masse des échantillons de microplastiques sur la quantification des contaminants chimiques adsorbés

Aucune des 3 familles de contaminants chimiques n'a pu être quantifiée sur les pools de microplastiques collectés dans le sédiment, et ce en dépit de la relativement forte contamination de cette matrice par les HAP, et dans une moindre mesure par les PCB et les pesticides (Tableau 9 et Tableau 11). Cela est probablement dû à la très faible masse de microplastiques collectés aux différentes stations (pool < 0,7 mg), suggérant la nécessité d'augmenter l'effort d'échantillonnage ou de développer des méthodes d'analyse plus sensibles pour les prochaines études qui s'intéresseront au dosage des contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques.

En ce qui concerne les microplastiques flottants, la masse de microplastiques comme facteur limitant dans la détection et la quantification des contaminants chimiques adsorbés est aussi identifiée. En effet, aucun contaminant chimique a pu être quantifié en dessous d'une masse de 35,54 mg (Tableau 9 et Tableau 11) à l'exception du pool de la station M3 (0,93 mg) de la campagne de septembre-octobre 2014. Ces données fournissent des éléments de réflexion à prendre en compte quant aux quantités d'échantillons minimales nécessaires pour réaliser ce type de dosage chimique de manière exhaustive.

Parmi les pools de microplastiques flottants présentant des niveaux de HAP, PCB et/ou pesticides quantifiables, il ne semble pas exister de relation directe entre la masse de microplastiques et la quantité des contaminants chimiques identifiés. En effet, en septembre-octobre 2014, la station A1 (zone fortement urbanisée) contient une masse de microplastiques (67,92 mg) 5 fois inférieure à celle de la station M1 (zone de mélange des eaux, masse pool = 325,71 mg) alors que sa concentration en HAP est 5 fois plus importante (Tableau 9 et Tableau 11). De même, la station M3 échantillonnée pendant la même campagne présente une concentration maximale de pesticides (49762,9 $ng.g^{-1}$ de microplastiques) alors que la masse de microplastiques au sein du pool est égale à 0,93 mg, bien inférieure à la masse du pool A2 (36,54 mg) qui présente une concentration en pesticides de 3536,2 $ng.g^{-1}$ de microplastiques. Comme cela a été suggéré par van Franeker *et al.* (2011) lors de son étude sur les plastiques ingérés par le fulmar boréal (*Fulmarus glacialis*), il ne semble pas exister de relation observable entre la masse de microplastiques et la concentration en contaminants chimiques sur les plastiques. D'autres facteurs entrent donc en jeu dans les niveaux de contamination observés sur les pools de microplastiques prélevés en rade de Brest : leur histoire de vie (origine, trajectoires, temps de résidence, état de dégradation) qui influence par définition leur interaction avec différents contaminants comme suggéré par Antunes *et al.* (2013) qui ont montré une corrélation positive entre le jaunissement des pellets (indicateur de la dégradation des pellets et de leur temps de résidence) collectées sur les plages du Portugal et les concentrations en HAP et PCB. De plus, la nature des polymères présents au sein de chaque pool peut aussi influencer la quantité de contaminant adsorbé. En effet, (Endo *et al.,* 2005) ont montré que les pellets de PE avaient tendance à concentrer plus les

PCB que les pellets de PP. Dans notre étude, le jeu de données ne permet pas de réaliser des statistiques robustes mais la variabilité de proportions des différents types de polymères (PE, PP et PS) au sein de chaque pool de microplastiques ne semble pas favoriser l'adsorption d'une famille de contaminants chimiques par rapport à une autre, ni même influencer les quantités adsorbés sur les microplastiques (Tableau 9 et Tableau 11).

5. Conclusion

La rade de Brest est un environnement marin côtier dont les sédiments sont faiblement (pesticides, PCB) à modérément (HAP) contaminé par les molécules ciblées au cours de cette étude (HAP, PCB et pesticides). Quelle que soit la famille de contaminants chimiques recherchée dans cette étude, les stations présentant les plus hauts niveaux de contamination se situent dans la partie nord de la rade de Brest, au niveau de l'estuaire de l'Elorn et à proximité de la zone urbaine et portuaire.

Au regard du caractère hydrophobe des contaminants ciblés dans cette étude, le sédiment constitue une matrice plus intégratrice et pertinente que la surface de l'eau. Les concentrations en HAP, PCB et pesticides mesurées sur les microplastiques flottants sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans le sédiment et le biote, ce qui suggère un risque faible dans le transfert de ces contaminants chimiques vers le biote en cas d'ingestion de microplastiques. Cet aspect sera discuté plus en détail dans la discussion générale au regard des premières données présentées dans le Chapitre IV - B sur les niveaux de microplastiques retrouvés dans la macrofaune de la rade de Brest. La présence de pesticides agricoles sur les microplastiques, qui n'ont pas été quantifiés dans les matrices environnementales, suggère leur capacité à introduire des contaminants chimiques dans l'environnement marin. Les valeurs maximales de contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques ont systématiquement été retrouvées dans les zones caractérisées par des activités anthropiques intenses (A1 - A3) et des brassages des masses d'eau de surface (M1 - M3). Cependant, la faible proportion d'échantillons de microplastiques présentant des niveaux quantifiables ne permet pas de définir de tendance spatio-temporelle forte. Il ne semble pas y avoir de relation entre la masse et la famille de polymère d'une part, et la nature et les concentrations en contaminants chimiques recherchés d'autre part. Enfin, les données présentées dans ces travaux suggèrent que la masse de microplastique peut être un facteur limitant dans la mesure des contaminants chimiques recherchés, ce qui constitue un verrou technique majeur qui mériterait des développements technologiques ou l'adaptation de telles approches.

Afin de poursuivre ces travaux sur le rôle des microplastiques comme vecteurs de contaminants chimiques, un effort supplémentaire serait à faire sur les plans d'échantillonnage des microplastiques, notamment en ciblant les zones les plus contaminées en microplastiques en rade de Brest, et fonction

de la contamination par des familles de contaminants chimiques. Cette étude préliminaire avait pour but de rechercher un large spectre de contaminants chimiques afin de faire un inventaire de la contamination chimique associée aux microplastiques présents de la rade de Brest. Il serait intéressant de compléter cette étude en élargissant la liste des contaminants chimiques recherchés à des composés déjà répertoriés dans la littérature comme étant associés aux microplastiques (PBDE, métaux, nonylphénol, phtalates, bisphénol A). De plus, en ce qui concerne la famille des pesticides, il serait intéressant de cibler les plus utilisés dans les bassins versants de la rade de Brest, mais aussi en complétant cette liste avec les métaux et les résidus de médicaments. Enfin, il serait également intéressant de mesurer la contamination chimique d'autres matrices comme la matière en suspension ou des organismes marins de niveaux trophiques supérieurs pour estimer la bioaccumulation de ces composés tels que les additifs plastiques.

- CHAPITRE VI -

Conclusions générales et perspectives

En 2008, la France s'est engagée à atteindre le « Bon Etat Ecologique » (BEE) de ses régions marines d'ici 2020, suite à l'adoption de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (Galgani *et al.,* 2010). Les régions marines françaises sont la Méditerranée occidentale et l'Atlantique du nord-est qui est, quant à elle, divisée en trois sous-régions marines : la mer Celtique, le Golfe de Gascogne et la Manche - Mer du Nord dont fait partie la rade de Brest. La mise en place de la DCSMM a commencé par une évaluation initiale de l'état écologique des régions marines concernées et de l'impact environnemental des activités humaines sur ces régions, basée sur 11 descripteurs qualitatifs. Les déchets marins, dont font partie les microplastiques, s'intègrent dans le descripteur 10 « Propriétés et quantités de déchets marins ne provoquant pas de dommages à l'environnement côtier marin » (Galgani, 2012). Les travaux menés dans le cadre de cette thèse correspondent à ce descripteur et plus précisément à l'indicateur 10.1.3. concernant « les tendances des quantités et de la composition des microparticules (en particulier les microplastiques) dans les eaux marines » (Galgani, 2012). L'évaluation initiale, coordonnée par Ifremer, en Manche - Mer du Nord a mis en évidence des sources multiples de déchets marins et surtout un besoin de poursuivre l'acquisition de données sur ces derniers, notamment sur la partie flottante de ces déchets, qui étaient quasi-inexistantes (Galgani, 2012).

La région Bretagne et l'ensemble des acteurs de la mer et du littoral ont élaboré une charte des espaces côtiers bretons, adoptée par le conseil régional en 2007. Les règles de cette charte consistent à mettre en place une gestion intégrée de la zone côtière, qui est à la fois un espace de travail, un lieu de vie et un réservoir de biodiversité (Région Bretagne). L'engagement de Brest Métropole dans la gestion durable de sa zone côtière, via la signature de cette charte, renforce la dimension socio-économique de ces travaux de thèse.

Les travaux réalisés au cours de la thèse, présentés dans les précédents chapitres, ont permis d'établir une évaluation initiale de la contamination par les microplastiques de la rade de Brest, un système côtier macrotidal semi-fermé soumis à une forte activité anthropique. Les résultats issus de cette première évaluation sont synthétisés dans le schéma de la Figure 30 et seront repris tout au long de ce chapitre.

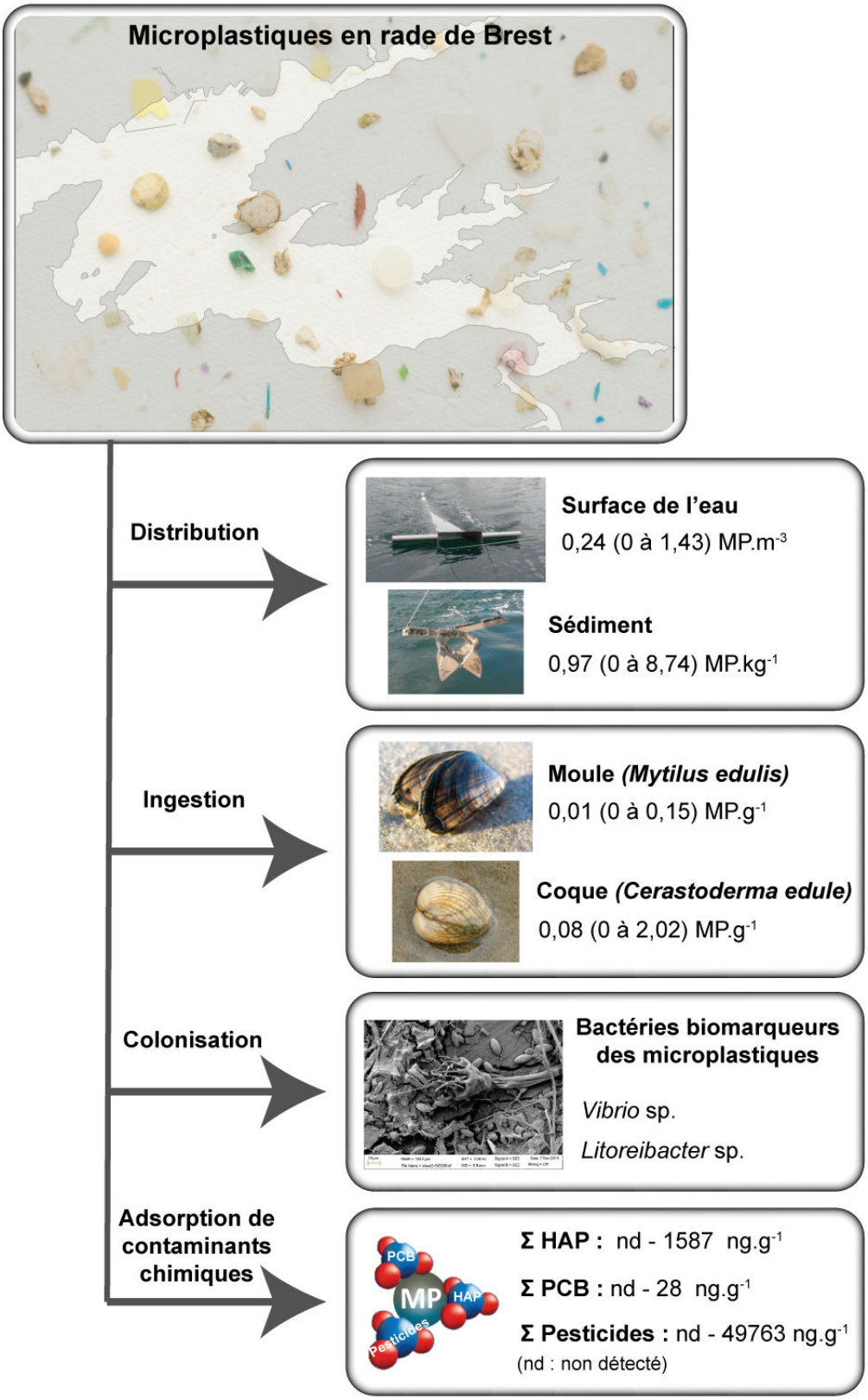


Figure 30 : Schéma de synthèse des résultats sur la contamination de la rade de Brest par les microplastiques obtenus à l'issue des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

L'écosystème de la rade de Brest est contaminé par les microplastiques.

Le Chapitre IV a montré que la contamination des matrices abiotiques et biotiques de la rade de Brest sont à l'heure actuelle relativement faibles. (Figure 30). En effet, les valeurs de contamination observées dans l'eau de surface (0,24 ± 0,35 MP.m^{-3} ; fibres exclues ; 22 % des particules non identifiées) restent très inférieures à celles provenant d'autres régions particulièrement impactées par la pollution plastique comme les estuaires en Mer de Chine (Yanghze, Jiaojiang, Oujiang et Minjiang) (100 à 10200 MP.m^{-3}) (Zhao *et al.,* 2014, 2015), en Corée du Sud (Goeje Bay; 0,62 à 860 MP.m^{-3}) (Kang *et al.,* 2015), dans les eaux côtières californiennes (7,25 MP.m^{-3}) (Moore *et al.,* 2002) et les eaux marines du gyre subtropical Pacifique Nord (2,23 MP.m^{-3}) (Moore *et al.,* 2001). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles provenant d'autres systèmes estuariens comme l'estuaire de Goiania au Brésil (0.26 MP.m^{-3}) (Lima *et al.,* 2014) ou l'estuaire Tamar en Angleterre (0.27 MP.m^{-3}) (Cole *et al.,* 2014) mais également certaines valeurs observées dans le Golfe d'Oristano en mer de Sardaigne (Méditerranée occidentale ; 0,15 MP.m^{-3}) (de Lucia *et al.,* 2014). Bien que la contamination de l'eau de surface de la rade soit faible à modérée, celle-ci n'est pas pour autant négligeable. En effet, une extrapolation à partir des données *in situ* et de la valeur moyenne de contamination de la surface de l'eau, la contamination moyenne à l'échelle de la rade est estimée à 8 640 000 microplastiques (ou 11,88 kg). L'apparente faible contamination des sédiments subtidaux de la rade par les microplastiques (0,97 ± 2,08 MP.kg^{-1} masse sèche ; fibres exclues) (Figure 30) est potentiellement liée aux activités anthropiques (activités de pêche), et à l'hydrodynamisme de la rade. En effet, ces deux facteurs participent à la remise en suspension régulière du sédiment et à un taux de sédimentation faible (jusqu'à 0,5 cm.an^{-1} à l'embouchure des fleuves) (Ehrhold *et al.,* 2016). Cependant, cette faible contamination du sédiment peut également être reliée à l'importante proportion de particules non identifiées (67 %) et à l'exclusion des fibres. Enfin, la macrofaune de la rade de Brest, représentée ici par les bivalves filtreurs *Mytilus edulis* (moule) et *Cerastoderma edule* (coque) semble également peu contaminée par les microplastiques (0,01 ± 0,04 MP.g^{-1} et 0,08 ± 0,34 MP.g^{-1} de chair humide pour les moules et les coques, respectivement) (Figure 30). Cela peut être dû à la faible contamination de la rade, mais également à l'importante proportion de particules non identifiées (37 - 41 %), comme dans le sédiment. L'intérêt d'évaluer dans un premier temps la contamination des bivalves filtreurs est que ces organismes marins filtrent de grands volumes d'eau (3 - 5 l.h^{-1} pour les moules ; Zippay and Helmuth, 2012) et sont donc plus susceptible d'être exposés aux microplastiques présents dans la colonne d'eau. Ces consommateurs primaires représentent une source de nourriture pour de nombreuses espèces et peuvent donc être un apport indirect de microplastiques dans la chaîne trophique, comme cela a été montré expérimentalement chez le crabe vert (Farrell and Nelson, 2013). De plus, l'étude et le suivi de la contamination des coquillages présentent un intérêt économique et sociétal fort de part leur importante production nationale et locale pour la consommation humaine

(environ 216 917 t en poids vif pour 2014 ; mytiliculture = 49 % de la production nationale de coquillages) (FranceAgriMer, 2017). Les données concernant les forts consommateurs français sont de 1200 $g.an^{-1}$ de moules (chair humide). Sachant que les moules de la rade de Brest contiennent en moyenne 0,01 $MP.g^{-1}$ (fibres exclues), cela permet d'en déduire qu'un fort consommateur français peut être exposé à 12 MP. an^{-1} à partir des contaminations détectées ici. L'estimation de cette exposition est très inférieure à celle des consommateurs belges, estimée à 11 000 $MP.an^{-1}$ pour un gros consommateur (parmi les 5 % plus gros consommateurs) et à 2 200 $MP.an^{-1}$ pour un consommateur belge moyen (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). L'ensemble de ces données suggère des niveaux de contamination des matrices environnementales de la rade de Brest par les microplastiques relativement faibles, et ce quelque soit la matrice environnementale considérée. Ces faibles niveaux de contamination peuvent être liés à une pression anthropique relativement modérée, au regard d'autres écosystèmes plus impactés (mer Méditerranée, baie de Rio, ou encore les estuaires en mer de Chine). Toutefois, ces valeurs peuvent être aussi liées aux limites imposées par les méthodologies utilisées dans le cadre de ces travaux (fibres exclues, 37 à 67 % de particules non identifiées). Ce point sera abordé un peu plus loin, dans la partie « Propositions méthodologiques issues de ces travaux ».

Les niveaux de contamination de l'environnement marin sont dépendants de la production annuelle de plastique et de leur gestion de fin de vie. En effet, Jambeck *et al.* (2015) prévoient une augmentation d'un ordre de grandeur des entrées de déchets plastiques dans l'océan via les zones côtières (estimées entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes en 2010) d'ici 2025. Les valeurs obtenues au cours de la thèse ne sont donc pas figées et les travaux *in situ* doivent être poursuivis sur le long terme afin de suivre l'évolution de ces niveaux de contamination. Il serait également intéressant d'y intégrer des prélèvements ponctuels en cas de contamination accidentelle ou suite à un évènement météorologique particulier (pluviométrie importante, tempête) afin d'évaluer leur potentielle influence sur le niveau de contamination moyen de la rade et les caractéristiques des microplastiques collectés. Ensuite, une identification des points de sources potentielles et une évaluation des flux d'entrée des microplastiques en rade de Brest sont nécessaires afin de pouvoir axer au mieux les actions de prévention nécessaires pour réduire l'impact de cette contamination sur la rade de Brest. Pour cela, l'effort d'échantillonnage devrait être concentré sur les réseaux d'assainissement des STEP (niveau de contamination des eaux entrantes et sortantes), et notamment lors de déversements occasionnels en cas de fortes pluies. Les eaux continentales des bassins versants peuvent aussi représenter une voie d'apport de microplastiques dans la rade où ils se jettent. Leur rôle dans l'apport de microplastiques en rade de Brest doit être identifié, notamment lors des périodes de crue et d'étiage. Cela pourrait également être accompagné d'une évaluation du flux de microplastiques en provenance de la mer d'Iroise, avec notamment le suivi de la contamination des anses localisées à l'extérieure du Goulet qui pourraient concentrer les débris flottants arrivant de la mer d'Iroise avant de les rendre disponibles pour entrer en rade au cours du flot. Une première information concernant le temps de résidence de microparticule en rade de Brest

a été fournie par les travaux de modélisation menés dans le cadre de la thèse qui ont montré une évacuation en mer d'Iroise de plus de 60 % des particules quelque soit leur point d'injection (estuaires de l'Elorn et de l'Aulne, la baie de Daoulas, le sud et le centre de la rade), le cycle de marée (morte eau et vive eau) et le débit des fleuves (période de crue et étiage). Cela laisse supposer que le temps de résidence des microplastiques en rade pourrait être très court. Cependant, il faut renforcer l'acquisition de données *in situ* afin de poursuivre le développement des modèles hydrodynamiques en y intégrant les données sur les flux et les caractéristiques (taille, densité, forme, fouling) des microplastiques en rade. Cela permettra d'obtenir des informations sur la dispersion des microplastiques en rade à une résolution spatiale plus fine et surtout sur leur comportement dans la colonne d'eau. Afin d'avoir un aperçu de la contamination générale de la rade de Brest par les microplastiques, le niveau de contamination de deux matrices environnementales, qui n'ont pas été prises en compte dans ces travaux de thèse, pourrait être évalué : les sédiments intertidaux (estrans sableux, rocheux, vaseux) bordant la rade de Brest et la colonne d'eau. Enfin, ce qui concerne l'évaluation de la contamination du biote par les microplastiques, le plan d'échantillonnage a consisté à concentrer les prélèvements dans la partie nord de la rade où les concentrations en microplastiques sont plus importantes et donc la probabilité de prélever des organismes ayant ingérés des microplastiques est la forte. Cette première évaluation, qui est en cours d'analyse, consiste à déterminer si les microplastiques en rade de Brest sont ingérés par des organismes marins de différents niveaux trophiques (consommateurs primaires et secondaires) et vivant dans des habitats distincts (estran sableux, rocheux et vaseux, et zone pélagique). Cependant, ces travaux donneront une image ponctuelle de la contamination locale. L'intégration, par la suite, d'une dimension spatiale (comparaison entre le nord fortement urbanisé et le sud peu urbanisé de la rade), temporelle (périodes d'étiage et de crue, saison touristique, suivi annuel) et biologique (cycle de vie des organismes, sexe, taille), mais également en y incluant les facteurs anthropiques (proximité aux sources : zone urbanisées et parcs aquacoles) et les variables environnementales (salinité, température) pourrait apporter une information plus complète sur la contamination du biote de la rade de Brest (Underwood *et al.,* 2017). La majorité des propositions de poursuite de travaux *in situ* présentée dans ce paragraphe sont prévus dans le cadre du projet en cours FUI LABOCEA (2016 - 2019).

Bien que ces travaux mettent en lumière une contamination de l'écosystème de la rade de Brest, ils ne permettent pas de statuer sur la potentielle menace qu'ils peuvent représenter pour cet écosystème. En effet, la contamination de la rade a bien été montrée, mais rien ne permet pour le moment d'en déduire qu'elle est polluée par les microplastiques, ce qui pourrait être fait par exemple en mesurant une modification de la réponse biologique face à ce contaminant émergent. La mesure du risque nécessite maintenant des travaux plus poussés sur le biote en suivant son niveau de contamination sur le long terme dans le but d'évaluer les possibles impacts écologiques induits par ces microparticules sur l'ensemble de la hiérarchie du vivant *in situ*. En d'autres termes, il faudrait démontrer que les

potentiels impacts quantifiés aux niveaux des populations (taille et succès de reproduction) et de l'assemblage des communautés biologiques (structure et dynamique) sont liés à ceux induits au niveau de l'individu par des microplastiques (physiologie, cellule et molécule) (Underwood *et al.,* 2017).

En conclusion, cette première partie a montré que l'étude de la contamination de la rade de Brest par les microplastiques nécessite la mise en place d'un système d'observation sur le long terme. La mise en place de projets de sciences participatives en rade de Brest permettrait, en plus de sensibiliser la communauté non scientifique à cette thématique, de faire face aux moyens de navigation qui sont généralement limités et de multiplier les prélèvements *in situ* en couvrant des échelles spatiales et temporelles beaucoup plus vastes (Collignon *et al.,* 2012; Hidalgo-Ruz and Thiel, 2015; Ogata *et al.,* 2009; Pedrotti *et al.,* 2016; Zettler *et al.,* 2017). Ces projets peuvent être développés localement avec l'implication des acteurs locaux comme les pêcheurs, usagers récréationnels et les touristes. Ce type de projet existe déjà en France, notamment en ce qui concerne les plages, avec par exemple le programme Initiatives Océanes de l'ONG Surfrider Foundation Europe qui est une plateforme de mobilisation citoyenne qui permet, via les sciences participatives, la collecte de données sur les déchets aquatiques à l'échelle de l'Europe pour les scientifiques, tout en nettoyant les plages. Un autre exemple, celui de l'Opération déchets côtiers menée par l'ONG Expédition MED qui a permis de catégoriser et quantifier les déchets côtiers collectés sur 14 plages de l'arc atlantique, mais également de fournir des informations concernant l'origine et les sources de ces déchets (Expédition MED, 2016). En ce qui concerne les débris de plastiques flottants, l'ONG Expédition MED a permis, via les sciences participatives, de fournir des données sur la contamination de la Méditerranée occidentale par les microplastiques depuis 2010 (Collignon *et al.,* 2012; Pedrotti *et al.,* 2016). Enfin, la démarche éco-citoyenne « Objectif Plancton », mise en place en rade de Brest, de Lorient et de Concarneau, permet de réaliser un suivi de la qualité de l'eau 4 fois par an via des prélèvements et mesures simples grâce au concours des plaisanciers. Les prélèvements de microplastiques ont été intégrés dans les suivis réalisés à Concarneau. Il est donc envisageable d'essayer d'intégrer un suivi des microplastiques flottants dans la rade de Brest, au sein de cette démarche éco-citoyenne.

Les microplastiques sont un substrat solide émergent dans l'environnement marin capable d'absorber les contaminants chimiques mais également d'être colonisés par les bactéries

Les travaux présentés dans le Chapitre V ont montré que les microplastiques flottants collectés en rade de Brest avait adsorbés des contaminants chimiques (PCB, HAP et pesticides) et étaient colonisés par des communautés bactériennes. Malgré des niveaux de contamination en microplastiques apparemment faibles dans les matrices environnementales, il est essentiel de prendre en compte la nature et la quantité des contaminants chimiques et biologiques véhiculés par ces particules pour pouvoir statuer sur la menace qu'ils représentent pour un écosystème tel que la rade de Brest.

En termes de contaminants chimiques organiques (HAP, PCB et pesticides) (Figure 30), bien que certains composés (pesticides) soient détectés exclusivement sur les microplastiques, et que les concentrations de HAP et PCB retrouvées sur les microplastiques flottants soient parfois supérieures à celles des matrices environnementales (notamment en ce qui concerne les PCB pour le sédiment, et les HAP pour le biote), le risque potentiel que les microplastiques représentent dans le transfert de ces contaminants vers les organismes marins doit être modéré avec le volume que chacune de ces matrices occupent dans l'écosystème étudié qu'est la rade de Brest (Gouin *et al.,* 2011; Koelmans *et al.,* 2016). En effet, la masse d'eau de la rade de Brest est 3,22 10^{10} fois plus importante que celle estimée occupée par les microplastiques flottants (0,33 $mg.m^{-3}$) à partir des données *in situ* collectées dans cette étude. De ce fait, le risque que représentent les microplastiques dans le transfert de contaminants chimiques dans les organismes marins reste très faible dans ce système côtier, mais également dans d'autres systèmes côtiers comme les îles hawaïennes du nord-ouest où le volume des masses d'eaux est $6{,}55.10^{10}$ fois supérieur à celui des plastiques (Gouin *et al.,* 2011). Dans les océans, Koelmans *et al.* (2016) ont estimé que la masse d'eau est 10^{13} fois plus importante que celle des déchets plastiques, et en ce qui concerne les matrices solides pouvant véhiculer des contaminants organiques hydrophobes, ces ratios sont de 10^5, 10^4 et 10^3 pour la matière détritique, le phytoplancton et le zooplancton, respectivement. Ces travaux de thèse ont pour la première fois tenté de doser des contaminants chimiques ciblés (HAP, PCB et pesticides) sur des microplastiques flottants de petites tailles (0,3 à < 1 mm), ce qui a révélé des difficultés dû à la faible masse de microplastiques disponible. En effet, les données de contamination chimique des microplastiques concernent majoritairement des GPI (70 %), collectés principalement sur les plages qui représentent 78 % des matrices échantillonnées dans les études s'intéressant aux contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques. Une récente review montre que les masses de plastiques utilisées pour les dosages de composés chimiques varient de 0,15 à 5 g (Hong *et al.,* 2017). Cela met en lumière la nécessité de

développer des analyses sur des masses de microplastiques plus faibles, notamment représentées par les plus petites fractions de taille (< 1 mm) pour lesquels peu de données sont disponibles (Hong *et al.,* 2017). Les travaux menés dans le cadre de la thèse ont permis de développer des méthodes d'extraction de contaminants chimiques sur des masses de microplastiques plus faibles allant jusqu'à 37 mg en limite inférieure. Des développements méthodologiques supplémentaires sont en cours au Cedre afin d'affiner les méthodes de détection et de quantification pour obtenir des informations sur des masses de plastiques de l'ordre du mg. Cela pourrait permettre de déterminer les contaminants chimiques adsorbés sur les microplastiques collectés dans les matrices environnementales telles que le sédiment subtidal et le biote de la rade de Brest, où les quantités et masses de plastiques disponibles sont faibles. Cela permettrait également de pouvoir séparer les différentes familles de polymères dans le but de savoir si une affinité plastiques - contaminants chimiques peut être détectée dans l'environnement marin, comme cela a été montré lors d'études expérimentales, mais également selon les classes de tailles (Brennecke *et al.,* 2016; Endo *et al.,* 2005; Holmes *et al.,* 2012; Karapanagioti and Klontza, 2008; Teuten *et al.,* 2007). Cette possible affinité entre différents types de microplastiques avec les contaminants chimiques présents en rade, ainsi que la dynamique d'adsorption et/ou désorption des contaminants chimiques et/ou additifs, peut aussi être suivi *in situ* en rade de Brest en mettant dans des filets, à plusieurs points stratégiques de la rade (zone urbanisée, zone estuarienne, parc aquacole), différentes formes (GPI, fragments et fibres), tailles (5 - 2 mm, 2 - 1 mm, 1 - 0,3 mm et < 0,3 mm) et familles (au moins les polymères appartenant aux « big six ») de microplastiques. Ce type d'expérience *in situ* serait d'autant plus intéressante qu'elle permettrait de suivre l'influence d'évènements exceptionnels (tempêtes, dragages, travaux portuaires) sur la remise à suspension des contaminants chimiques présents au niveau de la matrice sédimentaire de la rade de Brest, mais également les rejets accidentels, et le rôle des microplastiques dans le captage de ces contaminants. Enfin, la quantification de pesticides sur les microplastiques qui n'ont pas été quantifiés dans les matrices environnementales soulève la question des microplastiques comme vecteur potentiel de contaminants chimiques en rade de Brest. Il serait intéressant de poursuivre ces analyses en ciblant les recherches sur les pesticides les plus utilisés sur les bassins versants de la rade, mais également en élargissant les champs de recherche à d'autres familles de contaminants chimiques représentant une menace pour les écosystèmes marins (métaux, PBDE, HBCD, PFOA, TBT, NP, bisphénol A, phtalates, styrène).

Enfin, ces travaux de thèse ont également montré que les microplastiques flottants collectés en rade de Brest étaient colonisés par des communautés bactériennes qui sont distinctes de celles retrouvées dans l'eau de surface (Figure 30). Les données obtenues montrent deux genres de bactéries biomarqueurs discriminants des microplastiques, *Litoreibacter* sp. et *Vibrio* sp. Une attention particulière est accordée à cette dernière car certaines souches de *Vibrio* peuvent être pathogènes pour les organismes marins (*V. coralliilyticus, V. harveyi, V. splendidus, V. aestuarianus* et *V. crassostreae*) et l'homme

(*V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus et V. alginolyticus)* et peut donc présenter une menace en cas de transfert vers le biote (Kirstein *et al.,* 2016; Schmidt *et al.,* 2014). Des analyses subséquentes sont en cours en collaboration avec LABOCEA (Laboratoire public, Conseil, Expertise et Analyse en Bretagne) afin d'identifier la présence ou non de souches pathogènes des bivalves marins parmi les *Vibrio* identifiés au sein des bactéries colonisant les microplastiques (Bidault *et al.,* 2015; Le Roux *et al.,* 2016). Enfin élargir les recherches sur la colonisation des microplastiques aux virus (herpès virus OsHV-1) et aux eucaryotes, et notamment se focaliser sur le phytoplancton toxique (*Pseudonistchia*, A*lexandrium*), qui pose problème en rade depuis quelques années et entrainant l'interdiction de la pêche de certaines espèces commerciales de bivalves (coquille Saint-Jacques, huîtres) (Chapelle *et al.,* 2014; Fleury, 2015; REPHY, 2016). Enfin, les différentes étapes de colonisation des microplastiques, et de ce fait le temps de résidence de certaines souches de bactéries (notamment les *Vibrio* pathogènes, si leur présence est confirmées) présentant une menace pour la rade de Brest pourrait être étudié via le déploiement de GPI en rade de Brest. En ce qui concerne les communautés bactériennes colonisant les microplastiques, les travaux présentés dans le précédent chapitre ont permis de montrer une différence de colonisation entre les polymères (PS différent de PE et PP). Ce résultat nécessite d'être approfondi en augmentant le nombre de microplastiques disponibles par condition de manière à avoir suffisamment d'échantillons représentatifs des principales familles de polymères selon plusieurs classes de taille, ainsi que le nombre de réplicats. L'intérêt porté sur les petites fractions de microplastiques est qu'elles sont susceptibles d'être ingérées par les bivalves dont de nombreuses espèces sont emblématiques de la rade de Brest et sont des espèces commerciales donc données d'un intérêt économique et sociétal (huîtres, coques, moules, pétoncles, coquilles Saint-Jacques). La notion de plastisphere doit être utilisée avec précautions, dans le cadre de ces travaux, car la comparaison a été réalisée avec l'eau de surface sans effectuer de séparation entre les bactéries libres et celles associées aux particules en suspension. Or, Oberbeckmann *et al.* (2016) n'ont pas observé de différence significative entre les communautés bactériennes associées au PET et celles associées aux particules en suspension, ainsi qu'au verre. Une comparaison des communautés bactériennes associées aux microplastiques avec d'autres matrices marines solides comme le sédiment subtidal, le phytoplancton et la matière détritique permettrait de confirmer ou infirmer ce terme de plastisphere pour la rade de Brest, mais également si les *Vibrio* sont uniquement des biomarqueurs des microplastiques.

Propositions méthodologiques issues de ces travaux

L'estimation du niveau de contamination des matrices environnementales par les microplastiques peut être affectée par des facteurs environnementaux mais également par la multitude d'approches existantes qui interviennent lors de la mise en place du plan d'échantillonnage (choix des sites de prélèvement, suivi spatio-temporel), l'étape de prélèvement (proximité des sources de microplastiques, types de microplastiques, méthodes de prélèvement) et au cours de l'étape analytique des échantillons (méthodes d'extraction, de détection, de description, d'identification de la matrice moléculaire et de quantification des microplastiques) (GESAMP, 2016).

Les techniques de prélèvements influencent les estimations de la contamination de l'environnement aquatique par les microplastiques.

Le choix des différentes méthodes de prélèvements de l'eau de surface est fortement dépendant de l'objectif et de la faisabilité des travaux à mener. Dans le cadre de cette première évaluation, l'utilisation d'un filet Manta pour l'échantillonnage de la surface de l'eau (20 premiers centimètres de la colonne d'eau ; 20 min à 3 nœuds) de la rade de Brest présentait l'avantage de pouvoir filtrer de grands volumes d'eau (plusieurs centaines de m^3) permettant de concentrer les débris flottants dans le filet et donc les microplastiques, ce qui est indispensable en cas de faible contamination de cette région marine. Cela a également permis d'échantillonner la surface de l'eau à grande échelle (plusieurs km^2) et donc une homogénéisation dans la distribution microplastiques en cas de fortes disparités à petite échelle (Barrows *et al.,* 2017). Cependant, cette méthode de prélèvement présente certaines contraintes et limites. En cas de conditions météorologiques défavorables (échelle de Beaufort > 3), le filet Manta n'a pas été déployé afin de ne pas fausser les estimations des quantités de microplastiques en surface. En effet, les turbulences créées entraînent un brassage de la couche de surface et donc une distribution des microplastiques flottants dans les trois premiers mètres de la colonne d'eau (Kooi *et al.,* 2016; Kukulka *et al.,* 2012; Reisser *et al.,* 2015). De plus, l'utilisation de ce type de filet limite la taille des particules collectées en fonction du maillage utilisé. Dans cette étude la fraction de particules < 335 µm n'a pas pu être estimée, hors cette fraction est loin d'être négligeable. Suaria *et al.* (2016) ont montré que la fraction 200 - 300 µm représente une part non négligeable (26 %) des débris plastiques collectés à la surface de l'eau en Méditerranée (taille des particules collectées : 0,2 à 20 mm). Norén (2007) et Song *et al.* (2014) ont montré que la mise en œuvre d'un filet disposant d'un maillage plus fin (80 et 50 µm, respectivement) permettrait d'inclure les plus petits microplastiques (taille < 335 µm), et donc de considérablement accroître les

concentrations en microplastiques estimées. Cependant, cela inclut également certaines contraintes comme un colmatage plus rapide du filet, réduisant les volumes d'eau prélevés et entraînant une charge plus importante de matière organique et inorganique dans les échantillons. Une autre méthode de prélèvement est utilisée dans l'évaluation du niveau de contamination de la couche d'eau de surface par les microplastiques. Elle consiste à prélever un volume d'eau (1 à 100 l) directement stocké en bouteille, cela permet de palier à la limite de taille contrainte par l'utilisation de filet (Barrows *et al.,* 2017). Dans l'étude conduite par Barrows *et al.* (2017), les concentrations en microplastiques étaient supérieures dans des prélèvements directs de volumes d'eau (1 à 100 l) que dans ceux réalisés à l'aide d'un filet Manta (un ordre de grandeur inférieur), suggérant ainsi que ce dernier entraîne une sous-estimation de la contamination de la surface de l'eau par les microplastiques. De même, ces auteurs ont montré une proportion en petits microplastiques (100 µm à 1,5 mm) plus importante dans les prélèvements de 1 l d'eau de surface, alors qu'une proportion plus élevée de grands micro- et mésoplastique (3,2 – 9,6 mm) était observée dans les prélèvements avec un filet Manta. Cependant, ces deux méthodes de prélèvement alternatives (prélèvement direct de plusieurs litres d'eau ou utilisation d'un filet à mailles très fines) ne permettent pas de filtrer de grands volumes d'eau, et sont donc fortement influencées par la variabilité à petite échelle de la distribution des microplastiques. . Le prélèvement de plusieurs litres d'eau nécessite de la place pour le stockage à bord du navire, notamment dans les zones peu contaminées où des volumes importants devront être prélevés. En plus d'influencer les estimations des quantités de microplastiques, la méthode d'échantillonnage de l'eau de surface peut influencer le type de particules (famille de polymères, taille et forme) collectées (Song *et al.,* 2014). En effet, Song *et al.* (2014) ont montré que le PSE pouvait représenter 96 % des particules collectées via un filet Manta, contre seulement 2,8 % lors d'un prélèvement de 100 l d'eau de surface non tamisés et directement stockés en bouteille. De ce fait, dans le cas où la contamination de la région marine par les microplastiques est établie et que la volonté est d'obtenir des informations sur la fraction de microplastiques inférieure à 335 µm, il serait intéressant d'utiliser un filet à plancton disposant d'une maille fine (< 80 µm) pour des zones peu contaminées afin de concentrer l'échantillon, et d'utiliser le prélèvement de plusieurs litres d'eau de surface pour les zones fortement contaminée et où la probabilité de collecter des microplastiques est forte. Afin de recouvrir la menace que représente la contamination par les microplastiques pour la rade de Brest, il serait donc intéressant de compléter ces travaux avec un suivi de son niveau de contamination par les par les plus petites fractions de microplastiques (< 335 µm). Et dans le cas où les développements méthodologiques pour l'étude des nanoplastiques dans l'environnement marin aboutiraient, l'acquisition de données concernant ces particules permettrait d'avoir une vision globale de la contamination plastique de la rade de Brest (ANR Nanoplastics « Microplastics, nanoplastics in the marine environment : characterization, impacts and sanitary risk assessment » en cours).

Dans le cadre de la thèse, une benne Van Veen a été déployée pour évaluer le niveau de contamination des sédiments de la rade de Brest. L'avantage de cette méthode de prélèvement est qu'elle permet de collecter des volumes importants de la couche de surface du sédiment (plusieurs kg, ou une surface d'environ 250 cm^2) ainsi que les particules en suspension dans l'eau juste au dessus du sédiment. Cependant, cette approche ne prend pas en compte la contamination des couches plus profondes du sédiment en cas de taux de sédimentation important. Hors, Claessens *et al.* (2011) ont prélevé des carottes de sédiment le long du littoral belge et ont montré que 40 % des microplastiques étaient contenus dans les 8 premiers centimètres, contre 65 % dans les 16 premiers centimètres. De même, Turra *et al.* (2014) ont montré que des GPI étaient présentes jusqu'à 2 m de profondeur sur les plages de la Baie de tous les Saints (Brésil) et que moins de 10 % des GPI ont été collectées dans la couche de surface du sédiment. Le choix de la méthode de prélèvement est une fois de plus dépendant des objectifs et de la faisabilité des travaux de recherche. Lorsqu'une première évaluation du niveau de contamination des sédiments marins par les microplastiques doit être réalisée, l'utilisation d'une benne de prélèvement type Van Veen semble être la meilleure solution pour collecter un volume important de sédiment. Il serait également intéressant de coupler cette méthode de prélèvement à un système de pompage des premiers centimètres de la couche d'eau située juste au-dessus du sédiment afin de collecter les particules tout juste déposées sur le sédiment ainsi que celles encore en suspension. Enfin dans le cas des zones de contamination élevée, la technique de carottage du sédiment est pertinente puisqu'elle permettrait peut-être d'estimer la contamination de cette zone au cours des dernières décennies en se rapportant au taux de sédimentation local.

Les données sur la contamination de l'environnement aquatique par les microplastiques sont également dépendantes des méthodes analytiques utilisées pour leur extraction et identification

De nombreuses méthodes analytiques, utilisées pour extraire, décrire, identifier et quantifier les microplastiques, sont à l'origine des difficultés rencontrées lors de la comparaison des données entre les études (Rocha-Santos and Duarte, 2014). Alors que les échantillons d'eau de la rade de Brest ont été analysés directement, les échantillons de sédiment et le biote ont été prétraités de manière à en extraire les microplastiques. En ce qui concerne les échantillon de sédiment, des solutions aqueuses denses (chlorure de sodium : 1,17 $g.cm^{-3}$ et tungstate de sodium : 1,56 $g.cm^{-3}$) ont été utilisée pour en extraire les microplastiques par flottaison, et notamment les plastiques les plus denses comme le PVC (1,38 $g.cm^{-3}$) et le PET (1,37 $g.cm^{-3}$). De nombreuses autres solutions aqueuses peuvent être utilisées pour extraire les microplastiques par flottaison comme le bromure de zinc 25 % ($ZnBr_2$; 1,17 $g.cm^{-3}$), le chlorure de zinc ($ZnCl_2$; 1,5 - 1,7 $g.cm^{-3}$), le chlorure de calcium ($CaCl^2$; 1,30 - 1,35 $g.cm^{-3}$), le polytungstate (1,4 $g.cm^{-3}$) et dont les plus efficaces sont le bromure de sodium (NaBr ; 1,37 $g.cm^{-3}$) et l'iodure de sodium (NaI ; 1,57 $g.cm^{-3}$), mais elles présentent un coût élevé (Corcoran *et al.,* 2009;

Crichton *et al.,* 2017; Dekiff *et al.,* 2014; Imhof *et al.* 2012; Hanvey *et al.,* 2017; Quinn *et al.,* 2017; Stolte *et al.,* 2015). Récemment, plusieurs alternatives ont été proposées pour réduire le coût d'utilisation des solutions aqueuses denses. L'extraction des microplastiques présents dans les échantillons de sédiment peut être réalisée par la méthode d'élutriation (Claessens *et al.,* 2013; Kedzierski *et al.,* 2016). Cependant, la proportion de sable restante à la fin du traitement étant encore trop importante pour facilement en extraire les microplastiques, une extraction par flottaison via des solutions aqueuses denses doit être réalisée (Kedzierski *et al.,* 2016). Kedzierski *et al.* (2017) ont montré qu'une solution de NaI, appliquée sur des échantillons de sable, peut être réutilisée sans que sa densité ne soit altérée, et avec seulement une perte de 35,9 % de sa masse après 10 utilisations. Une autre alternative peu coûteuse et basée sur les propriétés oléophiles des plastiques a été proposée par Crichton *et al.* (2017). Ils ont testé l'extraction de microplastiques (fragments : PSE, PVC, vinyle et ABS ; fibres : PA et PES) avec de l'huile de colza (5 ml d'huile pour 50 g de sédiment sec) et le taux d'extraction des particules (fragments et fibres) est supérieur à celui testé avec les solutions de NaI et $CaCl_2$. L'utilisation d'huile de colza comme méthode d'extraction des microplastiques dans le sédiment est une alternative très intéressante qui mérite d'être développée car elle est facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. En effet, cela permettrait de traiter des volumes plus important de sédiment de la rade de Brest et donc d'augmenter la probabilité d'y trouver des microplastiques. En ce qui concerne l'extraction des microplastiques dans les tissus biologiques, une comparaison des principaux protocoles de digestion des tissus d'organismes marin disponibles dans la littérature a été réalisée conjointement avec l'ANSES. Cela a permis de sélectionner, après quelques adaptations, le protocole le plus efficace en terme de digestion des tissus, de respect de l'intégrité physique des plastiques et de temps d'analyse (KOH 10 % à 60 °C pendant 24h) (Dehaut *et al.,* 2016). L'avantage de cette méthode, en plus de son efficacité de digestion sur différents types de tissus biologiques (moules entières, chaire de crabes, filet et contenu du tube digestif de dorades grises), et qu'elle ne perturbe pas le signal lors des analyse par spectroscopie Raman qui sont indispensables pour identifier la composition moléculaire des particules.

Une identification visuelle (œil nu et stéréomicroscope) a été utilisée, au cours de ces travaux de thèse, pour détecter les microparticules potentiellement de nature plastique et les décrire selon leur forme (GPI, fragment, film, fil, fibre, mousse, peinture), couleur, taille et texture (Filella, 2015; Rodríguez-Seijo and Pereira, 2017). Bien que cette méthode soit facile et rapide à mettre en œuvre, elle présente certaines limites : variabilité inter-opérateur forte ; limite de taille des particules collectées (œil nu : particules > 1 mm ; stéréomicroscope : particules entre 10 µm et 1 mm) ; détection difficile des particules translucides ou opaques ; pas de confirmation de la nature plastique des particules ; et pas de données sur les familles de polymère collectées (Shim *et al.,* 2017). Cette méthode, dans le cas où elle est utilisée seule pour identifier les microplastiques, peut fausser les estimations. En effet, les travaux menés dans le cadre de la thèse ont montré qu'entre 7 et 28 % des particules collectées dans les

matrices environnementales (eau de surface et sédiment), visuellement identifiées comme du plastique, ont été exclues suite à l'analyse de leur composition moléculaire par micro-spectroscopie Raman (principalement quartz et carbonate de calcium). Une des solutions permettant d'éviter cette étape de tri manuelle, est l'analyse directe des filtres contenant les particules (microplastiques, matière biologique et/ou minérale) par spectroscopie vibrationnelle (Raman, FTIR). Cependant, cette analyse directe nécessite de réaliser une cartographie moléculaire qui ne peut être effectuée que sur un sous-échantillonnage des filtres (5,6 % de la surface totale d'un filtre de 47 mm) car trop coûteux en temps et en terme de quantité de données générées qui peut vite devenir impossible à analyser (Harrison *et al.,* 2012; Vianello *et al.,* 2013). Cela explique pourquoi l'identification de la composition moléculaire des particules collectées est majoritairement réalisée sur les particules présélectionnées lors de l'étape de tri visuel (Imhof *et al.,* 2016; Lenz *et al.,* 2015; Song *et al.,* 2015). De nouvelles méthodes permettant de différencier rapidement les microplastiques des autres débris marins, avant d'analyser leur composition moléculaire, commence à émerger, et notamment la méthode de marquage avec le pigment lipophile fluorescent, le Rouge de Nil (Maes *et al.,* 2017; Shim *et al.,* 2016). Cette méthode prometteuse, en cours de validation au LEMAR, permet de marquer les microplastiques, ce qui permettrait de les détecter plus facilement des matrices environnementales. La fluorescence émise par les particules marquées semble permettre la distinction entre plusieurs type de polymères (PEBD, PEHD, PP, PSE, PC, PU et EVA) (Maes *et al.,* 2017; Shim *et al.,* 2016). Cependant, ce colorant marque les lipides neutres dans des échantillons biologiques, ce qui implique un prétraitement (digestion de la matière biologique) efficace afin d'éviter la prise en compte de faux positif. De plus, elle nécessite d'être développée afin de vérifier dans un premier temps l'auto-fluorescence naturelle des plastiques, ainsi que l'efficience et la durée du marquage.

Suite à l'étape de tri visuel, l'identification moléculaire des microparticules collectées en rade de Brest a été effectuée par micro-spectroscopie Raman. La nouveauté proposée dans ces travaux de thèse est l'utilisation d'un micro-spectromètre Raman équipé d'une caméra à lumière blanche et couplé à un logiciel d'acquisition et de traitement de spectres, disposant également d'un module de localisation et de description morphologique des particules (ParticleFinder, LabSpec, Horiba). Cela a permis le développement d'une méthode d'analyse semi-automatique de la morphologie et de la composition moléculaire des microparticules par micro-spectroscopie Raman. Les avantages considérables de cette analyse sont d'une part la réduction du temps d'analyse grâce à la cartographie des particules qui permet ensuite une analyse spectrale automatique des particules pour lesquelles un seul spectre par particule est obtenu (paramètre qui peut être modifié), et d'autre part l'apport d'une double information sur les microparticules : les données sur leur morphologie et leur composition moléculaire. Cette méthode semi-automatique permet l'analyse d'échantillons conséquents (> 100 particules) dans un temps raisonnable (< 4 h) ce qui permet d'éviter de réduire l'analyse à des sous-échantillons (Enders *et al.,* 2015; Harrison *et al.,* 2012; Song *et al.,* 2015; Zhao *et al.,* 2014). De plus,

le couplage entre différents outils permettant la caractérisation morphologique et l'identification de la composition moléculaire des particules en une analyse réduit la manipulation des particules avec le risque d'en perdre. En effet, dans la littérature la description morphologique des microparticules a nécessité l'utilisation d'outils supplémentaires pour l'acquisition de photos comme le zooscan (Pedrotti *et al.,* 2016) ou le stéréomicroscope couplé à une caméra, avant d'analyser les photos avec un logiciel de traitement d'image comme ImageJ (Barrows *et al.,* 2017; Collard *et al.,* 2015). Dans la méthode développée ici les informations sur la morphologie des particules (dimension, surface, forme) sont accessibles rapidement. Seule l'information sur le volume des particules est manquante dans cette méthode, et est un élément important pour la description des microplastiques. Ce point est en cours de développement au LDCM (Ifremer, Plouzané), avec la mise en place de la mesure automatisée de la position en z des microparticules. De plus, l'acquisition spectrale peut également être réalisée au travers d'une boite WillCo Dish fermée par un couvercle en verre afin de protéger les particules des mouvements d'air qui peuvent les faire voler et donc faire perdre certaines particules, mais également pour maintenir les échantillons dans des conditions stériles si nécessaire. Cependant, cette méthode présente plusieurs limites techniques comme : (1) l'émission de fluorescence pouvant masquer le signal Raman, (2) la difficulté à identifier les spectres obtenus du fait de la pauvreté des bases de données, (3) la présence de pigments dont le signal Raman est souvent plus puissant que celui de la matrice des particules ce qui empêche l'identification de leur composition moléculaire, et (4) la difficulté pour identifier la nature des fibres (Rodríguez-Seijo and Pereira, 2017; Shim *et al.,* 2017). Une purification des microparticules, afin d'enlever les impuretés (destruction de la matière biologique et/ ou minérale) souvent responsable de l'émission de fluorescence, pourrait augmenter la proportion de particules identifiées, notamment dans les échantillons de sédiment. Un changement de la puissance ou de la longueur d'onde du laser peut également être envisagée. En effet, l'utilisation d'un laser à courte longueur d'onde (bleu, violet ou même UV) permettrait d'augmenter la sensibilité et la résolution de l'analyse, et donc la détection de plus petites particules (0,2 µm), et notamment des fibres (projet DEEP BLUE, Oxxius, FOTON et Ifremer). En ce qui concerne les difficultés d'identification liées aux pigments, il apparaît pour l'heure indispensable de réaliser une analyse supplémentaire complémentaire à l'aide d'un spectromètre FTIR. Enfin, la proportion de spectres non identifiés pourrait être réduite avec un enrichissement des banques de spectres Raman.

Enfin, la grande variété des méthodes employées dans l'étude des microplastiques est à l'origine de la sur- ou sous-estimation des concentration dans l'environnement marin, ainsi que de la difficulté voire l'impossibilité de comparer les études entre elles (Filella, 2015; Hidalgo-Ruz *et al.,* 2012). Un exemple flagrant est l'exclusion des fibres dans ces travaux de thèse en raison de (1) la difficulté à identifier leur composition moléculaire, et donc de faire la distinction entre les fibres naturelles (coton, soie, laine) et synthétiques (polyester, polyamide, polypropylène), par la méthode d'analyse semi-automatique par micro-spectroscopie Raman présentée dans le Chapitre III-A, mais également par (2)

l'importance de la contamination des échantillons, et notamment via l'apport aérien de fibres (Barrows *et al.,* 2017; Dris *et al.,* 2016; Suaria *et al.,* 2016). Leur incorporation dans les calculs de concentration aurait probablement donné lieu à des surestimations des concentrations retrouvées dans les matrices environnementales, au vu des récents travaux démontrant que les fibres naturelles peuvent représenter 57 à 98 % des fibres collectées lors de suivis environnementaux (Dris *et al.,* 2016; Song *et al.,* 2015; Woodall *et al.,* 2014). D'un autre côté, leur non incorporation (choix méthodologique par souci de rigueur analytique) peut expliquer en partie les faibles niveaux retrouvés ici en comparaison avec les autres études, puisque cette catégorie de microplastiques peut être la principale représentante des micro-débris plastiques (Alomar *et al.,* 2016; Desforges *et al.,* 2014, 2015; Devriese *et al.,* 2015; Dubaish and Liebezeit, 2013; Lusher *et al.,* 2014; Phuong *et al.,* 2017), voir même l'unique représentante (De Witte *et al.,* 2014; Mathalon and Hill, 2014) dans de précédentes études ayant utilisé ou non des outils de confirmation par spectrométrie. Ce verrou devra être levé, avec par exemple l'utilisation complémentaire d'un FTIR couplé à une chambre en fluide permettant l'analyse rapide de fibres, afin d'affiner les niveaux de contamination mesurés en rade de Brest. Un autre exemple soulevé par ces travaux de thèse est celui de l'intégration de particules dont seul le pigment a été identifié (exemple du phthalocyanine 15, PB15). En effet, bien que la présence de ce genre de pigment permette de confirmer l'origine anthropique de la particule, cela ne confirme pas pour autant sa nature plastique. Ces aléas peuvent faire beaucoup varier les calculs de concentration en microplastiques dans l'environnement marin. A titre d'exemple, le faible niveau de contamination par les microplastiques des moules et coques collectées dans le cadre de ces travaux de thèse, en comparaison avec la littérature, peut être expliqué par l'exclusion des fibres et des particules présentant uniquement le signal d'un pigment bleu (PB15). En effet, en prenant en compte ces deux types de particules dans l'évaluation du niveau de contamination du biote, les concentrations obtenues sont supérieures d'un ordre de grandeur lors de (1) l'inclusion des fibres avec des valeurs de 0,56 $MP.g^{-1}$ et 0,98 $MP.g^{-1}$ pour les moules et les coques, respectivement, et (2) lors de l'inclusion des pigments avec des valeurs de 0,14 $MP.g^{-1}$ et 0,23 $MP.g^{-1}$ pour les moules et les coques, respectivement, ce qui tend à se rapprocher des valeurs précédemment publiées, par exemple de la moyenne de 0,36 $MP.g^{-1}$ et 0,47 $MP.g^{-1}$ chez les moules et les huîtres des côtes belges (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014). En conclusion, en l'absence d'harmonisation des méthodologies mises en place dans l'étude de la contamination de l'environnement marin par les microplastiques (plan d'échantillonnage, protocoles de prélèvements, de détection et de quantification des microplastiques), la comparaison entre différents travaux et zones géographiques reste limitée et contrainte.

Références

| A |

Accardi-Dey, A., Gschwend, P.M., 2002. Assessing the Combined Roles of Natural Organic Matter and Black Carbon as Sorbents in Sediments. Environ. Sci. Technol. 36, 21–29. doi:10.1021/es010953c

Acquavita, A., Falomo, J., Predonzani, S., Tamberlich, F., Bettoso, N., Mattassi, G., 2014. The PAH level, distribution and composition in surface sediments from a Mediterranean Lagoon: The Marano and Grado Lagoon (Northern Adriatic Sea, Italy). Mar. Pollut. Bull. 81, 234–241. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.041

Adams, R.G., Lohmann, R., Fernandez, L.A., MacFarlane, J.K., 2007. Polyethylene Devices: Passive Samplers for Measuring Dissolved Hydrophobic Organic Compounds in Aquatic Environments. Environ. Sci. Technol. 41, 1317–1323. doi:10.1021/es0621593

Adger, W.N., Hughes, T.P., Folke, C., Carpenter, S.R., Rockström, J., 2005. Social-Ecological Resilience to Coastal Disasters. Science 309, 1036–1039. doi:10.1126/science.1112122

Alomar, C., Estarellas, F., Deudero, S., 2016. Microplastics in the Mediterranean Sea: Deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. Mar. Environ. Res. 115, 1–10. doi:10.1016/j.marenvres.2016.01.005

Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E.R., Slikas, B., Boyd, G.D., Melvin, D.W., Morrall, C.E., Proskurowski, G., Mincer, T.J., 2015. The biogeography of the Plastisphere: implications for policy. Front. Ecol. Environ. 13, 541–546. doi:10.1890/150017

Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol. 26, 32–46. doi:10.1046/j.1442-9993.2001.01070.x

Andrady, A.L., 2015. Persistence of Plastic Litter in the Oceans, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, Cham, pp. 57–72.

Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 62, 1596–1605. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.05.030

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 1977–1984. doi:10.1098/rstb.2008.0304

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. Press. Stress. Shocks Trends Estuar. Ecosyst. 130, 62–69. doi:10.1016/j.ecss.2013.06.016

Araujo, P.H.H., Sayer, C., Poco, J.G.R., Giudici, R., 2002. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: A review. Polym. Eng. Sci. 42, 1442–1468. doi:10.1002/pen.11043

Arthur, C., Baker, J., Bamford, H., 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurance, Effects, and Fate of Mircroplastic Marine Debris. Dep. Commer. Natl. Ocean. Atmospheric Adm. Tech. Memo. NOS-ORR-30.

Ashton, K., Holmes, L., Turner, A., 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 60, 2050–2055. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.07.014

Au, S.Y., Bruce, T.F., Bridges, W.C., Klaine, S.J., 2015. Responses of Hyalella azteca to acute and chronic microplastic exposures. Environ. Toxicol. Chem. 34, 2564–2572. doi:10.1002/etc.3093

Aucher, J., 2009. Etude comparative du comportement composites à matrice thermoplastique ou thermodurcissable (phdthesis). INSA de Rouen.

Auffret, G.-A., 1983. Dynamique sédimentaire de la marge continentale celtique - Evolution Cénozoïque - Spécificité du Pleistocène supérieur et de l'Holocène. Université de Bordeaux I.

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015a. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. Environ. Pollut. 198, 211–222. doi:10.1016/j.envpol.2014.12.021

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. Mar. Environ. Res., Particles in the Oceans: Implication for a safe marine environment 111, 18–26. doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.014

| B |

Bakir, A., O'Connor, I.A., Rowland, S.J., Hendriks, A.J., Thompson, R.C., 2016. Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 219, 56–65. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.046

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. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.007

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.09.010

Ballent, A., Pando, S., Purser, A., Juliano, M.F., Thomsen, L., 2013. Modelled transport of benthic marine microplastic pollution in the Nazare Canyon. Biogeosciences 10, 7957–7970. doi:10.5194/bg-10-7957-2013

Barnes, D.K.A., 2002. Biodiversity: Invasions by marine life on plastic debris. Nature 416, 808–809. doi:10.1038/416808a

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-Biol. Sci. 364, 1985–1998. doi:10.1098/rstb.2008.0205

Barrows, A.P.W., Neumann, C.A., Berger, M.L., Shaw, S.D., 2017. Grab vs. neuston tow net: a microplastic sampling performance comparison and possible advances in the field. Anal. Methods 9, 1446–1453. doi:10.1039/C6AY02387H

Bauer, M.J., Herrmann, R., 1997. Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes. Sci. Total Environ. 208, 49–57. doi:10.1016/S0048-9697(97)00272-6

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean sea. Environ. Toxicol. Chem. 17, 765–776. doi:10.1002/etc.5620170501

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. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.06.026

Benítez, A., Sánchez, J.J., Arnal, M.L., Müller, A.J., Rodríguez, O., Morales, G., 2013. Abiotic degradation of LDPE and LLDPE formulated with a pro-oxidant additive. Polym. Degrad. Stab. 98, 490–501. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.12.011

Besseling, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Bravo Rebolledo, E.L., Heße, E., Mielke, L., IJzer, J., Kamminga, P., Koelmans, A.A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale Megaptera novaeangliae. Mar. Pollut. Bull. 95, 248–252. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.007

Besseling, E., Quik, J.T.K., Sun, M., Koelmans, A.A., 2017. Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 220, 540–548. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.001

Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2012. Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm Arenicola marina (L.). Environ. Sci. Technol. 47, 593–600. doi:10.1021/es302763x

Beudin, A., Chapalain, G., Guillou, N., 2013. Suspended sediment modelling in the bay of Brest impacted by the slipper limpet Crepidula Fornicata. Presented at the Coastal Dynamics 2013.

Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C., 1998. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids (vol 45, pg 3541, 1997). J. Agric. Food Chem. 46, 2894–2894. doi:10.1021/jf980629+

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, 2275–2278. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.08.007

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.08.010

Braid, H.E., Deeds, J., DeGrasse, S.L., Wilson, J.J., Osborne, J., Hanner, R.H., 2012. Preying on commercial fisheries and accumulating paralytic shellfish toxins: a dietary analysis of invasive Dosidicus gigas (Cephalopoda Ommastrephidae) stranded in Pacific Canada. Mar. Biol. 159, 25–31. doi:10.1007/s00227-011-1786-4

Brandao, M.L., Braga, K.M., Luque, J.L., 2011. Marine debris ingestion by Magellanic penguins, Spheniscus magellanicus (Aves: Sphenisciformes), from the Brazilian coastal zone. Mar. Pollut. Bull. 62, 2246–2249. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.07.016

Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., Canning-Clode, J., 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. Estuar. Coast. Shelf Sci. 178, 189–195. doi:10.1016/j.ecss.2015.12.003

Browne, M.A., 2015. Sources and Pathways of Microplastics to Habitats, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 229–244. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_9

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. doi:10.1021/es201811s

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., Thompson, R., 2007. Microplastic—an emerging contaminant of potential concern? Integr. Environ. Assess. Manag. 3, 559–561. doi:10.1002/ieam.5630030412

Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines. Environ. Sci. Technol. 44, 3404–3409. doi:10.1021/es903784e

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. doi:10.1016/j.cub.2013.10.012

Browne, M.A., Underwood, A.J., Chapman, M.G., Williams, R., Thompson, R.C., Franeker, J.A. van, 2015. Linking effects of anthropogenic debris to ecological impacts. Proc R Soc B 282, 20142929. doi:10.1098/rspb.2014.2929

Bryant, J.A., Clemente, T.M., Viviani, D.A., Fong, A.A., Thomas, K.A., Kemp, P., Karl, D.M., White, A.E., DeLong, E.F., 2016. Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. mSystems 1, e00024-16. doi:10.1128/mSystems.00024-16

Buchanan, J.B., 1971. Pollution by synthetic fibres. Mar. Pollut. Bull. 2, 23. doi:10.1016/0025-326X(71)90136-6

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797

| C |

Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). Aquat. Toxicol. 79, 257–267. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.014

Caillaud, M., Petton, S., Dumas, F., Rochette, S., Vasquez, M., 2016. Rejeu hydrodynamique à 500 m de résolution avec le modèle MARS3D-AGRIF - Zone Manche-Gascogne.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10, 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421

Camino-Sánchez, F.J., Zafra-Gómez, A., Pérez-Trujillo, J.P., Conde-González, J.E., Marques, J.C., Vílchez, J.L., 2011. Validation of a GC–MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction. Chemosphere 84, 869–881. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.019

Cannon, S.M.E., Lavers, J.L., Figueiredo, B., 2016. Plastic ingestion by fish in the Southern Hemisphere: A baseline study and review of methods. Mar. Pollut. Bull. 107, 286–291. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.03.057

Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. Polystyrene Spherules in Coastal Waters. Science 178, 749–750. doi:10.1126/science.178.4062.749

Carpenter, E.J., Smith, K.L., 1972. Plastics on the Sargasso sea surface. Science 175, 1240–1241.

Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., 2016. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. Water Res. 91, 174–182. doi:10.1016/j.watres.2016.01.002

Carson, H.S., Lamson, M.R., Nakashima, D., Toloumu, D., Hafner, J., Maximenko, N., McDermid, K.J., 2013. Tracking the sources and sinks of local marine debris in Hawai'i. Mar. Environ. Res. 84, 76–83. doi:10.1016/j.marenvres.2012.12.002

Chae, D.-H., Kim, I.-S., Kim, S.-K., Song, Y.K., Shim, W.J., 2015. Abundance and Distribution Characteristics of Microplastics in Surface Seawaters of the Incheon/Kyeonggi Coastal Region. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 269–278. doi:10.1007/s00244-015-0173-4

Chambers, J.M., Freeny, A., Heiberger, R.M., 1992. Chapitre 5. Analysis of variance; designed experiments., in: Statistical Models. J. M. Chambers and T. J. Hastie, California.

Chang, M., 2015. Reducing microplastics from facial exfoliating cleansers in wastewater through treatment versus consumer product decisions. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.10.074

Chatain, M., 1987a. Matières thermoplastiques. Tech. Ing.

Chatain, M., 1987b. Matières thermodurcissables. Tech. Ing.

Chauvaud, L., Jean, F., Ragueneau, O., Thouzeau, G., 2000. Long-term variation of the Bay of Brest ecosystem: benthic-pelagic coupling revisited. Mar. Ecol. Prog. Ser. 200, 35–48. doi:10.3354/meps200035

Cheng, Z., Nie, X.-P., Wang, H.-S., Wong, M.-H., 2013. Risk assessments of human exposure to bioaccessible phthalate esters through market fish consumption. Environ. Int. 57–58, 75–80. doi:10.1016/j.envint.2013.04.005

Choy, C.A., Drazen, J.C., 2013. Plastic for dinner? Observations of frequent debris ingestion by pelagic predatory fishes from the central North Pacific. Mar. Ecol. Prog. Ser. 485, 155–163. doi:10.3354/meps10342

Chu, S., Wang, J., Leong, G., Woodward, L.A., Letcher, R.J., Li, Q.X., 2015. Perfluoroalkyl sulfonates and carboxylic acids in liver, muscle and adipose tissues of black-footed albatross (Phoebastria nigripes) from Midway Island, North Pacific Ocean. Chemosphere 138, 60–66. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.043

Cladiere, M., Gasperi, J., Lorgeoux, C., Bonhomme, C., Rocher, V., Tassin, B., 2013. Alkylphenolic compounds and bisphenol A contamination within a heavily urbanized area: case study of Paris. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 2973–2983. doi:10.1007/s11356-012-1220-6

Claessens, M., Meester, S.D., Landuyt, L.V., Clerck, K.D., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. Mar. Pollut. Bull. 62, 2199–2204. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.06.030

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.03.009

Codina-García, M., Militão, T., Moreno, J., González-Solís, J., 2013. Plastic debris in Mediterranean seabirds. Mar. Pollut. Bull. 77, 220–226. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.002

Cole, M., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. Environ. Sci. Technol. doi:10.1021/acs.est.5b04099

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

Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S., 2013. Microplastic Ingestion by Zooplankton. Environ. Sci. Technol. 130606145528005. doi:10.1021/es400663f

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Mar. Pollut. Bull. 62, 2588–2597. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.025

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

Cole, M., 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. Sci Rep 4, 4528. doi:10.1038/srep04528

Collard, F., Gilbert, B., Eppe, G., Parmentier, E., Das, K., 2015. Detection of Anthropogenic Particles in Fish Stomachs: An Isolation Method Adapted to Identification by Raman Spectroscopy. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 331–339. doi:10.1007/s00244-015-0221-0

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.11.023

Collignon, A., Hecq, J.-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. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.01.011

Colombo, J.C., Pelletier, E., Brochu, C., Khalil, M., Catoggio, J.A., 1989. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de la Plata Estuary, Argentina. Environ. Sci. Technol. 23, 888–894. doi:10.1021/es00065a019

Cooper, D.A., Corcoran, P.L., 2010. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. Mar. Pollut. Bull. 60, 650–654. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.026

Corcoran, P.L., Biesinger, M.C., Grifi, M., 2009. Plastics and beaches: A degrading relationship. Mar. Pollut. Bull. 58, 80–84. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.08.022

Costa, M.F., Ivar do Sul, J.A., Silva-Cavalcanti, J.S., B. Araujo, M.C., 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. doi:10.1007/s10661-009-1113-4

Countway, R.E., Dickhut, R.M., Canuel, E.A., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. Org. Geochem. 34, 209–224. doi:10.1016/S0146-6380(02)00162-6

Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J.I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, Á.T., Navarro, S., García-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernández-de-Puelles, M.L., Duarte, C.M., 2014. Plastic debris in the open ocean. Proc. Natl. Acad. Sci. 201314705. doi:10.1073/pnas.1314705111

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, e0121762. doi:10.1371/journal.pone.0121762

Crain, C.M., Halpern, B.S., Beck, M.W., Kappel, C.V., 2009. Understanding and managing human threats to the coastal marine environment. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1162, 39–62. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04496.x

Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette, L.J., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. Reprod. Toxicol. 24, 225–239. doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.008

Crichton, E.M., Noël, M., Gies, E.A., Ross, P.S., 2017. A novel, density-independent and FTIR-compatible approach for the rapid extraction of microplastics from aquatic sediments. Anal. Methods 9, 1419–1428. doi:10.1039/C6AY02733D

Critchell, K., Lambrechts, J., 2016. Modelling accumulation of marine plastics in the coastal zone; what are the dominant physical processes? Estuar. Coast. Shelf Sci. 171, 111–122. doi:10.1016/j.ecss.2016.01.036

| D |

Dameron, O.J., Parke, M., Albins, M.A., Brainard, R., 2007. Marine debris accumulation in the Northwestern Hawaiian Islands: An examination of rates and processes. Mar. Pollut. Bull. 54, 423–433. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.11.019

Danis, B., Wantier, P., Dutrieux, S., Flammang, R., Dubois, P., Warnau, M., 2004. Contaminant levels in sediments and asteroids (Asterias rubens L., Echinodermata) from the Belgian coast and Scheldt estuary: polychlorinated biphenyls and heavy metals. Sci. Total Environ. 333, 149–165. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.05.002

Dantas, D.V., Barletta, M., da Costa, M.F., 2012. The seasonal and spatial patterns of ingestion of polyfilament nylon fragments by estuarine drums (Sciaenidae). Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 600–606. doi:10.1007/s11356-011-0579-0

Datta, M.S., Sliwerska, E., Gore, J., Polz, M.F., Cordero, O.X., 2016. Microbial interactions lead to rapid micro-scale successions on model marine particles. Nat. Commun. 7.

Davidson, K., Dudas, S.E., 2016. Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (Venerupis philippinarum. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1–10. doi:10.1007/s00244-016-0286-4

de 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., Massaro, G., Fossi, M.C., Matiddi, M., 2014a. Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea). Mar. Environ. Res., Large marine vertebrates as sentinels of GES in the European MSFD 100, 10–16. doi:10.1016/j.marenvres.2014.03.017

de Sá, 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. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.026

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

de Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere 46, 583–624. doi:10.1016/S0045-6535(01)00225-9

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.006

Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T.A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M., Scapini, F., 2009. Threats to sandy beach ecosystems: A review. Estuar. Coast. Shelf Sci. 81, 1–12. doi:10.1016/j.ecss.2008.09.022

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. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.018

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. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.019

Delmas, R., 1981. Etude de l'évolution saisonnière des sels nutritifs dans la Rade de Brest en fonction des apports fluviaux et des échanges avec l'Iroise. UBO.

Deloffre, J., Verney, R., Lafite, R., Lesueur, P., Lesourd, S., Cundy, A., 2007. Sedimentation on intertidal mudflats in the lower part of macrotidal estuaries: Sedimentation rhythms and their preservation. Mar. Geol. 241, 19–32. doi:10.1016/j.margeo.2007.02.011

Deroiné, M., Le Duigou, A., Corre, Y.-M., Le Gac, P.-Y., Davies, P., César, G., Bruzaud, S., 2014. Seawater accelerated ageing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Polym. Degrad. Stab. 105, 237–247. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.04.026

Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar. Pollut. Bull. 44, 842–852. doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.12.035

Desforges, J.-P.W., Galbraith, M., Ross, P.S., 2015. Ingestion of Microplastics by Zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1–11. doi:10.1007/s00244-015-0172-5

Devriese, L.I., van der Meulen, M.D., Maes, T., Bekaert, K., Paul-Pont, I., Frère, L., Robbens, J., Vethaak, A.D., 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. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.06.051

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. doi:10.1016/j.marenvres.2010.10.001

Dris, R., 2016. First Assessment of Sources and Fate of Macro- and Micro- Plastics in Urban Hydrosystems: Case of Paris Megacity. Universite Paris Est.

Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Saad, M., Renault, N., Tassin, B., 2015. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. Environ. Chem. 12, 592–599.

Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., Tassin, B., 2016. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? Mar. Pollut. Bull. 104, 290–293. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.006

Dubaish, F., Liebezeit, G., 2013. Suspended Microplastics and Black Carbon Particles in the Jade System, Southern North Sea. Water. Air. Soil Pollut. 224, 1352. doi:10.1007/s11270-012-1352-9

| E |

Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinforma. Oxf. Engl. 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461

Ehrhold, A., Gregoire, G., Schmidt, S., Jouet, G., Le Roy, P., 2016. Present-day sedimentation rates in the Bay of Brest (NW France) and its evolution since the last millenaries. Presented at the AGU FALL MEETING.

Eich, A., Mildenberger, T., Laforsch, C., Weber, M., 2015. Biofilm and Diatom Succession on Polyethylene (PE) and Biodegradable Plastic Bags in Two Marine Habitats: Early Signs of Degradation in the Pelagic and Benthic Zone? PLOS ONE 10, e0137201. doi:10.1371/journal.pone.0137201

El-Shahawi, M.S., Hamza, A., Bashammakh, A.S., Al-Saggaf, W.T., 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. Talanta 80, 1587–1597. doi:10.1016/j.talanta.2009.09.055

Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C.A., Nielsen, T.G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics ≥ 10 µm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. Mar. Pollut. Bull. 100, 70–81. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.09.027

Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H., Ogi, H., Yamashita, R., Date, T., 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: Variability among individual particles and regional differences. Mar. Pollut. Bull. 50, 1103–1114. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.030

Eriksen, M., Lebreton, L.C.M., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borerro, J.C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J., 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, e111913. doi:10.1371/journal.pone.0111913

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H., Amato, S., 2013a. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. Mar. Pollut. Bull. 77, 177–182. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.007

Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., Hafner, J., Zellers, A., Rifman, S., 2013b. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. Mar. Pollut. Bull. 68, 71–76. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.12.021

Eriksson, C., Burton, H., 2003. Origins and Biological Accumulation of Small Plastic Particles in Fur Seals from Macquarie Island. AMBIO J. Hum. Environ. 32, 380–384. doi:10.1579/0044-7447-32.6.380

Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Mariadassou, M., Hernandez-Raquet, G., Pascal, G., 2015. FROGS: Find Rapidly OTU with Galaxy Solution.

European Commission, 2010. Commission decision of 1 September 2010 on criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters (notified under document C(2010) 5956) 2010/477/EU, 14–24.

Expéditions MED, 2016. Opération déchets cotiers.

| F |

Farrell, P., Nelson, K., 2013. Trophic level transfer of microplastic: Mytilus edulis (L.) to Carcinus maenas (L.). Environ. Pollut. 177, 1–3. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.046

Farrington, J.W., Takada, H., 2014. Persistent Organic Pollutants (POPs), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), and Plastics Examples of the Status, Trend, and Cycling of Organic Chemicals of Environmental Concern in the Ocean. Oceanography 27, 196–213.

Faure, F., Corbaz, M., Baecher, H., de Alencastro, L., 2012. Pollution due to plastics and microplastics in Lake Geneva and in the Mediterranean Sea. Arch Sci 65, 157–164.

Faure, F., Demars, C., Wieser, O., Kunz, M., de Alencastro, L.F., 2015. Plastic pollution in Swiss surface waters: nature and concentrations, interaction with pollutants. Environ. Chem. 12, 582–591. doi:10.1071/EN14218

Fendall, L.S., Sewell, M.A., 2009. Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers. Mar. Pollut. Bull. 58, 1225–1228. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.04.025

Filella, M., 2015. Questions of size and numbers in environmental research on microplastics: methodological and conceptual aspects. Environ. Chem. 12, 527–538. doi:10.1071/EN15012

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. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.012

Fischer, V., Elsner, N.O., Brenke, N., Schwabe, E., Brandt, A., 2015. Plastic pollution of the Kuril–Kamchatka Trench area (NW pacific). Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr. 111, 399–405. doi:10.1016/j.dsr2.2014.08.012

Fisher, C.H., 1989. Anselm Payen Pioneer in Natural Polymers and Industrial Chemistry, in: Seymour, R.B. (Ed.), Pioneers in Polymer Science, Chemists and Chemistry. Springer Netherlands, pp. 47–61. doi:10.1007/978-94-009-2407-9_5

Fisner, M., Taniguchi, S., Moreira, F., Bícego, M.C., Turra, A., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets: Variability in the concentration and composition at different sediment depths in a sandy beach. Mar. Pollut. Bull. 70, 219–226. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.03.008

Foekema, E.M., De Gruijter, C., Mergia, M.T., van Franeker, J.A., Murk, A.J., Koelmans, A.A., 2013. Plastic in north sea fish. Env. Sci Technol 47, 8818–24. doi:10.1021/es400931b

Fontanille, M., Gnanou, Y., 2014. Chimie et physico-chimie des polymères. Dunod.

Fontanille, M., Vairon, J.-P., 1994. Polymérisation. Tech. Ing.

Fossi, M.C., Coppola, D., Baini, M., Giannetti, M., Guerranti, C., Marsili, L., Panti, C., de Sabata, E., Clo, S., 2014. Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (Cetorhinus maximus) and fin whale (Balaenoptera physalus). Mar. Environ. Res. 100, 17–24. doi:10.1016/j.marenvres.2014.02.002

Fossi, M.C., Marsili, L., Baini, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., Caliani, I., Minutoli, R., Lauriano, G., Finoia, M.G., Rubegni, F., Panigada, S., Bérubé, M., Urbán Ramírez, J., Panti, C., 2016. Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. Environ. Pollut. 209, 68–78. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.022

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.08.013

Foulon, V., Le Roux, F., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2016. Colonization of Polystyrene Microparticles by Vibrio crassostreae: Light and Electron Microscopic Investigation. Environ. Sci. Technol. 50, 10988–10996. doi:DOI: 10.1021/acs.est.6b02720

FranceAgriMer, 2017. Les filières pêche et aquaculture en France : Production, Entreprises, Échanges et Consommation.

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.001

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. Mar. Pollut. Bull. 113, 461–468. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.051

Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffré, 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. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.023

Frias, J.P.G.L., Otero, V., Sobral, P., 2014. Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. Mar. Environ. Res. 95, 89–95. doi:10.1016/j.marenvres.2014.01.001

Frias, J.P.G.L., Sobral, P., Ferreira, A.M., 2010. Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. Mar. Pollut. Bull. 60, 1988–1992. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.07.030

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. Environ. Sci. Process. Impacts 15, 1949. doi:10.1039/c3em00214d

| G |

Galgani, F., 2012. BON ETAT ECOLOGIQUE - DESCRIPTEUR 10 - «Propriétés et quantités de déchets marins ne provoquant pas de dommages au milieu côtier et marin». Ifremer, LER/PAC.

Galgani, F., Burgeot, T., Bocquene, G., Vincent, F., Leaute, J., Labastie, J., Forest, A., Guichet, R., 1995. Distribution and Abundance of Debris on the Continental-Shelf of the Bay of Biscay and in Seine Bay. Mar. Pollut. Bull. 30, 58–62. doi:10.1016/0025-326X(94)00101-E

Galgani, F., Claro, F., Depledge, M., Fossi, C., 2014. Monitoring the impact of litter in large vertebrates in the Mediterranean Sea within the European Marine Strategy Framework Directive (MSFD): Constraints, specificities and recommendations. Mar. Environ. Res. doi:10.1016/j.marenvres.2014.02.003

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., De Vrees, L., 2013. Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. Ices J. Mar. Sci. 70, 1055–1064. doi:10.1093/icesjms/fst122

Galgani, Fleet, D., Katsanevakis, S., Maes, T., Mouat, J., Oosterbaan, L., Poitou, I., Hanke, G., Thompson, R., Amato, E., Birkun, A., Janssen, C.R., 2010. Marine Strategy Framework Directive Task Team 10 Report Marine Litter [WWW Document]. URL http://ec.europa.eu/environment/marine/pdf/9-Task-Group-10.pdf (accessed 2.16.16).

Gao, D.-W., Wen, Z.-D., 2016. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. Sci. Total Environ. 541, 986–1001. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.148

Gedde, U.W., 1999. A Brief Introduction to Polymer Science, in: Polymer Physics. Springer Netherlands, pp. 1–18. doi:10.1007/978-94-011-0543-9_1

GESAMP, 2016. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment (GESAMP).

GESAMP, 2015. Microplastics in the ocean [WWW Document]. URL http://www.gesamp.org/data/gesamp/files/media/Publications/WG_40_Brochure_Microplastic_in_the_ocean/gallery_2191/object_2404_large.pdf (accessed 2.16.16).

Gewert, B., Plassmann, M.M., MacLeod, M., 2015. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. Environ. Sci.-Process. Impacts 17, 1513–1521. doi:10.1039/c5em00207a

Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A.C., Knight, R., Joint, I., others, 2012. Defining seasonal marine microbial community dynamics. ISME J. 6, 298–308.

Gobas, F.A.P.C., Mackintosh, C.E., Webster, G., Ikonomou, M., Parkerton, T.F., Robillard, K., 2003. Bioaccumulation of Phthalate Esters in Aquatic Food-Webs, in: Staples, C.A. (Ed.), Series Anthropogenic Compounds, The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, pp. 201–225. doi:10.1007/b11467

Gochfeld, M., 1973. Effect of artefact pollution on the viability of seabird colonies on Long Island, New York. Environ. Pollut. 1970 4, 1–6. doi:10.1016/0013-9327(73)90025-6

Goldstein, M.C., Carson, H.S., Eriksen, M., 2014. Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities. Mar. Biol. 161, 1441–1453. doi:10.1007/s00227-014-2432-8

Goldstein, M.C., Goodwin, D.S., 2013. Gooseneck barnacles (Lepas spp.) ingest microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre. PeerJ 1, e184. doi:10.7717/peerj.184

Goldstein, M.C., Rosenberg, M., Cheng, L., 2012. Increased oceanic microplastic debris enhances oviposition in an endemic pelagic insect. Biol. Lett. 8, 817–820. doi:10.1098/rsbl.2012.0298

Goldstein, M.C., Titmus, A.J., Ford, M., 2013. Scales of Spatial Heterogeneity of Plastic Marine Debris in the Northeast Pacific Ocean. PLoS ONE 8, e80020. doi:10.1371/journal.pone.0080020

Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., Hodges, G., 2011. A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic. Environ. Sci. Technol. 45, 1466–1472. doi:10.1021/es1032025

Gouleau, D., Jouanneau, J.M., Weber, O., Sauriau, P.G., 2000. Short- and long-term sedimentation on Montportail–Brouage intertidal mudflat, Marennes–Oléron Bay (France). Cont. Shelf Res. 20, 1513–1530. doi:10.1016/S0278-4343(00)00035-2

Graca, B., Bełdowska, M., Wrzesień, P., Zgrundo, A., 2014. Styrofoam debris as a potential carrier of mercury within ecosystems. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 2263–2271. doi:10.1007/s11356-013-2153-4

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. doi:10.1016/j.jembe.2008.09.007

Grall, J., 2009. Fiche de synthèse d'habitat "Maerl."

Green, D.S., 2016. Effects of microplastics on European flat oysters, Ostrea edulis and their associated benthic communities. Environ. Pollut. 216, 95–103. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.043

Green, D.S., Boots, B., O'Connor, N.E., Thompson, R., 2017. Microplastics Affect the Ecological Functioning of an Important Biogenic Habitat. Environ. Sci. Technol. 51, 68–77. doi:10.1021/acs.est.6b04496

Gregoire, G., 2016. Dynamique sédimentaire et évolution holocène d'un système macrotidal semi-fermé : l'exemple de la rade de Brest. Université de Bretagne occidentale, Brest.

Gregoire, G., Ehrhold, A., Roy, P.L., Jouet, G., Garlan, T., 2016. Modern morpho-sedimentological patterns in a tide-dominated estuary system: the Bay of Brest (west Britanny, France). J. Maps 12, 1152–1159. doi:10.1080/17445647.2016.1139514

Gregory, M., 1978. Accumulation and Distribution of Virgin Plastic Granules on New-Zealand Beaches. N. Z. J. Mar. Freshw. Res. 12, 399–414.

Gregory, M.R., 1996. Plastic "scrubbers" in hand cleansers: a further (and minor) source for marine pollution identified. Mar. Pollut. Bull. 32, 867–871. doi:10.1016/S0025-326X(96)00047-1

Gregory, M.R., Andrady, A.L., 2003. Plastics and the Environment. John Wiley & Sons.

Grossmann, J., 2014. Evaluating the potential of microplastics ingestion to harm the sea cucumber Holothuria sanctori - Results and implications of a feeding experiment conducted on Madeira Island. doi:10.13140/RG.2.1.2897.8724

Guérin, L., 2004. La crépidule en rade de Brest : un modèle biologique d'espèce introduite proliférante en répons aux fluctuations de l'environnement (phdthesis). Université de Bretagne occidentale - Brest.

Gutow, L., Eckerlebe, A., Giménez, L., Saborowski, R., 2016. Experimental Evaluation of Seaweeds as a Vector for Microplastics into Marine Food Webs. Environ. Sci. Technol. 50, 915–923. doi:10.1021/acs.est.5b02431

| H |

Haemer, J., Gutow, L., Koehler, A., Saborowski, R., 2014. The fate of microplastics in the marine isopod Idotea emarginata. Environ. Sci. Technol. doi:10.1021/es501385y

Halden, R.U., 2010. Plastics and health risks. Annu. Rev. Public Health 31, 179–194. doi:10.1146/annurev.publhealth.012809.103714

Hall, N.M., Berry, K.L.E., Rintoul, L., Hoogenboom, M.O., 2015. Microplastic ingestion by scleractinian corals. Mar. Biol. 162, 725–732. doi:10.1007/s00227-015-2619-7

Hamad, K., Kaseem, M., Deri, F., 2013. Recycling of waste from polymer materials: An overview of the recent works. Polym. Degrad. Stab. 98, 2801–2812. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.09.025

Hammer, J., Kraak, M.H.S., Parsons, J.R., 2012. Plastics in the Marine Environment: The Dark Side of a Modern Gift. Rev. Environ. Contam. Toxicol. Vol 220 220, 1–44. doi:10.1007/978-1-4614-3414-6_1

Hanvey, J.S., Lewis, P.J., Lavers, J.L., Crosbie, N.D., Pozo, K., Clarke, B.O., 2017. A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. Anal. Methods 9, 1369–1383. doi:10.1039/C6AY02707E

Harrison, J.P., Ojeda, J.J., Romero-González, M.E., 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. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.11.078

Harrison, J.P., Sapp, M., Schratzberger, M., Osborn, A.M., 2011. Interactions Between Microorganisms and Marine Microplastics: A Call for Research. Mar. Technol. Soc. J. 45, 12–20.

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. doi:10.1186/s12866-014-0232-4

Hénaff, A., Philippe, M., 2014. Gestion des risques d'érosion et de submersion marines, guiode méthodologique., Projet Cocorisco.

Herzke, D., Anker-Nilssen, T., Nøst, T.H., Götsch, A., Christensen-Dalsgaard, S., Langset, M., Fangel, K., Koelmans, A.A., 2016. Negligible Impact of Ingested Microplastics on Tissue Concentrations of Persistent Organic Pollutants in Northern Fulmars off Coastal Norway. Environ. Sci. Technol. 50, 1924–1933. doi:10.1021/acs.est.5b04663

Heskett, M., Takada, H., Yamashita, R., Yuyama, M., Ito, M., Geok, Y.B., Ogata, Y., Kwan, C., Heckhausen, A., Taylor, H., Powell, T., Morishige, C., Young, D., Patterson, H., Robertson, B., Bailey, E., Mermoz, J., 2012. Measurement of persistent organic pollutants (POPs) in plastic resin pellets from remote islands: Toward establishment of background concentrations for International Pellet Watch. Mar. Pollut. Bull. 64, 445–448. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.11.004

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.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. doi:10.1021/es2031505

Hidalgo-Ruz, V., Thiel, M., 2015. The Contribution of Citizen Scientists to the Monitoring of Marine Litter, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 429–447. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_16

Hidalgo-Ruz, V., Thiel, 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. doi:10.1016/j.marenvres.2013.02.015

Hily, C., 1991. Is the activity of benthic suspension feeders a factor controlling water quality in the bay of brest ? Mar. Ecol. Prog. Ser. 69, 179–188.

Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Kwan, C., Moore, C., Gray, H., Laursen, D., Zettler, E.R., Farrington, J.W., Reddy, C.M., Peacock, E.E., Ward, M.W., 2011. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. Mar. Pollut. Bull. 62, 1683–1692. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.06.004

Hoellein, T., Rojas, M., Pink, A., Gasior, J., Kelly, J., 2014. Anthropogenic Litter in Urban Freshwater Ecosystems: Distribution and Microbial Interactions. PLoS ONE 9, e98485. doi:10.1371/journal.pone.0098485

Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2014. Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. Mar. Chem. doi:10.1016/j.marchem.2014.06.001

Holmes, L.A., Turner, A., Thompson, R.C., 2012. Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment. Environ. Pollut. 160, 42–48. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.052

Hong, S.H., Shim, W.J., Hong, L., 2017. Methods of analysing chemicals associated with microplastics: a review. Anal. Methods 9, 1361–1368. doi:10.1039/C6AY02971J

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 364, 2115–2126. doi:10.1098/rstb.2008.0311

Hosoda, J., Ofosu-Anim, J., Sabi, E.B., Akita, L.G., Onwona-Agyeman, S., Yamashita, R., Takada, H., 2014. Monitoring of organic micropollutants in Ghana by combination of pellet watch with sediment analysis: E-waste as a source of PCBs. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.008

Huang, P.-C., Tien, C.-J., Sun, Y.-M., Hsieh, C.-Y., Lee, C.-C., 2008. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. Chemosphere 73, 539–544. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.019

| I |

IARC, 2016. Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated BiphenylsI. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 107.

Imhof, H.K., Ivleva, N.P., Schmid, J., Niessner, R., Laforsch, C., 2013. Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. Curr. Biol. 23, R867–R868. doi:10.1016/j.cub.2013.09.001

Imhof, H.K., Laforsch, C., Wiesheu, A.C., Schmid, J., Anger, P.M., Niessner, R., Ivleva, N.P., 2016. Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. Water Res. 98, 64–74. doi:10.1016/j.watres.2016.03.015

Imhof, H.K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N.P., Laforsch, C., 2012. A novel highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. Limnol Ocean. Methods 10, 524–537. doi:10.4319/lom.2012.10.524

Ioakeimidis, C., Fotopoulou, K.N., Karapanagioti, H.K., Geraga, M., Zeri, C., Papathanassiou, E., Galgani, F., Papatheodorou, G., 2016. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. Sci. Rep. 6, 23501. doi:10.1038/srep23501

Isobe, A., Kubo, K., Tamura, Y., Kako, S., Nakashima, E., Fujii, N., 2014. Selective transport of microplastics and mesoplastics by drifting in coastal waters. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.09.041

ISO/IEC Guide 98-3, 2008. Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995) 130.

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.040

| J |

Jackson, C.R., Churchill, P.F., Roden, E.E., 2001. Successional Changes in Bacterial Assemblage Structure During Epilithic Biofilm Development. Ecology 82, 555–566. doi:10.1890/0012-9658(2001)082[0555:SCIBAS]2.0.CO;2

Jakubowicz, I., 2003. Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). Polym. Degrad. Stab. 80, 39–43. doi:10.1016/S0141-3910(02)00380-4

Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–771. doi:10.1126/science.1260352

Jang, M., Shim, W.J., Han, G.M., Rani, M., Song, Y.K., Hong, S.H., 2016. Styrofoam Debris as a Source of Hazardous Additives for Marine Organisms. Environ. Sci. Technol. 50, 4951–4960. doi:10.1021/acs.est.5b05485

Jayasiri, H.B., Purushothaman, C.S., Vennila, A., 2015. Bimonthly variability of persistent organochlorines in plastic pellets from four beaches in Mumbai coast, India. Environ. Monit. Assess. 187, 1–13. doi:10.1007/s10661-015-4531-5

Juc, L., 2007. Etude des risques liés à l'utilisation des pesticides organochlorés et impact sur l'environnement et la santé humaine. Thèse, Université Claude Bernard - Lyon 1.

| K |

Kang, J.-H., Kwon, O.Y., Lee, K.-W., Song, Y.K., Shim, W.J., 2015. Marine neustonic microplastics around the southeastern coast of Korea. Mar. Pollut. Bull. 96, 304–312. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.054

Kaposi, K.L., Mos, B., Kelaher, B.P., Dworjanyn, S.A., 2014. Ingestion of Microplastic Has Limited Impact on a Marine Larva. Environ. Sci. Technol. 48, 1638–1645. doi:10.1021/es404295e

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. Mar. Pollut. Bull. 62, 312–317. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.009

Karapanagioti, H.K., Klontza, I., 2008. Testing phenanthrene distribution properties of virgin plastic pellets and plastic eroded pellets found on Lesvos island beaches (Greece). Mar. Environ. Res. 65, 283–290. doi:10.1016/j.marenvres.2007.11.005

Karapanagioti, H.K., Ogata, Y., Takada, H., 2010. Eroded plastic pellets as monitoring tools for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) : Laboratory and field studies. Glob. Nest J. 12, 327-334.

Karl, H., Ostermeyer, U., Bauer, H., Miller, A., Mohn, K., Müller-Hohe, E., Neuhaus, H., Pölzelbauer, C., Stumme, B., Walter, M., 2014. Collaborative study for quantification of Anisakis larvae in spiked salmon fillets (Salmo salar) by a modified Codex digestion method. J. Für Verbraucherschutz Leb. 9, 359–365. doi:10.1007/s00003-014-0907-7

Kay, R., Alder, J., 2005. Coastal Planning and Management, 2 edition. ed. CRC Press, London ; New York.

Kenyon, K.W., Kridler, E., 1969. Laysan Albatrosses Swallow Indigestible Matter. The Auk 86, 339–343. doi:10.2307/4083505

Kiessling, T., Gutow, L., Thiel, M., 2015. Marine Litter as Habitat and Dispersal Vector, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 141–181. doi:10.1007/978-3-319-16510-3_6

Kim, Y.-O., Park, S., Nam, B.-H., Jung, Y.-T., Kim, D.-G., Lee, J.-S., Lee, S.-J., Yoon, J.-H., 2013. Litoreibacterhalocynthiae sp. nov., isolated from the sea squirt Halocynthia roretzi. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 3364–3368.

Kirstein, I.V., Kirmizi, S., Wichels, A., Garin-Fernandez, A., Erler, R., Löder, M., Gerdts, G., 2016. Dangerous hitchhikers? Evidence for potentially pathogenic Vibrio spp. on microplastic particles. Mar. Environ. Res. 120, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2016.07.004

Klouch, Z.K., Caradec, F., Plus, M., Hernández-Fariñas, T., Pineau-Guillou, L., Chapelle, A., Schmitt, S., Quéré, J., Guillou, L., Siano, R., 2016. Heterogeneous distribution in sediments and dispersal in waters of Alexandrium minutum in a semi-enclosed coastal ecosystem. Harmful Algae 60, 81–91. doi:10.1016/j.hal.2016.11.001

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. Environ. Sci. Technol. 50, 3315–3326. doi:10.1021/acs.est.5b06069

Kooi, M., Reisser, J., Slat, B., Ferrari, F.F., Schmid, M.S., Cunsolo, S., Brambini, R., Noble, K., Sirks, L.-A., Linders, T.E.W., Schoeneich-Argent, R.I., Koelmans, A.A., 2016. The effect of particle

properties on the depth profile of buoyant plastics in the ocean. Sci. Rep. 6, 33882. doi:10.1038/srep33882

Kowalewska, G., Konat-Stepowicz, J., Wawrzyniak-Wydrowska, B., Szymczak-Żyła, M., 2003. Transfer of organic contaminants to the Baltic in the Odra Estuary. Mar. Pollut. Bull. 46, 703–718. doi:10.1016/S0025-326X(03)00062-6

Kripa, V., Nair, P.G., Dhanya, A.M., Pravitha, V.P., Abhilash, K.S., Mohammed, A.A., Vijayan, D., Vishnu, P.G., Mohan, G., Anilkumar, P.S., Khambadkar, L.R., Prema, D., 2014. Microplastics in the gut of anchovies caught from the mud bank area of Alappuzha, Kerala. Mar. Fish. Inf. Serv. Tech. Ext. Ser. 27–28.

Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét-Ferguson, S., Meyer, D.W., Law, K.L., 2012. The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris. Geophys. Res. Lett. 39, L07601. doi:10.1029/2012GL051116

Kwon, B.G., Koizumi, K., Chung, S.-Y., Kodera, Y., Kim, J.-O., Saido, K., 2015. Global styrene oligomers monitoring as new chemical contamination from polystyrene plastic marine pollution. J. Hazard. Mater. 300, 359–367. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.07.039

Kwon, B.G., Saido, K., Koizumi, K., Sato, H., Ogawa, N., Chung, S.-Y., Kusui, T., Kodera, Y., Kogure, K., 2014. Regional distribution of styrene analogues generated from polystyrene degradation along the coastlines of the North-East Pacific Ocean and Hawaii. Environ. Pollut. 188, 45–49. doi:10.1016/j.envpol.2014.01.019

| L |

Lacroix, C., 2014. Impact des perturbateurs environnementaux sur un organisme sentinelle des milieux côtiers anthropisés, la moule bleue Mytilus edulis: Caractérisation génomique et écophysiologique de l'adaptation au stress (Thèse).

Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and "green" stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. J. Chromatogr. A 1349, 1–10. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.094

Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hiard, S., Caruso, A., 2016. Microplastic interactions with freshwater microalgae: Hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 215, 331–339. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.006

Laist, D.W., 1987. Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. Mar. Pollut. Bull. 18, 319–326. doi:10.1016/S0025-326X(87)80019-X

Lambert, S., Wagner, M., 2016. Formation of microscopic particles during the degradation of different polymers. Chemosphere 161, 510–517. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.07.042

Larzilliere, A., 2014. Document d'Objectifs Natura 2000 – Rade de Brest-estuaire de l'aulne et Rade de Brest, baie de Daoulas, anse du Poulmic, Tome 1 : Etat des lieux. Parc naturel régional d'Armorique, Brest métropole océane, DREAL Bretagne.

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.01.020

Lavers, J.L., Bond, A.L., Hutton, I., 2014. Plastic ingestion by Flesh-footed Shearwaters (Puffinus carneipes): Implications for fledgling body condition and the accumulation of plastic-derived chemicals. Environ. Pollut. 187, 124–129. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.020

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. doi:10.1126/science.1192321

Lazure, P., Dumas, F., 2008. An external–internal mode coupling for a 3D hydrodynamical model for applications at regional scale (MARS). Adv. Water Resour. 31, 223–250. doi:doi:10.1016/j.advwatres.2007.06.010

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. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.05.063

Le Pape, O., Del Amo, Y., Menesguen, A., Aminot, A., Quequiner, B., Treguer, P., 1996. Resistance of a coastal ecosystem to increasing eutrophic conditions: the Bay of Brest (France), a semi-enclosed zone of Western Europe. Cont. Shelf Res. 16, 1885–1907. doi:10.1016/0278-4343(95)00068-2

Le Roux, F., Wegner, K.M., Polz, M.F., 2016. Oysters and Vibrios as a model for disease dynamics in wild animals. Trends Microbiol. 24, 568–580.

Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., Lee, D.-H., 2008. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. J. Microbiol. 46, 174–182. doi:10.1007/s12275-008-0032-3

Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C.A., Mackenzie, D.M.A., Nielsen, T.G., 2015. A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. Mar. Pollut. Bull. 100, 82–91. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.09.026

Leslie, H.A., van Velzen, M.J.M., Vethaak, A.D., 2013. Microplastic survey of the Dutch environment Novel data set of microplastics in North Sea sediments, treated wastewater effluents and marine biota (No. R-13/11), IVM Institute for Environmental Studies. IVM.

Lett, C., Verley, P., Mullon, C., Parada, C., Brochier, T., Penven, P., Blanke, B., 2008. A Lagrangian tool for modelling ichthyoplankton dynamics. Environ. Model. Softw. 23, 1210–1214. doi:10.1016/j.envsoft.2008.02.005

Li, W.C., Tse, H.F., Fok, L., 2016. Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. Sci. Total Environ. 566–567, 333–349. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084

Lima, A.R.A., Costa, M.F., Barletta, M., 2014. Distribution patterns of microplastics within the plankton of a tropical estuary. Environ. Res. 132, 146–155. doi:10.1016/j.envres.2014.03.031

Lin, X., Yang, B., Shen, J., Du, N., 2009. Biodegradation of crude oil by an arctic psychrotrophic bacterium Pseudoalteromomas sp. P29. Curr. Microbiol. 59, 341–345.

Lithner, D., Larsson, Å., Dave, G., 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. Sci. Total Environ. 409, 3309–3324. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.038

Liubartseva, S., Coppini, G., Lecci, R., Creti, S., 2016. Regional approach to modeling the transport of floating plastic debris in the Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. 103, 115–127. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.12.031

Llarena-Reino, M., Piñeiro, C., Antonio, J., Outeriño, L., Vello, C., González, Á.F., Pascual, S., 2013. Optimization of the pepsin digestion method for anisakids inspection in the fishing industry. Vet. Parasitol. 191, 276–283. doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.015

Llorca, M., Farre, M., Karapanagioti, H.K., Barcelo, D., 2014. Levels and fate of perfluoroalkyl substances in beached plastic pellets and sediments collected from Greece. Mar. Pollut. Bull. 87, 286–291. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.07.036

Lobelle, D., Cunliffe, M., 2011. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. Mar. Pollut. Bull. 62, 197–200. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.10.013

Löder, M.G.J., Gerdts, G., 2015. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 201–227.

Löder, M.G.J., 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.

Lohmann, R., 2012. Critical Review of Low-Density Polyethylene's Partitioning and Diffusion Coefficients for Trace Organic Contaminants and Implications for Its Use As a Passive Sampler. Environ. Sci. Technol. 46, 606–618. doi:10.1021/es202702y

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. Mar. Chem. 175, 39–46. doi:10.1016/j.marchem.2015.04.003

Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., Ren, H., 2016. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and Toxic Effects in Liver. Environ. Sci. Technol. doi:10.1021/acs.est.6b00183

Lusher, A., 2015. Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 245–307.

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.08.023

Lusher, A.L., Hernandez-Milian, G., O'Brien, J., Berrow, S., O'Connor, I., Officer, R., 2015a. Microplastic and macroplastic ingestion by a deep diving, oceanic cetacean: The True's beaked whale Mesoplodon mirus. Environ. Pollut. 199, 185–191. doi:10.1016/j.envpol.2015.01.023

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.11.028

Lusher, A.L., Tirelli, V., O'Connor, I., Officer, R., 2015b. Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples. Sci. Rep. 5, 14947. doi:10.1038/srep14947

| M |

Mackintosh, C.E., Maldonado, J., Hongwu, J., Hoover, N., Chong, A., Ikonomou, M.G., Gobas, F.A.P.C., 2004. Distribution of Phthalate Esters in a Marine Aquatic Food Web: Comparison to Polychlorinated Biphenyls. Environ. Sci. Technol. 38, 2011–2020. doi:10.1021/es034745r

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, Dunthorn, M., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2, e593. doi:10.7717/peerj.593

Maher, W., Krikowa, F., Wruck, D., Louie, H., Nguyen, T., Huang, W., 2002. Determination of total phosphorus and nitrogen in turbid waters by oxidation with alkaline potassium peroxodisulfate and low pressure microwave digestion, autoclave heating or the use of closed vessels in a hot water bath: comparison with Kjeldahl digestion. Anal. Chim. Acta 463, 283–293. doi:10.1016/S0003-2670(02)00346-X

Mansui, J., Molcard, A., Ourmières, Y., 2015. Modelling the transport and accumulation of floating marine debris in the Mediterranean basin. Mar. Pollut. Bull. 91, 249–257. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.11.037

Marchand, M., Caprais, J.-C., Cossonmannevy, M., Moriniere, P., 1983. Apports et distribution des résidus organochlorés à haut poids moléculaire dans la rade de Brest (milieu marin semi-fermé). Oceanol. Acta 6, 269–282.

Martins, J., Sobral, P., 2011. Plastic marine debris on the Portuguese coastline: A matter of size? Mar. Pollut. Bull. 62, 2649–2653. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.09.028

Maso, M., Garces, E., Pages, F., Camp, J., 2003. Drifting plastic debris as a potential vector for dispersing Harmful Algal Bloom (HAB) species. Sci. Mar. 67, 107–111.

Mason, S.A., Garneau, D., Sutton, R., Chu, Y., Ehmann, K., Barnes, J., Fink, P., Papazissimos, D., Rogers, D.L., 2016. Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. Environ. Pollut. 218, 1045–1054. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.056

Mathalon, A., Hill, P., 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Mar. Pollut. Bull. 81, 69–79. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.02.018

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. Environ. Sci. Technol. 35, 318–324. doi:10.1021/es0010498

Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, L., Mouchel, O., Soudant, P., Robbens, J., Huvet, A., Zambonino-Infante, J., 2015. Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Mar. Environ. Res. 112, Part A, 78–85. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.009

McCormick, A., Hoellein, T.J., Mason, S.A., Schluep, J., Kelly, J.J., 2014. Microplastic is an Abundant and Distinct Microbial Habitat in an Urban River. Environ. Sci. Technol. 48, 11863–11871. doi:10.1021/es503610r

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.10.017

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217

Metzger, P., D'Ercole, R., 2011. Les risques en milieu urbain : éléments de réflexion. EchoGéo. doi:10.4000/echogeo.12640

Meur-Ferec, C., Lageat, Y., Hénaff, A., 2013. La gestion des risques côtiers en France métropolitaine: évolution des doctrines, inertie des pratiques? Géorisques 4/ Le littoral: caractérisation et gestion d'un espace à risques, 57–67.

Michałowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environ. Toxicol. Pharmacol. 37, 738–758. doi:10.1016/j.etap.2014.02.003

Michielssen, M.R., Michielssen, E.R., Ni, J., Duhaime, M.B., 2016. Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. Environ. Sci. Water Res. Technol. 2, 1064–1073. doi:10.1039/C6EW00207B

Mizukawa, K., Takada, H., Ito, M., Geok, Y.B., Hosoda, J., Yamashita, R., Saha, M., Suzuki, S., Miguez, C., Frias, J., Antunes, J.C., Sobral, P., Santos, I., Micaelo, C., Ferreira, A.M., 2013. Monitoring of a wide range of organic micropollutants on the Portuguese coast using plastic resin pellets. Mar. Pollut. Bull. 70, 296–302. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.02.008

Mohamed Nor, N.H., Obbard, J.P., 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. Mar. Pollut. Bull. 79, 278–283. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.11.025

Monbet, Y., Bassoulet, P., 1989. Bilan des connaissances océanographiques en rade de Brest.

Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. Plast. World 108, 131–139. doi:10.1016/j.envres.2008.07.025

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. doi:10.1016/S0025-326X(01)00114-X

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 coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 44, 1035–1038. doi:10.1016/S0025-326X(02)00150-9

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.07.020

Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F., Quinn, B., 2016. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. Environ. Sci. Technol. 50, 5800–5808. doi:10.1021/acs.est.5b05416

Murphy, J., 2001. Additives for Plastics Handbook (Second Edition). Elsevier Science, Amsterdam.

Murray, F., Cowie, P.R., 2011. Plastic contamination in the decapod crustacean Nephrops norvegicus (Linnaeus, 1758). Mar. Pollut. Bull. 62, 1207–1217. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.03.032

Muthukumar, T., Aravinthan, A., Lakshmi, K., Venkatesan, R., Vedaprakash, L., Doble, M., 2011. Fouling and stability of polymers and composites in marine environment. Int. Biodeterior. Biodegrad. 65, 276–284. doi:10.1016/j.ibiod.2010.11.012

| N |

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. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 214, 517–523. doi:10.1016/j.envpol.2016.04.054

Nakashima, E., Isobe, A., Kako, S. 'ichiro, Itai, T., Takahashi, S., 2012. Quantification of Toxic Metals Derived from Macroplastic Litter on Ookushi Beach, Japan. Environ. Sci. Technol. 46, 10099–10105. doi:10.1021/es301362g

Napper, I.E., Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. Mar. Pollut. Bull. 99, 178–185. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.029

Naudin, C.-A., Clozza, C., 1987. Charges. Tech. Ing.

Nealson, K.H., Hastings, J.W., 2006. Quorum sensing on a global scale: massive numbers of bioluminescent bacteria make milky seas. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2295–2297.

Neff, J.M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates, and biological effects. Applied Science Publishers.

Neha, S., Tripathi, B.K., Shrivastava, A.K., Chauhan, R., 2014. LASER RAMAN STUDIES OF FIBROUS POLYMER - A REVIEW. SOURCE Int. J. Eng. Manag. Sci. Vol. 5, p128.

Nelson, G.C., Dobermann, A., Nakicenovic, N., O'Neill, B.C., 2006. Anthropogenic drivers of ecosystem change: An overview. Ecol. Soc. 11.

Nelson, M.C., Morrison, H.G., Benjamino, J., Grim, S.L., Graf, J., 2014. Analysis, Optimization and Verification of Illumina-Generated 16S rRNA Gene Amplicon Surveys. PLOS ONE 9, e94249. doi:10.1371/journal.pone.0094249

Net, S., El-Osmani, R., Prygiel, E., Rabodonirina, S., Dumoulin, D., Ouddane, B., 2015. Overview of persistent organic pollution (PAHs, Me-PAHs and PCBs) in freshwater sediments from Northern France. J. Geochem. Explor. 148, 181–188. doi:10.1016/j.gexplo.2014.09.008

Ng, K.L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. Mar. Pollut. Bull. 52, 761–767. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.11.017

Norén, F., 2007. Small plastic particles in Coastal Swedish waters. KIMO Sweden, Göteborg, Sweden.

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. doi:10.1016/j.envpol.2013.07.027

| O |

Obbard, R.W., Sadri, S., Wong, Y.Q., Khitun, A.A., Baker, I., Thompson, R.C., 2014. Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice. Earths Future 2014EF000240. doi:10.1002/2014EF000240

Oberbeckmann, S., Löder, M.G.J., Labrenz, M., 2015. Marine microplastic-associated biofilms – a review. Environ. Chem. 12, 551–562.

Oberbeckmann, S., Loeder, M.G.J., Gerdts, G., Osborn, A.M., 2014. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. FEMS Microbiol. Ecol. 90, 478–492. doi:10.1111/1574-6941.12409

Oberbeckmann, S., Osborn, A.M., Duhaime, M.B., 2016. Microbes on a Bottle: Substrate, Season and Geography Influence Community Composition of Microbes Colonizing Marine Plastic Debris. PLOS ONE 11, e0159289. doi:10.1371/journal.pone.0159289

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Look, K.J.W.V., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364, 2047–2062. doi:10.1098/rstb.2008.0242

Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M.P., Dung, L.Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H.K., Weerts, S., McClurg, T., Burres, E., Smith, W., Velkenburg, M.V., Lang, J.S., Lang, R.C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N., Thompson, R.C., 2009. International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. Mar. Pollut. Bull. 58, 1437–1446. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.06.014

Ogonowski, M., Schür, C., Jarsén, Å., Gorokhova, E., 2016. The Effects of Natural and Anthropogenic Microparticles on Individual Fitness in Daphnia magna. PLOS ONE 11, e0155063. doi:10.1371/journal.pone.0155063

Ohyama, K., Nagai, F., Tsuchiya, Y., 2001. Certain styrene oligomers have proliferative activity on MCF-7 human breast tumor cells and binding affinity for human estrogen receptor alpha. Environ. Health Perspect. 109, 699–703. doi:10.2307/3454786

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. doi:10.1016/j.ecolind.2013.06.019

OSPAR, 2015. OSPAR request on development of a common monitoring protocol for plastic particles in fish stomachs and selected shellfish on the basis of existing fish disease surveys. ICES Advice 2015 - Book 1 1–6.

| P |

Papaleo, B., Caporossi, L., Bernardini, F., Cristadoro, L., Bastianini, L., De Rosa, M., Capanna, S., Marcellini, L., Loi, F., Battista, G., 2011. Exposure to Styrene in Fiberglass-Reinforced Plastic Manufacture: Still a Problem. J. Occup. Environ. Med. 53, 1273–1278. doi:10.1097/JOM.0b013e31822e5830

Parslow, J.L.F., Jefferies, D.J., 1972. Elastic thread pollution of puffins. Mar. Pollut. Bull. 3, 43–45. doi:10.1016/0025-326X(72)90142-7

Patterson, G., 2012. Materia Polymerica, in: A Prehistory of Polymer Science, SpringerBriefs in Molecular Science. Springer Berlin Heidelberg, pp. 3–24. doi:10.1007/978-3-642-21637-4_2

Paul-Pont, I., Lacroix, C., González Fernández, C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frère, L., Cassone, A.-L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., Soudant, P., 2016. Exposure of marine mussels Mytilus spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. Environ. Pollut. Barking Essex 1987. doi:10.1016/j.envpol.2016.06.039

Pedà, C., Caccamo, L., Fossi, M.C., Gai, F., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., Romeo, T., Maricchiolo, G., 2016. Intestinal alterations in European sea bass Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. Environ. Pollut. 212, 251–256. doi:10.1016/j.envpol.2016.01.083

Pedrotti, M.L., Petit, S., Elineau, A., Bruzaud, S., Crebassa, J.-C., Dumontet, B., Martí, E., Gorsky, G., Cózar, A., 2016. Changes in the Floating Plastic Pollution of the Mediterranean Sea in Relation to the Distance to Land. PLOS ONE 11, e0161581. doi:10.1371/journal.pone.0161581

Pegram, J.E., Andrady, A.L., 1989. Outdoor weathering of selected polymeric materials under marine exposure conditions. Polym. Degrad. Stab. 26, 333–345. doi:10.1016/0141-3910(89)90112-2

Peliz, A., Marchesiello, P., Dubert, J., Marta-Almeida, M., Roy, C., Queiroga, H., 2007. A study of crab larvae dispersal on the Western Iberian Shelf: Physical processes. J. Mar. Syst. 68, 215–236. doi:10.1016/j.jmarsys.2006.11.007

Pham, C.K., Ramirez-Llodra, E., Alt, C.H.S., Amaro, T., Bergmann, M., Canals, M., Company, J.B., Davies, J., Duineveld, G., Galgani, F., Howell, K.L., Huvenne, V.A.I., Isidro, E., Jones, D.O.B., Lastras, G., Morato, T., Gomes-Pereira, J.N., Purser, A., Stewart, H., Tojeira, I., Tubau, X., Rooij, D.V., Tyler, P.A., 2014. Marine Litter Distribution and Density in European Seas, from the Shelves to Deep Basins. PLOS ONE 9, e95839. doi:10.1371/journal.pone.0095839

Phillips, M.B., Bonner, T.H., 2015. Occurrence and amount of microplastic ingested by fishes in watersheds of the Gulf of Mexico. Mar. Pollut. Bull. 100, 264–269. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.08.041

Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., Lagarde, F., 2017. 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. 1–10. doi:10.1007/s11356-017-8862-3

PlasticsEurope, 2016. Plastics - the Facts 2016 [WWW Document]. URL http://www.plasticseurope.fr/Document/plastics---the-facts-2016-15787.aspx?FolID=2 (accessed 3.17.17).

PlasticsEurope, 2015. Plastics – the Facts 2015: An analysis of European plastics production, demand and waste data.

Pommepuy, M., Manaud, Y., Monbet, Y., Allen, G., Salomon, J.C., Gentien, P., L'Yavang, J., 1979. Etude océanographique appiquée au S.A.U.M. de la rade de Brest. CNEXO Actes Colloq. N°9 211–226.

Porte, C., Solé, M., Borghi, V., Martinez, M., Chamorro, J., Torreblanca, A., Ortiz, M., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2001. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel Mytilus galloprovincialis from the Spanish Mediterranean coast. Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem. 6, 335–350. doi:10.1080/13547500110044771

Potin, P., Floc'h, J.Y., Augris, C., Cabioch, J., 1990. Annual growth rate of the calcareous red alga Lithothamnion corallioides (Corallinales, Rhodophyta) in the Bay of Brest, France. Hydrobiologia 204–205, 263–267. doi:10.1007/BF00040243

Provencher, J.F., Bond, A.L., Hedd, A., Montevecchi, W.A., Bin Muzaffar, S., Courchesne, S.J., Gilchrist, H.G., Jamieson, S.E., Merkel, F.R., Falk, K., Durinck, J., Mallory, M.L., 2014. Prevalence of marine debris in marine birds from the North Atlantic. Mar. Pollut. Bull. 84, 411–417. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.04.044

Puls, J., Wilson, S.A., Hölter, D., 2011. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. J. Polym. Environ. 19, 152–165. doi:10.1007/s10924-010-0258-0

| Q |

Qiu, Q., Tan, Z., Wang, J., Peng, J., Li, M., Zhan, Z., 2016. Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. Estuar. Coast. Shelf Sci. 176, 102–109. doi:10.1016/j.ecss.2016.04.012

Quiniou, F., Judas, A., Le Squer-Andre, E., 1997. Toxicité potentielle des eaux et des sédiments des principaux estuaires de la rade de Brest évaluée par deux bio-essais. Ann. Inst. Océan. 73, 35–48.

Quinn, B., Murphy, F., Ewins, C., 2017. Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. Anal. Methods 9, 1491–1498. doi:10.1039/C6AY02542K

| R |

R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rani, M., Shim, W.J., Han, G.M., Jang, M., Al-Odaini, N.A., Song, Y.K., Hong, S.H., 2015. Qualitative Analysis of Additives in Plastic Marine Debris and Its New Products. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 352–366. doi:10.1007/s00244-015-0224-x

Raoux, C., 1991. Modélisation du mécanisme de contamination par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) des sédiments marins côtiers de Méditerranée : conséquences sur la biodisponibilité des HAP dans le milieu marin. University bordeaux I, Bordeaux, France.

Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D.K.A., Thums, M., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Pattiaratchi, C., 2014. Millimeter-Sized Marine Plastics: A New Pelagic Habitat for Microorganisms and Invertebrates. PLoS ONE 9, e100289. doi:10.1371/journal.pone.0100289

Reisser, J., Shaw, J., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Proietti, M., Thums, M., Pattiaratchi, C., 2013. Marine Plastic Pollution in Waters around Australia: Characteristics, Concentrations, and Pathways. Plos One 8, e80466. doi:10.1371/journal.pone.0080466

Reisser, J., Slat, B., Noble, K., du Plessis, K., Epp, M., Proietti, M., de Sonneville, J., Becker, T., Pattiaratchi, C., 2015. The vertical distribution of buoyant plastics at sea: an observational study in the North Atlantic Gyre. Biogeosciences 12, 1249–1256. doi:10.5194/bg-12-1249-2015

Remy, F., Collard, F., Gilbert, B., Compère, P., Eppe, G., Lepoint, G., 2015. When Microplastic Is Not Plastic: The Ingestion of Artificial Cellulose Fibers by Macrofauna Living in Seagrass Macrophytodetritus. Environ. Sci. Technol. 49, 11158–11166. doi:10.1021/acs.est.5b02005

Reyne, M., 1998. Aspects technico-économiques de l'utilisation des plastiques - tiaam-am3020-version1.pdf. Tech. Ing.

Ricking, M., Schwarzbauer, J., 2012. DDT isomers and metabolites in the environment: an overview. Environ. Chem. Lett. 10, 317–323. doi:10.1007/s10311-012-0358-2

Riedel, T., Fiebig, A., Petersen, J., Gronow, S., Kyrpides, N.C., Göker, M., Klenk, H.-P., 2013. Genome sequence of the Litoreibacter arenae type strain (DSM 19593 T), a member of the Roseobacter clade isolated from sea sand. Stand. Genomic Sci. 9, 117.

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." J. Environ. Monit. JEM 12, 2226–2236. doi:10.1039/c0em00239a

Rios, L.M., Moore, C., Jones, P.R., 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. Mar. Pollut. Bull. 54, 1230–1237. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.03.022

Rios Mendoza, L.M., Jones, P.R., 2015. Characterisation of microplastics and toxic chemicals extracted from microplastic samples from the North Pacific Gyre. Environ. Chem. 12, 611–617.

Rocha, S., Domingues, V.F., Pinho, C., Fernandes, V.C., Delerue-Matos, C., Gameiro, P., Mansilha, C., 2012. Occurrence of Bisphenol A, Estrone, 17β-Estradiol and 17α-Ethinylestradiol in Portuguese Rivers. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90, 73–78. doi:10.1007/s00128-012-0887-1

Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2014. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. TrAC Trends Anal. Chem. doi:10.1016/j.trac.2014.10.011

Rochman, C.M., 2015. The Complex Mixture, Fate and Toxicity of Chemicals Associated with Plastic Debris in the Marine Environment, in: Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (Eds.), Marine Anthropogenic Litter. Springer International Publishing, pp. 117–140.

Rochman, C.M., Browne, M.A., Underwood, A.J., van Franeker, J.A., Thompson, R.C., Amaral-Zettler, L.A., 2016. The ecological impacts of marine debris: unraveling the demonstrated evidence from what is perceived. Ecology 97, 302–312. doi:10.1890/14-2070.1

Rochman, C.M., Hentschel, B.T., Teh, S.J., 2014a. Long-Term Sorption of Metals Is Similar among Plastic Types: Implications for Plastic Debris in Aquatic Environments. Plos One 9, e85433. doi:10.1371/journal.pone.0085433

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. doi:10.1038/srep03263

Rochman, C.M., Kurobe, T., Flores, I., Teh, S.J., 2014b. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. Sci. Total Environ. 493, 656–661. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.051

Rochman, C.M., Lewison, R.L., Eriksen, M., Allen, H., Cook, A.-M., Teh, S.J., 2014c. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish tissue may be an indicator of plastic contamination in marine habitats. Sci. Total Environ. 476–477, 622–633. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.058

Rochman, C.M., Tahir, A., Williams, S.L., Baxa, D.V., Lam, R., Miller, J.T., Teh, F.-C., Werorilangi, S., Teh, S.J., 2015. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. Sci. Rep. 5, 14340. doi:10.1038/srep14340

Rodríguez, A., Rodríguez, B., Nazaret Carrasco, M., 2012. High prevalence of parental delivery of plastic debris in Cory's shearwaters (Calonectris diomedea). Mar. Pollut. Bull. 64, 2219–2223. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.011

Rodríguez-Seijo, A., Pereira, R., 2017. Chapter 3 - Morphological and Physical Characterization of Microplastics, in: Duarte, T.A.P.R.-S. and A.C. (Ed.), Comprehensive Analytical Chemistry, Characterization and Analysis of Microplastics. Elsevier, pp. 49–66. doi:10.1016/bs.coac.2016.10.007

Rogers, J.A., Mirza, R.S., 2013. The Effects of Bisphenol-A on the Immune System of Wild Yellow Perch, Perca flavescens. Water. Air. Soil Pollut. 224, 1–6. doi:10.1007/s11270-013-1728-5

Romanenko, L.A., Tanaka, N., Frolova, G.M., Svetashev, V.I., Mikhailov, V.V., 2011. Litoreibacter albidus gen. nov., sp. nov. and Litoreibacter janthinus sp. nov., members of the class Alphaproteobacteria isolated from the seashore. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 148–154. doi:10.1099/ijs.0.019513-0

Ryan, P.G., Moore, C.J., Franeker, J.A. van, Moloney, C.L., 2009. Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364, 1999–2012. doi:10.1098/rstb.2008.0207

| S |

Sá, S., Bastos-Santos, J., Araújo, H., Ferreira, M., Duro, V., Alves, F., Panta-Ferreira, B., Nicolau, L., Eira, C., Vingada, J., 2016. Spatial distribution of floating marine debris in offshore continental Portuguese waters. Mar. Pollut. Bull. 104, 269–278. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.011

Sadri, S.S., Thompson, R.C., 2014. On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. Mar. Pollut. Bull. 81, 55–60. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.02.020

Saido, K., Koizumi, K., Sato, H., Ogawa, N., Kwon, B.G., Chung, S.-Y., Kusui, T., Nishimura, M., Kodera, Y., 2014. New analytical method for the determination of styrene oligomers formed from polystyrene decomposition and its application at the coastlines of the North-West Pacific Ocean. Sci. Total Environ. 473–474, 490–495. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.081

Sala, O.E., Chapin, F.S., Iii, Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. Science 287, 1770–1774. doi:10.1126/science.287.5459.1770

Salomon, J.C., Breton, M., 1991. Numerical study of the dispersive capacity of the Bay of Brest, France, towards dissolved substances. Environ. Hydraul. 459–464.

Sander, M.M., Nicolau, A., Guzatto, R., Samios, D., 2012. Plasticiser effect of oleic acid polyester on polyethylene and polypropylene. Polym. Test. 31, 1077–1082. doi:10.1016/j.polymertesting.2012.08.006

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463–5467.

Santín, G., Eljarrat, E., Barceló, D., 2016. Simultaneous determination of 16 organophosphorus flame retardants and plasticizers in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1441, 34–43. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.058

Satoto, R., Subowo, W.S., Yusiasih, R., Takane, Y., Watanabe, Y., Hatakeyama, T., 1997. Weathering of high-density polyethylene in different latitudes. Polym. Degrad. Stab. 56, 275–279. doi:10.1016/S0141-3910(96)00213-3

Scheirs, J., Priddy, D., 2003. Modern Styrenic Polymers: Polystyrenes and Styrenic Copolymers. John Wiley & Sons.

Schmidt, V.T., Reveillaud, J., Zettler, E., Mincer, T.J., Murphy, L., Amaral-Zettler, L.A., 2014. Oligotyping reveals community level habitat selection within the genus Vibrio. Front. Microbiol. 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00563

Sebille, E. van, Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B.D., Franeker, J.A. van, Eriksen, M., Siegel, D., Galgani, F., Law, K.L., 2015. A global inventory of small floating plastic debris. Environ. Res. Lett. 10, 124006. doi:10.1088/1748-9326/10/12/124006

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 12, R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60

Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. Environ. Pollut. 185, 77–83. doi:10.1016/j.envpol.2013.10.013

Seymour, R.B., Mark, H.F., Pauling, L., Fisher, C.H., Stahl, G.A., Sperling, L.H., Marvel, C.S., Jr, C.E.C., 1989a. The Development of Thermosets by Lee Baekeland and Other Early 20th Century Chemists, in: Seymour, R.B. (Ed.), Pioneers in Polymer Science, Chemists and Chemistry. Springer Netherlands, pp. 81–92. doi:10.1007/978-94-009-2407-9_7

Seymour, R.B., Mark, H.F., Pauling, L., Fisher, C.H., Stahl, G.A., Sperling, L.H., Marvel, C.S., Jr, C.E.C., 1989b. Pre-Twentieth Century Polymer Pioneers, in: Seymour, R.B. (Ed.), Pioneers in Polymer Science, Chemists and Chemistry. Springer Netherlands, pp. 1–11. doi:10.1007/978-94-009-2407-9_1

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnol. Adv. 26, 246–265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005

Shahidul Islam, M., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar. Pollut. Bull. 48, 624–649. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.12.004

Shiber, J., 1979. Plastic Pellets on the Coast of Lebanon. Mar. Pollut. Bull. 10, 28–30. doi:10.1016/0025-326X(79)90321-7

Shim, W.J., Hong, S.H., Eo, S.E., 2017. Identification methods in microplastic analysis: a review. Anal. Methods 9, 1384–1391. doi:10.1039/C6AY02558G

Shim, W.J., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., 2016. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. Mar. Pollut. Bull. 113, 469–476. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.10.049

Shim, W.J., Thompson, R.C., 2015. Microplastics in the Ocean. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 69, 265–268. doi:10.1007/s00244-015-0216-x

Shimao, M., 2001. Biodegradation of plastics. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 242–247.

Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M., 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. Mol. Ecol. 21, 1794–1805. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x

Shrivastava, A., Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron. Young Sci. 2, 21. doi:10.4103/2229-5186.79345

Sicre, M.A., Marty, J.C., Saliot, A., Aparicio, X., Grimalt, J., Albaiges, J., 1987. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: Occurrence and origin. Atmospheric Environ. 1967 21, 2247–2259. doi:10.1016/0004-6981(87)90356-8

Sjollema, S.B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H.A., Kraak, M.H.S., Vethaak, A.D., 2016. Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? Aquat. Toxicol. 170, 259–261. doi:10.1016/j.aquatox.2015.12.002

Small, C., Nicholls, R.J., 2003. A Global Analysis of Human Settlement in Coastal Zones. J. Coast. Res. 19, 584–599.

Soclo, H.H., Garrigues, P., Ewald, M., 1986. Analyse quantitative des hydrocrabures aromatiques polycycliques dans les sédiments récents par chromatographie en phase liquide et détection spectrofluorimétrique. Analysis 14, 344–350.

Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Rani, M., Lee, J., Shim, W.J., 2015. A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. Mar. Pollut. Bull. 93, 202–209. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.01.015

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. Environ. Sci. Technol. doi:10.1021/es501757s

Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G., Theobald, N., 2003. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. Environ. Pollut. 124, 497–507. doi:10.1016/S0269-7491(02)00483-9

Staples, C., Mihaich, E., Ortego, L., Caspers, N., Klečka, G., Woelz, J., Hentges, S., 2016. Characterizing the effects of bisphenol A on sediment-dwelling benthic organisms. Environ. Toxicol. Chem. 35, 652–659. doi:10.1002/etc.3217

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.07.022

Suaria, G., Aliani, S., 2014. Floating debris in the Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 86, 494–504. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.025

Suaria, G., Avio, C.G., Mineo, A., Lattin, G.L., Magaldi, M.G., Belmonte, G., Moore, C.J., Regoli, F., Aliani, S., 2016. The Mediterranean Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. Sci. Rep. 6, 37551. doi:10.1038/srep37551

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goïc, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. Proc. Natl. Acad. Sci. 201519019. doi:10.1073/pnas.1519019113

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. Mar. Pollut. Bull. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.05.077

| T |

Tagg, A.S., Sapp, M., Harrison, J.P., Ojeda, J.J., 2015. Identification and Quantification of Microplastics in Wastewater Using Focal Plane Array-Based Reflectance Micro-FT-IR Imaging. Anal. Chem. 87, 6032–6040. doi:10.1021/acs.analchem.5b00495

Takada, H., 2006. Call for pellets! International Pellet Watch global monitoring of POPs using beached plastic resin pellets. Mar. Pollut. Bull. 52, 1547–1548. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.10.010

Talsness, C.E., Andrade, A.J.M., Kuriyama, S.N., Taylor, J.A., Saal, F.S. vom, 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2079–2096. doi:10.1098/rstb.2008.0281

Tanabe, S., Tatsukawa, R., Kawano, M., Hidaka, H., 1982. Global distribution and atmospheric transport of chlorinated hydrocarbons: HCH (BHC) isomers and DDT compounds in the Western Pacific, Eastern Indian and Antarctic Oceans. J. Oceanogr. Soc. Jpn. 38, 137–148. doi:10.1007/BF02110285

Taniguchi, S., Colabuono, F.I., Dias, P.S., Oliveira, R., Fisner, M., Turra, A., Izar, G.M., Abessa, D.M.S., Saha, M., Hosoda, J., Yamashita, R., Takada, H., Lourenço, R.A., Magalhães, C.A., Bícego, M.C., Montone, R.C., 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. Mar. Pollut. Bull. 106, 87–94. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.03.024

ter Halle, A., Ladirat, L., Gendre, X., Goudouneche, D., Pusineri, C., Routaboul, C., Tenailleau, C., Duployer, B., Perez, E., 2016. Understanding the Fragmentation Pattern of Marine Plastic Debris. Environ. Sci. Technol. 50, 5668–5675. doi:10.1021/acs.est.6b00594

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. doi:10.1021/es071737s

Teuten, E. L., Saquing, J.M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Bjorn, 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. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 364, 2027–2045. doi:10.1098/rstb.2008.0284

Thiel, M., Hinojosa, I.A., Miranda, L., Pantoja, J.F., Rivadeneira, M.M., Vasquez, N., 2013. Anthropogenic marine debris in the coastal environment: A multi-year comparison between coastal waters and local shores. Mar. Pollut. Bull. 71, 307–316. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.005

Thomas, N.L., McLauchlin, A.R., Clarke, J., Patrick, S.G., 2012. Oxo-degradable plastics: degradation, environmental impact and recycling. Proc. Inst. Civ. Eng. Waste Resour. Manag. 165, 133–140.

Thomas, S., Durand, G., 1995. Suivi des pesticides en rade de Brest, in: Actes Du Colloque. Presented at the Programme Rade. 3e rencontres scientifiques internationales, Brest, pp. 373–387.

Thompson, R.C., 2006. Plastic debris in the marine environment: consequences and solutions. Mar. Nat. Conserv. Eur. 2006 107–115.

Thompson, R.C., Moore, C.J., Saal, F.S. vom, Swan, S.H., 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 364, 2153–2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053

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, 838–838. doi:10.1126/science.1094559

Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U., Aiba, S., 2009. Biodegradability of Plastics. Int. J. Mol. Sci. 10, 3722–3742. doi:10.3390/ijms10093722

Topçu, E.N., Tonay, A.M., Dede, A., Öztürk, A.A., Öztürk, B., 2013. Origin and abundance of marine litter along sandy beaches of the Turkish Western Black Sea Coast. Mar. Environ. Res. 85, 21–28. doi:10.1016/j.marenvres.2012.12.006

Tourinho, P.S., Ivar do Sul, J.A., Fillmann, G., 2010. Is marine debris ingestion still a problem for the coastal marine biota of southern Brazil? Mar. Pollut. Bull. 60, 396–401. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.10.013

Troadec, P. coor., Le goff, R. coor., et al..., 1997. Contrat de baie : La Rade de Brest et son bassin versant - Etat des lieux et des milieux. COMMUNAUTE URBAINE DE BREST, Brest.

Tubau, X., Canals, M., Lastras, G., Rayo, X., Rivera, J., Amblas, D., 2015. Marine litter on the floor of deep submarine canyons of the Northwestern Mediterranean Sea: The role of hydrodynamic processes. Prog. Oceanogr. 134, 379–403. doi:10.1016/j.pocean.2015.03.013

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. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.09.027

Turra, A., Manzano, A.B., Dias, R.J.S., Mahiques, M.M., Barbosa, L., Balthazar-Silva, D., Moreira, F.T., 2014. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms. Sci. Rep. 4. doi:10.1038/srep04435

| U |

Ugolini, A., Ungherese, G., Ciofini, M., Lapucci, A., Camaiti, M., 2013. Microplastic debris in sandhoppers. Estuar. Coast. Shelf Sci. 129, 19–22. doi:10.1016/j.ecss.2013.05.026

Underwood, A.J., Chapman, M.G., Browne, M.A., 2017. Some problems and practicalities in design and interpretation of samples of microplastic waste. Anal. Methods 9, 1332–1345. doi:10.1039/C6AY02641A

UNEP, 2016a. Tackling plastic pollution should begin at the source. Microplastics.

UNEP, 2016b. Marine plastic debris and microplastics - global lessons and research to inspire action and guide policy change. United Nations Environment Programme, Nairobi.

UNEP, GRID-Arendal, 2016. Marine Litter Vital Graphics. United Nations Environment Programme and Grid-Arendal.

Unger, A., Harrison, N., 2016. Fisheries as a source of marine debris on beaches in the United Kingdom. Mar. Pollut. Bull. 107, 52–58. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.024

| V |

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, 258–263. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.09.039

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015. Microplastics are taken up by mussels (Mytilus edulis) and lugworms (Arenicola marina) living in natural habitats. Environ. Pollut. 199, 10–17. doi:10.1016/j.envpol.2015.01.008

Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environ. Pollut. 193, 65–70. doi:10.1016/j.envpol.2014.06.010

Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., Janssen, C.R., 2013. Microplastic pollution in deep-sea sediments. Environ. Pollut. 182, 495–499. doi:10.1016/j.envpol.2013.08.013

van den Beld, I.M.J., Guillaumont, B., Menot, L., Bayle, C., Arnaud-Haond, S., Bourillet, J.-F., 2016. Marine litter in submarine canyons of the Bay of Biscay. Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr. doi:10.1016/j.dsr2.2016.04.013

van Franeker, J.A., Blaize, C., Danielsen, J., Fairclough, K., Gollan, J., Guse, N., Hansen, P.-L., Heubeck, M., Jensen, J.-K., Le Guillou, G., Olsen, B., Olsen, K.-O., Pedersen, J., Stienen, E.W.M., Turner, D.M., 2011. Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar Fulmarus glacialis in the North Sea. Environ. Pollut., Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity 159, 2609–2615. doi:10.1016/j.envpol.2011.06.008

van Wezel, A., Caris, I., Kools, S., 2015. Release of primary microplastics from consumer products to wastewater in The Netherlands. Environ. Toxicol. Chem. SETAC. doi:10.1002/etc.3316

Velzeboer, I., Kwadijk, C.J. a. F., Koelmans, A.A., 2014. Strong Sorption of PCBs to Nanoplastics, Microplastics, Carbon Nanotubes, and Fullerenes. Environ. Sci. Technol. 48, 4869–4876. doi:10.1021/es405721v

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. Press. Stress. Shocks Trends Estuar. Ecosyst. 130, 54–61. doi:10.1016/j.ecss.2013.03.022

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

Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. Nature 467, 555–561. doi:10.1038/nature09440

| W |

Wang, C., Wang, H., Fu, J., Gu, G., 2014. Effects of additives on PVC plastics surface and the natural flotability. Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 441, 544–548. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.10.010

Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., Li, M., 2016. The behaviors of microplastics in the marine environment. Mar. Environ. Res. 113, 7–17. doi:10.1016/j.marenvres.2015.10.014

Ward, E.J., Shumway, S.E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., VOLUME 300 Special Issue 300, 83–130. doi:10.1016/j.jembe.2004.03.002

Ward, J.E., Kach, D.J., 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. Mar. Environ. Res. 68, 137–142. doi:10.1016/j.marenvres.2009.05.002

Watts, A.J.R., Lewis, C., Goodhead, R.M., Beckett, S.J., Moger, J., Tyler, C.R., Galloway, T.S., 2014. Uptake and Retention of Microplastics by the Shore Crab Carcinus maenas. Environ. Sci. Technol. 48, 8823–8830. doi:10.1021/es501090e

Watts, A.J.R., Urbina, M.A., Corr, S., Lewis, C., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of Plastic Microfibers by the Crab Carcinus maenas and Its Effect on Food Consumption and Energy Balance. Environ. Sci. Technol. doi:10.1021/acs.est.5b04026

Watts, A.J.R., Urbina, M.A., Goodhead, R., Moger, J., Lewis, C., Galloway, T.S., 2016. Effect of Microplastic on the Gills of the Shore Crab Carcinus maenas. Environ. Sci. Technol. 50, 5364–5369. doi:10.1021/acs.est.6b01187

Weinstein, J.E., Crocker, B.K., Gray, A.D., 2016. From macroplastic to microplastic: Degradation of high density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. Environ. Toxicol. Chem. n/a-n/a. doi:10.1002/etc.3432

Welden, N.A.C., Cowie, P.R., 2016. Environment and gut morphology influence microplastic retention in langoustine, Nephrops norvegicus. Environ. Pollut. 214, 859–865. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.067

Wesch, C., Barthel, A.-K., Braun, U., Klein, R., Paulus, M., 2016. No microplastics in benthic eelpout (Zoarces viviparus): An urgent need for spectroscopic analyses in microplastic detection. Environ. Res. 148, 36–38. doi:10.1016/j.envres.2016.03.017

Wolschke, H., Sühring, R., Xie, Z., Ebinghaus, R., 2015. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in the aquatic environment: A case study of the Elbe River, Germany. Environ. Pollut. 206, 488–493. doi:10.1016/j.envpol.2015.08.002

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. doi:10.1098/rsos.140317

World Economics Forum, 2016. The New Plastics Economy- Rethinking the future of plastics [WWW Document]. URL http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf (accessed 4.13.17).

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. Environ. Pollut. 178, 483–492. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 8244–8259. doi:10.1007/s11356-016-6333-x

Wyart, D., 2007. Les polymères biodégradables. Tech. Ing.

| Y |

Yamamoto, T., Yasuhara, A., 1999. Quantities of bisphenol a leached from plastic waste samples. Chemosphere 38, 2569–2576.

Ye, S., Andrady, A.L., 1991. Fouling of floating plastic debris under Biscayne Bay exposure conditions. Mar. Pollut. Bull. 22, 608–613. doi:10.1016/0025-326X(91)90249-R

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, K., 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). Science 351, 1196–1199. doi:10.1126/science.aad6359

| Z |

Zeng, S.H., Duan, P.P., Shen, M.X., Xue, Y.J., Wang, Z.Y., 2016. Preparation and degradation mechanisms of biodegradable polymer: a review. IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 137, 012003. doi:10.1088/1757-899X/137/1/012003

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. doi:10.1021/es401288x

Zettler, E.R., Takada, H., Monteleone, B., Mallos, N., Eriksen, M., Amaral-Zettler, L.A., 2017. Incorporating citizen science to study plastics in the environment. Anal. Methods 9, 1392–1403. doi:10.1039/C6AY02716D

Zhao, S., Zhu, L., Li, D., 2015. Microplastic in three urban estuaries, China. Environ. Pollut. 206, 597–604. doi:10.1016/j.envpol.2015.08.027

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, distribution. Mar. Pollut. Bull. 86, 562–568. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.06.032

Les microplastiques : une menace en rade de Brest ?

Depuis plusieurs décennies la production mondiale de plastiques ne cesse d'augmenter, menant à une contamination des écosystèmes aquatiques à l'échelle de la planète qui a été récemment estimée à plus de cinq mille milliards de débris de plastiques flottants à la surface des océans. Les microplastiques (particules de plastique < 5 mm), introduits dans l'environnement aquatique directement en tant que microparticules (granulés plastiques industriels, cosmétiques, fibres textiles) ou lors de la fragmentation de plus gros débris plastiques, représentent une préoccupation scientifique et sociétale grandissante. Ces travaux de thèse se sont focalisés sur la contamination par les microplastiques de la rade de Brest (Bretagne, France), un système côtier macrotidal où l'activité anthropique est importante. Les objectifs de ces travaux sont (1) d'évaluer la contamination des matrices environnementales (eau de surface, sédiment subtidal et biote) par les microplastiques, et (2) d'identifier leur rôle potentiel en tant que vecteurs de contaminants chimiques et de bactéries dans la rade de Brest.

Pour cela, des développements analytiques ont été nécessaires afin d'améliorer leur extraction des matrices environnementales ainsi que leur caractérisation morphologique et chimique via la micro-spectrométrie Raman. Les observations *in situ* ont montré que l'ensemble de l'écosystème de la rade de Brest est contaminé par les microplastiques, avec des concentrations de 0,24 ± 0,35, et 0,97 ± 2,08 (moyenne ± écart-type). L'eau de surface et le sédiment sont contaminés par le polyéthylène, le polypropylène et le polystyrène. Leur distribution à la surface de l'eau semble être liée à l'urbanisation très présente au nord de la rade, mais également à l'hydrodynamisme de cette région marine. Les premiers résultats concernant les bivalves marins ont montré un niveau relativement faible de contamination par les microplastiques (0,01 ± 0,04 et 0,08 ± 0,34 pour les moules et les coques, respectivement), cependant cela est probablement dû aux choix méthodologiques appliqués ici (exclusion des fibres). Les observations *in situ* ont montré que certains polluants organiques (HAP, PCB et pesticides) étaient détectés sur les microplastiques flottants à des valeurs (non détecté - 49763 $ng.g^{-1}$, moyenne ± écart-type) similaires de celles retrouvées dans les sédiments et les bivalves locaux, ce qui suggère un risque faible dans le transfert des contaminants chimiques vers les organismes marins en cas d'ingestion. Enfin, les résultats concernant la colonisation bactérienne des microplastiques flottants ont montré des communautés distinctes de celles retrouvées dans l'eau de mer environnante, et l'identification du genre *Vibrio* en tant que biomarqueur discriminant de cette matrice. Dans l'ensemble, ces travaux fournissent une première évaluation approfondie de l'état de contamination de la rade de Brest par les microplastiques ainsi que de solides recommandations méthodologiques pour des travaux futurs.

Mots clés : Microplastiques ; micro-spectroscopie Raman ; matrices environnementales ; rade de Brest ; polluant organique; communautés bactériennes.

Microplastics: a threat for the bay of Brest ?

World production of plastics has increased steadily for the past decades leading to a major contamination of the worldwide aquatic ecosystems recently estimated at more than five trillion plastic pieces floating the surface of the oceans. Microplastics (plastic particles < 5 mm) are introduced into aquatic environments directly as industrial raw material (plastic pellets, cosmetics, clothing) or indirectly via the fragmentation of larger plastics. This emerging contaminant represents an increasing ecological concern for science and society. The present study focused on the microplastic contamination of the Bay of Brest (Brittany, France), a macrotidal coastal ecosystem characterized by intense anthropogenic activity. The main objectives were: (1) to evaluate the contamination of environmental matrices (surface water, subtidal sediment and biota) by microplastics, and (2) to identify their potential role as vector of chemicals and bacteria in the bay of Brest.

Methodological developments were first conducted to improve microplastic extraction from environmental matrices as well as their rapid morphological and chemical identification by Raman micro-spectrometry. The field investigations showed that the ecosystem of the bay of Brest is contaminated by microplastics with mean concentrations of 0.24 ± 0.35, and 0.97 ± 2.08 (mean ± standard deviation) in surface water and sediment, respectively. Microplastic contamination in surface water and sediment was dominated by polyethylene, polypropylene and polystyrene microparticles. Spatial microplastic distribution appeared to be related to proximity to urbanized areas and to hydrodynamic in the bay. Preliminarily results of microplastic contamination in marine bivalves demonstrated relatively low contamination (0.01 ± 0.04, and 0.08 ± 0.34 for mussels and cockles, respectively) by microplastics (mainly polyethylene and polypropylene fragments), however this could be partly related to the methodological limitation identified here (e.g. exclusion of fibers). Organic pollutant (PAH, PCB and pesticides) were detected on floating microplastics at levels (not detected – 49,763 ng g^{-1}, mean ± SD) similar to those measured in sediment and bivalves suggesting low risks in transferring hazardous chemicals in local marine organisms upon microplastic ingestion. Finally, distinct bacterial community assemblages were demonstrated on microplastics as compared with surrounding surface water; the *Vibrio* genus was identified as a discriminant biomarker of the plastic matrix. Overall, this work provides a first and thorough assessment of the microplastic contamination in the bay of Brest and solid methodological recommendations for further work.

Keywords: Microplastics; micro-spectroscopy Raman; environmental matrices; bay of Brest; organic pollutant; bacterial communities.